

**Modulación  
ejercida por los  
glucocorticoides  
sobre la función de  
barrera intestinal**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor:  
D.L.: En trámite  
ISBN: En trámite

El doctorando Borja Ocón Moreno y los directores de la tesis, Fermín Sánchez de Medina López-Huertas y Olga Martínez Augustin. Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

En Granada a 21 de mayo de 2015

Director/es de la Tesis. Fdo.: Fermín Sánchez de Medina López-Huertas

Fdo.: Olga Martínez Augustin

Doctorando. Fdo.: Borja Ocón Moreno

---

**ÍNDICE**
**SUMMARY**

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| 1. MATERIAL AND METHODS .....   | 12 |
| 2. INTRODUCTION .....           | 13 |
| 3. AIMS.....                    | 15 |
| 4. RESULTS AND DISCUSSION ..... | 15 |
| 5. CONCLUSIONS .....            | 19 |

**MATERIAL Y MÉTODOS**

|   |    |
|---|----|
| 1. REACTIVOS .....  | 23 |
| 2. EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i> .....  | 23 |
| 2.1. Animales de experimentación y modelos animales.....  | 23 |
| 2.1.1. Inducción de colitis aguda por sulfato de dextrano sulfato sódico (DSS) .....                | 23 |
| 2.1.2. Depleción de la microbiota intestinal. Generación de condiciones de pseudo-esterilidad. .... | 23 |
| 2.1.3. Inducción de colitis por transferencia linfocitaria.....                                     | 25 |
| 2.2. Diseño experimental <i>in vivo</i> .....   | 26 |
| 2.2.1. Colitis aguda inducida por DSS.....  | 26 |
| 2.2.2. Colitis recurrente por DSS con exposición a budesonida previa al segundo ciclo .....         | 27 |
| 2.2.3. Colitis aguda inducida por DSS en ratones pseudo-estériles.....                              | 28 |
| 2.2.4. Modelo de colitis por transferencia linfocitaria en ratón .....                              | 29 |
| 2.3. Caracterización de la inflamación en los modelos animales .....                                | 30 |
| 2.3.1. Caracterización bacteriológica de los ganglios linfáticos mesentéricos (MLNs) .....          | 30 |
| 2.3.2. Caracterización bacteriológica y cuantificación de LPS en hígado .....                       | 30 |
| 2.3.3. Obtención del plasma sanguíneo .....   | 31 |
| 2.3.4. Análisis sanguíneo general.....  | 31 |
| 2.3.5. Determinación de la glucemia .....   | 31 |
| 2.3.6. Determinación de la temperatura.....   | 31 |
| 2.3.7. Estudio <i>in vivo</i> del estado inflamatorio general por imagen .....                      | 32 |

---

|   |    |
|---|----|
| 2.3.8. Estudio histológico.....   | 32 |
| 3. EXPERIMENTOS <i>EX VIVO</i> .....  | 33 |
| 3.1. Cultivo de fragmentos de tejido colónico .....   | 33 |
| 3.2. Estudio de la permeabilidad paracelular en tejido colónico distal.....   | 33 |
| 4. EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i> .....   | 34 |
| 4.1. Diseño experimental <i>in vitro</i> .....  | 34 |
| 4.2. Cultivo de líneas celulares de enterocitos.....  | 34 |
| 4.3. Estudio del efecto de los glucocorticoides sobre la sensibilidad de células epiteliales intestinales a LPS.....  | 35 |
| 4.4. Estudio del efecto de los glucocorticoides de forma directa e indirecta sobre la respuesta a R-spondin-1 (RSPO1) en células epiteliales intestinales IEC4.1..... | 35 |
| 4.5. Cultivos primarios de células mononucleares .....  | 36 |
| 4.6. Purificación celular magnética .....   | 37 |
| 4.7. Cultivo de células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón.....  | 37 |
| 4.8. Ensayo de permeabilidad epitelial <i>in vitro</i> .....  | 38 |
| 4.9. Medición de la resistencia transepitelial (TEER).....  | 39 |
| 4.10. Ensayo de invasión bacteriana sobre células epiteliales intestinales .....  | 39 |
| 4.11. Ensayo de curación de herida epitelial <i>in vitro</i> .....  | 40 |
| 5. TÉCNICAS GENERALES .....   | 40 |
| 5.1. Determinación de la actividad mieloperoxidasa y fosfatasa alcalina en colon.....   | 40 |
| 5.2. Cuantificación de la sangre oculta en heces .....  | 40 |
| 5.3. Determinación de nitratos y nitritos en plasma.....  | 41 |
| 5.4. Determinación de la secreción de citoquinas en sobrenadante de cultivo celular/tisular o en plasma mediante ELISA .....  | 41 |
| 5.5. Extracción y cuantificación del contenido proteico .....   | 41 |
| 5.6. Western Blot.....  | 42 |
| 5.7. Extracción de RNA y reacción de retrotranscripción .....   | 42 |
| 5.8. Análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real .....   | 43 |
| 5.9. Citometría de flujo .....  | 43 |

---

|   |    |
|---|----|
| 6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....   | 44 |
| <b>INTRODUCCIÓN</b>   |    |
| 1. SISTEMA INMUNITARIO GASTROINTESTINAL .....                                     | 49 |
| 1.1 Barrera epitelial.....  | 49 |
| 1.2. Tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal (GALT).....                  | 54 |
| 1.2.1. Placas de Peyer, folículos linfoides aislados y apéndice vermiforme .....  | 55 |
| 1.2.2. Ganglios linfáticos mesentéricos (MLN) .....                               | 56 |
| 1.3. Sistema inmunitario innato .....   | 56 |
| 1.3.1. Péptidos antimicrobianos y otros mediadores solubles .....                 | 56 |
| 1.3.2. Componentes celulares del sistema inmune innato.....                       | 58 |
| 1.4. Sistema inmunitario adaptativo .....   | 62 |
| 1.4.1. Linfocitos T en el GALT .....  | 62 |
| 1.4.2. Linfocitos de lámina propia (LPL).....                                     | 64 |
| 1.4.3. Linfocitos intraepiteliales (IEL).....                                     | 64 |
| 1.4.4. Linfocitos B .....   | 65 |
| 2. MICROBIOTA .....   | 67 |
| 2.1. Receptores de reconocimiento de patógenos.....                               | 69 |
| 2.1.2. Toll-like receptors (TLR).....   | 70 |
| 2.1.3. Nucleotide binding oligomerization domain-like receptors (NLR) .....       | 73 |
| 2.1.4. Retinoic acid induced-like receptors (RLR).....                            | 75 |
| 2.1.5. Inflamasomas .....   | 76 |
| 2.1.6. C-type lectin receptors (CLR).....   | 76 |
| 2.1.7. Otros receptores relevantes en la inmunidad innata, ajenos a los PRR ..... | 77 |
| 2.2. Animales axénicos, libres de gérmenes o <i>germ-free</i> (GF) .....          | 77 |
| 3. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL.....  | 81 |
| 3.1. Generalidades .....  | 81 |
| 3.2. Epidemiología .....  | 83 |

|   |     |
|---|-----|
| 3.3. Etiología.....   | 85  |
| 3.3.1. Factores genéticos.....  | 85  |
| 3.3.2. Factores ambientales.....  | 88  |
| 3.4. Inmunología de la EII.....   | 91  |
| 3.4.1. Fundamentos sobre la instauración y desarrollo de la EII.....                | 91  |
| 3.4.2. Vías de señalización relevantes en la fisiopatología de la EII.....          | 95  |
| 4. MODELOS EXPERIMENTALES EN LA EII.....  | 105 |
| 4.1. Modelos experimentales de colitis inducidos químicamente.....                  | 105 |
| 4.2. Modelos de inflamación intestinal generados por modificación genética.....     | 106 |
| 4.3. Modelos espontáneos de inflamación intestinal.....                             | 107 |
| 4.4. Modelos de colitis inducida mediante transferencia celular.....                | 107 |
| 5. TRATAMIENTO DE LA EII.....   | 108 |
| 5.1. Aminosalicilatos.....  | 108 |
| 5.2. Azatioprina y 6-mercaptopurina.....  | 109 |
| 5.3. Metotrexato.....   | 109 |
| 5.4. Ciclosporina y tacrolimus.....   | 110 |
| 5.5. Terapia biológica.....   | 110 |
| 5.6. Terapia génica.....  | 112 |
| 5.7. Terapia con células madre.....   | 112 |
| 5.8. Algoritmo de decisión clínica en el manejo de brotes moderados de CU y EC..... | 113 |
| 6. GLUCOCORTICOIDES.....  | 115 |
| 6.1. Historia.....  | 115 |
| 6.2. Eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HHA).....                                  | 115 |
| 6.3. Esteroidogénesis y liberación de glucocorticoides.....                         | 118 |
| 6.4. Acciones fisiológicas de los corticosteroides.....                             | 118 |
| 6.5. Mecanismo de acción molecular de los glucocorticoides.....                     | 122 |
| 6.5.1. Estructura del GR.....   | 123 |

|   |     |
|---|-----|
| 6.5.2. Interacción GC-GR y efectos sobre la transcripción.....              | 123 |
| 6.6. Farmacocinética .....  | 125 |
| 6.6.1. Absorción.....   | 125 |
| 6.6.2. Transporte.....  | 126 |
| 6.6.3. Metabolismo y excreción .....  | 127 |
| 6.7. Dianas celulares para GC relevantes en la inmunología intestinal ..... | 127 |
| 6.7.1. Efectos de los GC sobre células epiteliales .....                    | 127 |
| 6.7.2. Efectos sobre las células endoteliales .....                         | 128 |
| 6.7.3. Efectos de los GC sobre células presentadoras de antígenos.....      | 130 |
| 6.7.4. Efectos de los GC sobre los leucocitos polimorfonucleares .....      | 130 |
| 6.7.5. Efectos de los GC sobre las células B .....                          | 131 |
| 6.7.6. Efectos sobre las células T.....                                     | 131 |
| 6.8. Aplicaciones clínicas de los GC .....                                  | 132 |
| 6.8.1. Aplicaciones terapéuticas en enfermedades endocrinas .....           | 132 |
| 6.8.2. Aplicaciones terapéuticas en enfermedades no endocrinas .....        | 133 |
| 6.9. Efectos adversos asociados a los GC .....                              | 137 |
| 6.9.1. Efectos adversos de los GC en la piel.....                           | 137 |
| 6.9.2. Efectos adversos de los GC sobre el músculo esquelético .....        | 138 |
| 6.9.3. Efectos adversos de los GC sobre el hueso.....                       | 138 |
| 6.9.4. Efectos adversos de los GC sobre el ojo.....                         | 139 |
| 6.9.5. Efectos adversos de los GC sobre el sistema nervioso central.....    | 139 |
| 6.9.6. Efectos adversos de los GC sobre el sistema endocrino .....          | 139 |
| 6.9.7. Efectos adversos de los GC sobre el sistema cardiovascular .....     | 140 |
| 6.9.8. Efectos adversos de los GC sobre el aparato gastrointestinal.....    | 140 |
| 6.9.9. Efectos adversos de los GC sobre el crecimiento y el desarrollo..... | 140 |
| 6.10. Agonistas selectivos del receptor de glucocorticoides (SEGRAs).....   | 140 |
| 6.11. GC y el entorno intestinal.....                                       | 141 |



|   |     |
|---|-----|
| 6.11.1. Efectos del estrés sobre la función de barrera epitelial .....  | 142 |
| 6.11.2. Efectos del estrés sobre el flujo hidroelectrolítico intestinal.....  | 142 |
| 6.11.3. Efectos del estrés sobre la permeabilidad intestinal a antígenos bacterianos y otras macromoléculas.....                  | 143 |
| 6.11.4. Diálogo entre la microbiota intestinal y el estrés, con los GC como intermediarios..                                      | 144 |
| 7. SÍNTESIS EXTRA-ADRENAL DE GLUCOCORTICOIDES.....  | 145 |
| 7.1. Síntesis extra-adrenal de GC en el epitelio epidérmico .....   | 145 |
| 7.2. Síntesis extra-adrenal de GC en el epitelio intestinal.....  | 146 |
| 7.2.1. Regulación de la síntesis de GC en el epitelio intestinal .....  | 146 |
| 7.2.2. Efectos de los GC intestinales sobre la inmunidad local de la mucosa intestinal .....                                      | 148 |
| <b>RESULTADOS</b>   |     |
| 1. ESTUDIOS <i>IN VIVO</i> .....  | 157 |
| 1.1. Efecto de la budesonida sobre la colitis aguda inducida por DSS.....   | 157 |
| 1.2. Efecto de la budesonida sobre la colitis aguda inducida por DSS en animales con depleción en la microbiota intestinal.....   | 191 |
| 1.3. Efecto de la exposición a budesonida de forma previa al desarrollo de la colitis aguda inducida por DSS .....                | 203 |
| 1.4. Efecto de la budesonida sobre la colitis experimental inducida mediante transferencia linfocitaria .....                     | 209 |
| 2. ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> .....   | 226 |
| 2.1. Estudios en células epiteliales intestinales.....  | 226 |
| 2.1.1. Efecto de los glucocorticoides sobre la respuesta a PAMPs .....  | 226 |
| 2.1.2. Efecto de los glucocorticoides sobre la restitución epitelial .....  | 232 |
| 2.1.3. Efecto de los glucocorticoides sobre la cascada de señalización Wnt/ $\beta$ -Catenina.....                                | 234 |
| 2.1.4. Efecto de los glucocorticoides sobre la resistencia de las células epiteliales intestinales a la invasión bacteriana ..... | 237 |
| 2.1.5. Efecto de los glucocorticoides sobre la función de barrera epitelial ensayada <i>in vitro</i>                              | 239 |
| 2.2. Estudios en células presentadoras de antígenos y células T CD4 .....   | 241 |

|                       |     |
|-----------------------|-----|
| DISCUSIÓN .....       | 249 |
| CONCLUSIONES.....     | 271 |
| CONCLUSIONS .....     | 275 |
| REFERENCIAS .....     | 279 |
| ABREVIATURAS .....    | 323 |
| AGRADECIMIENTOS ..... | 331 |



# SUMMARY



## 1. MATERIAL AND METHODS

To carry out the objectives of the present Thesis, we used a wide variety of techniques, including tissue culture techniques, real time PCR, magnetic cell separation, histology techniques, flow cytometry, Ussing chambers, Western Blot, ELISA as well as different models of colitis (DSS and lymphocyte transfer model).

## 2. INTRODUCTION

Inflammatory bowel disease (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. Now there are several therapeutic options available to face the clinical management of the IBD regardless its manifestation, but unfortunately, in spite of they normally succeed in most of the patients controlling their inflammatory condition, almost every single option has important and quite frequent side effects that partially limit their clinical use. Therefore, research efforts focusing on the search of new drugs for the treatment of this clinical conditions are needed.

Glucocorticoids (GC) are a group of hormones that were discovered for the first time by Dr. Addison by the end of the nineteenth century, from which there have been developed several synthetic derivatives currently included among the therapeutic options available for the treatment of many inflammatory disorders like IBD. Glucocorticoids are molecules with pleiotropic effects, given that they are featured by 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 action as a transcription factor activating the expression of different genes (transactivation), that action but reducing the genetic expression of a given target gene (repression) and the interaction of the GR with other transcription factors modulating eventually its function by tethering (transrepression). The immunomodulatory effects of GC that are on the basis of its effectiveness as a tool for the treatment of IBD, rise mainly from the effects at the genetic expression level, even though it is generally accepted that these effects come preferentially from transrepression and classical repression, while the majority of the side effects are related with the transactivation.

Nowadays, there is a wide variety of synthetic GC available for its clinical use by virtue of their antiinflammatory 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 the budesonide by oral administration chasing a local effect taking advantage of its significant first hepatic step.

The use of GC in the treatment of IBD has some significant limitations. Actually, only around 40 % of the patients respond normally to these drugs, while all the rest do not respond at all or respond at the beginning of the treatment but become dependent when they reach the remission

state. Besides, now is fully accepted that GC administration does not offer any benefit when administered trying to extend the remission state.

The experimental evidence currently available based on the application of synthetic GC in different models of colitis rised after their empirical use in humans. Accordingly with the well known antiinflammatory actions of these molecules, the majority of the results already published reflect a positive impact on the animal's condition and survival. However, in the case of the acute DSS-induced colitis the effect of the GC administration was surprisingly different. During the last two decades, many different researchers have published results that somehow support that assertion making use of GC in general, but particularlyly budesonide because of its profuse use in the IBD treatment. Most of these articles conclude that those colitic animals that receive budesonide at the same time that DSS, suffer a sharp increase in their susceptibility to the model with a higher mortality during the colitis induction if compared to the non treated colitic group. Surprisingly, in spite of the consistency of that evidences obtained in different laboratories and making use of different mouse strains, none of these researchers went further trying to get some clues that could shed some light on that results. This is particularly rare taking into account that the budesonide is one of the therapeutic tools more oftenly prescribed for the IBD management.

In general, GC exert their immunomodulatory effects throught the interaction with many different cell types because the ubiquitous expression of the GR. These effects are closely dependent on the negative regulation of transcription factors like NF-kB, STAT3, AP-1, etc., that play a pivotal role building inflammatory responses since their target genes in most of the cases encode for proinflammatory proteins. Nevertheless, there are some cases of proteins (MKP-1 for instance) whose expression is enhanced by the GR by transactivation, and colaborate actively in the antiinflammatory effects induced by GC. The majority of the effects of GC on the different cell types involved in the regulation of the intestinal immune system have been already elucidated. Focusing on T cells, GC exert antiproliferative and proapoptotic effects on this cell type, but also a remarkable inhibitory action of its cytokine secretion. However, little is known about the effects of GC on B cells, although some articles suggest that they reduce their relative abundance among the cells of the MLN. Considering the antigen presenting cells, GC mediate a strong inhibition of its antigen presenting function, but also polarize them towards tolerogenic-inducing behaviour. Besides, GC dramatically reduce the extravasation and infiltration to inflammatory sites of leucocytes, through a reduction of the expresión of adhesion molecules in the vascular endothelium and the infiltrating cells. The latter effect, is probably the most determinant in the overall antiinflammatory action of GC. Given that this thesis focuses on the effects of GC in the intestinal environment, we cannot rule out the importance of the effects of GC on the intestinal epithelial cells. All that is known to date about this point, is that GC significantly enhance the expression of mature features on these cells, what make them fairly useful in obstetrics.

Futhermore, it's been recently described an interesting modulatory effect of GC by means of which they produce qualitative changes on the intestinal microbiota. Attending to some recently released articles, this effect could contribute significantly to the overall antiinflammatory effect of the GC in several experimental models of intestinal inflammation, like the spontaneous colitis developed by IL10 KO mice. Unfortunately, the mechanism underlying this effect has not been described yet, although it should be related to indirect effects evoked by the systemic distribution

of the GC and at the same time it's been hypothesized that the GC-induced modulation of mucins production by intestinal epithelial cells could be decisive.

The inflammatory responses located in the intestinal area, often course with an enhancement of a wide variety of proinflammatory cytokines and chemokines, as well as a stimulation of some signalling pathways that play a pivotal role driving the effects of different inflammatory soluble mediators. For years, wide range antiinflammatory effects like those developed by GC, have been considered as extremely beneficial and thus used for the treatment of inflammatory disorders like IBD. However, now this approach has been extensively revised. Actually, nowadays many experimental evidences making use of inflammatory models like the DSS-induced colitis, revealed a concept by which blocking the effects of proinflammatory mediators like IL22, IL27, IL17A, IL1 $\beta$ , GM-CSF or KC/CXCL1, as well as the functioning of signaling pathways like the canonical NF- $\kappa$ B or those that follow the activation of innate immunity receptors like TLR, increase the severity of the experimental model.

### 3. AIMS

Based on all the above, we proposed 3 main objectives in this doctoral thesis:

1. To confirm the negative impact of GC administration by oral gavage on the DSS-induced colitis, countering that phenomenon with the effects of comparable doses of GC on a chronic and T cell-driven model of colitis.
2. To elucidate the systemic events that take place in the animals receiving GC when they are exposed at the same time to the acute DSS-induced colitis, that could at least partially explain the increased severity and eventually the higher mortality displayed by these animals.
3. To describe in detail by *in vitro* studies those actions of GC at the molecular level on the different cell types actively involved in the intestinal barrier function, trying to link them with the effects of these molecules on the acute DSS-induced colitis in mice.

## 4. RESULTS AND DISCUSSION

Our results can be split into two main sections.

### *IN VIVO*

The budesonide was administered to colitic mice exposed to the acute DSS-induced colitis (DSS1 and DSS2 experiments). In these experiments the administration of budesonide elicited an enhancement of the disease severity in a dose dependent fashion, at least considering the body weight evolution, the general condition of the animals and the survival rate. It is noteworthy that some healthy animals received the GC as well and did not showed any of the deleterious effects induced by the budesonide when co-administered with DSS. These harmful effects of the budesonide coincide with a consistent antiinflammatory effect, as reflect the significant reduction of the macroscopical colonic fibrosis, the colon weight/length ratio and the spleen weight, as well as a prominent lowering of the colonic myeloperoxidase (MPO) activity. Strikingly, all of this was accompanied by an increase of colonic alkaline phosphatase (AP) activity and its *in vitro* sensitivity



to the inhibitor levamisol, but exclusively in the colitic group that received 60 µg/mouse/day of budesonide. In line with this, the elevation of the blood lymphocyte and monocyte concentration secondary to the intestinal inflammation was reduced by the GC from the dose of 6 µg/mouse/day onwards. The evident antiinflammatory effect of the budesonide in these experimental settings, become also evident attending to the results of the analysis of the colonic tissue expression by real time PCR. In this analysis we can observe that the administration of the GC reduced dose-dependently the expression of different hallmark indicators of the inflammation triggered by the DSS, like IL6, S100A8 or IL17A. Besides, consistent results were obtained when we focused on the production of cytokines like IL22, IL27, GM-CSF, IL6 or IL17A by cultured explants of colonic tissue. It's currently accepted that the intestinal epithelium proliferation and restitution after the DSS-induced damage, plays a pivotal and irreplaceable role for recovering the intestinal homeostasis and thus on the animal general condition. Therefore, in order to get some clues regarding on this phenomenon we studied the cell proliferation nuclear antigen (PCNA) expression at the protein level in isolated intestinal epithelial cells, the BrdU incorporation and the genetic expression in colon of Cyclin D1 and c-jun. All the results we obtained fit with the pretty well known hyperproliferative response elicited by DSS-induced inflammation, and with a strong and dose-dependent inhibition of that response in the colitic animals that received budesonide. The colonic tissue of these animals was also mounted in Ussing chambers and tested for its paracellular permeability using FITC-dextrane as a probe. In this analytical approach, the GC administration reduced the tissue permeability, probably because of the previously described antiinflammatory effect of the treatment, given that this is consistent with the partial improvement of the short circuit current values that were dramatically reduced by the inflammation. The administration of budesonide also correlated with a sharp enhancement of the bacterial translocation to mesenteric lymph nodes (MLN) and liver, as well as with the presence of LPS in the latter. This evidences prompted us to wonder about the coexistence of a septic process in the colitic animals exposed to the GC. Therefore, we evaluated some systemic parameters classically used to monitor the experimentally induced septic shock. According to our suspicions about this issue, the colitic mice treated with budesonide showed clear signs of sepsis. Nevertheless, while some of the sepsis makers in lung tissue like the iNOS, IL1 $\beta$  and IL6 expression, the p-eNOS/eNOS ratio and the MPO activity, as well as the histological study of this tissue, were only significantly increased in those animals receiving 60 µg/mouse/day of budesonide, other markers like hypothermia or the plasmatic IL18 and nitrates/nitrites concentration, were upregulated by the GC administration with a lower dosage (1 and 3 µg/mouse/day).

In this work we also evaluated the effect of the budesonide on the acute DSS-induced colitis developed in animals subjected to an intense depletion of the intestinal microbiota (**DSS-PGF**). Here, the administration of the GC also correlated with a sharp elevation of the disease severity, in spite of the DSS-induced intestinal inflammation is almost completely dampened in this experimental setting. In this experiment, on the one hand we confirmed that the negative impact of the budesonide in the disease evolution was not due to an uncontrolled bacterial translocation and a septic shock elicited by that phenomenon. On the other hand we found an evident increase of the rectal bleeding in those colitic mice exposed to budesonide and microbiologically depleted in the intestine. Coherently with this notion, we found a sharp decrease in the blood hematocrite and its hemoglobine and eritrocite concentration. In line with this impairment of the intestinal barrier function suggested by all the results described above, the *in vivo* intestinal permeability appeared

increased by 2-3 fold in the experimental group we are talking about, compared to the control group. This phenomenon, together with the inhibition of the mucosal epithelium restitutive response after the DSS administration, induced by the bacterial depletion which is even increased by the budesonide, as reflected by the real time PCR results regarding on the Cyclin D1 expression in colon, let us identify a massive impairment of the intestinal barrier function as the main effect underlying the deleterious consequences of the GC administration to these animals. Besides, we also found a significant reduction of the intestinal alkaline phosphatase (IAP) and the leucine repeat containing G protein coupled receptor 5 (LGR5). This is of particular interest given that both are target genes for the  $\beta$ -catenin transcription factor. Besides, this result tightly correlated with an increased dickkopf-1 (DKK1) concentration in plasma in these animals. Attending to the role of the  $\beta$ -catenin signaling in the intestine it could be an additional mechanism involved in the effects of GC in these experimental conditions.

Once we had already described in detail the effects of the budesonide being administered to the animals while the induction of the acute DSS-induced colitis is taking place, we decided to explore its effects when the administration is restricted to a few days before de DSS addition to the drinking water (**DSS3**). Unlike all the results described above, in this experimental approach the budesonide induced a consistent improvement of the body weight evolution and the general condition of the mice. Together with these evidences, we found a significant but mild at the same time reduction of the intestinal inflammation. This notion is reflected by the results obtained regarding on general markers like the colonic weight/length ratio and AP activity, as well as the monocyte concentration in the blood. In order to compare to the previously described experiments, it is noteworthy that unlike in those experiments in which the budesonide is administered together with the DSS, in this case it did not affected the rectal bleeding and the hemoglobine and eritrocyte concentration in the blood. Besides, we did not observe any kind of bacterial or lypopolisacharide (LPS) translocation to extra-intestinal tissues, which is consistent with the lack of any sign of septic shock. All these results let us confirm that the deleterious effects of the administration of budesonide, only appear if we give the GC to the mice while the DSS administration is taking place.

In order to accomplish one of the main goals of this doctoral thesis, which included the analysis of the budesonide actions in a non-chemically-induced and T cell-driven model of colitis, we evaluated the effects of this GC in the T cell transfer-induced model of experimental colitis, using the GC at similar doses to those used in the DSS-induced colitis. The administration of the budesonide to these colitic mice, even though did not generate a clear benefit on the body weight evolution, improved significantly the general condition of them because of a fairly evident local and systemic antiinflammatory effect. The analytical approaches regarding on the hallmark inflammatory markers of this model, reflect a clear dose-dependent profile. Some of the more meaningful results come from the weight/length ratio, macroscopic fibrosis and MPO activity in colon, the concentration of Th1 cytokines in plasma, the relative abundance of CD4<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> cells among those obtained from MLN, the IL17A production by splenocytes after the stimulation with concanavaline A, and eventually the expression in colonic tissue of IFN $\gamma$ , IL1 $\beta$ , IL6, KC/CXCL1, S100A8, REG3 $\gamma$  and IL17A analyzed by real time PCR. In this experiment we also studied the bacterial translocation elicited by the inflammatory response of the model itself and wether the GC modulated somehow this phenomenon. In line with bibliography, we did not observed bacterial

translocation to liver and in the MLN it was 100 fold under what we found in the DSS model comparing the non-treated colitic groups. Besides, unlike in the DSS-induced colitis, the administration of budesonide in the T cell transfer-induced colitis did not elicit a biologically meaningful enhancement of the bacterial translocation to none of the extra-intestinal tissues evaluated. This is consistent with the negative results we obtained in this model regarding on the parameters that inform about septic shock when the mice received the GC.

## ***IN VITRO***

### **Studies in intestinal epithelial cells**

The effects of budesonide on the response of the intestinal epithelial cells (IEC4.1 and IEC18) using LPS as stimuli, was monitored by means the quantitation of chemokines in the cell culture supernatant. The results of these experiments clearly reflect an inhibitory effect of GC on this stimulation. Furthermore, attending to the graphs this inhibition follows an obvious dose-dependent trend. In the *in vitro* studies in general, we assayed four GC in parallel, budesonide, dexamethasone, prednisolone and hidrocortisone. In the experiments described above, the budesonide was clearly the most powerful since its inhibitory effect got saturated with a concentration of 0.1  $\mu\text{M}$ , while considering any of the other GC it happened at a concentration between 1 and 10  $\mu\text{M}$ . Comparable results were obtained using peptidoglycane (PGN) as stimuli.

Furthermore, the GC (mainly budesonide and dexamethasone) consistently stimulated the expression of toll-like receptor 4 (TLR4) in IEC4.1 cells. Thus, it is not surprising the increased sensitivity to LPS that we found after the pre treatment of the cells with GC.

Given that the epithelial restitution after the DSS challenge in the intestine is decisive in the animal evolution, in order to complement the findings from *in vivo* experiments we decided to evaluate the effects of GC on the epithelial wound healing assayed *in vitro*. Our results show a prominent effect of all the GC tested, by which they significantly slowed down the wound healing both, under steady-state conditions and with the presence of stimulators of the proliferation and migration of epithelial cells like IL22, IL27 or keratinocyte growth factor.

Attending to our findings that inform about an uncontrolled bacterial translocation induced by GC in the animals with acute DSS-induced colitis, we found interesting to test *in vitro* whether these molecules affected the sensitivity of two murine cell lines (IEC18 and IEC4.1) to the invasion of an enteroinvasive *E. coli* strain, the LF82. Our results in this experiments were pretty convincing, since they reflect a consistent increase of the invasion in the cells exposed to all GC in the case of rat cell line IEC18, while strikingly it only was reproduced for the budesonide when using the mouse IEC4.1 cells but with a clear dose-dependent profile.

Owing to the evidences already described in the *in vivo* section suggesting an inhibitory effect of budesonide on the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway, we decided to explore the effects of the GC on the response of IEC4.1 cells to R-spondin-1 (RSPO1) as stimuli. Our data resulting from this experiments reflect a weak or even the absence of any effect of the direct presence of GC on the activation of the low density lipoprotein receptor-related protein 6 (LRP6) by RSPO1. However, in some independent experiments generating conditioned medium we tested the non-direct effects of GC on this pathway. It's pretty feasible that these effects could be mediated by the epithelial

production of some soluble mediators that can develop an antagonistic action on the LRP6 receptors. In line with that hypothesis, the exposure of IEC4.1 cells to GC, prompted them to produce some still unidentified mediators that dampened the epithelial cell's response to RSPO1. This theory is supported by the sharp but quite heterogeneous elevation of the DKK1 expression that we observed in IEC4.1 cells that received GC for 4 days. This result prompted us to think that this protein could mediate the indirect inhibitory effect of GC on the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway, so we tried to detect it in the conditioned medium by ELISA. Unfortunately, we were no able to get any positive signal in any of the experimental conditions. Therefore, we can conclude that the effect described above is not exclusively attributable to DKK1 at all, but we cannot rule out the possibility that this protein contribute in some extent to that effect together with other factors.

Finally, we also analyzed the effects of GC on the paracellular permeability to FITC-dextrane, making use of monolayers of IEC4.1, IEC18 and CACO-2 cells grown in Transwell® membranes. Strikingly, our results suggest a distinguishing behaviour of murine cell lines (IEC18 and IEC4.1) and the human one (CACO-2). While the treatment of the murine monolayers with GC for 48 hours reduced consistent and dose-dependently the presence of the fluorescence probe in the basolateral compartment compared to the Control group (probable owing to the undifferentiated condition of these cells in the steady-state), considering the human cell line we got contrary results. Besides, the increased paracellular permeability associated with the exposure of CACO-2 cells to GC was even more prominent as the cells were more differentiated, which could related with the increasing expression of the glucocorticoid receptor by these cells as they differentiate.

#### **Studies in antigen presenting cells and CD4+ T cells**

There are many already published articles that extensively describe the immunomodulatory (mainly immunosuppressive) effects of the GC on the different cell types included in the gastrointestinal immune system. However, in the present doctoral thesis we decided to confirm in detail how this molecules alter the production of some cytokines with a pivotal role in the physiological response to the DSS challenge, in order to reach a better understanding of the *in vivo* results obtained making use of the DSS model. These assays were performed using the cell types that have been already described as a relevant source of the cytokines we wanted to focus on. These cells are above all, antigen presenting cells. This section of the results include evidences that reflect the inhibitory effect of GC on the production of cytokines like IL22, IL27 and IL6 by, dendritic cells and CD4+ T cells magnetically purified from the spleen of healthy mice, bone marrow derived dendritic cells and splenocytes. In this experiments we needed to stimulate these cells in order to get a significant production of cytokines, so as to we could measure its levels by ELISA. Thus, all the cell types cited above were boost with different stimuli like IL23, LPS, PGN or CpGDNA, but always after an exposure for 4-6 hours to the GC.

## **5. CONCLUSIONS**

1. Budesonide and likely glucocorticoids in general, have an interesting double sword action on the inflamed intestinal mucosa: first a consistent local antiinflammatory action, but also a negative effect related to an induction of a leaky gut state that has a negative impact on the systemic balance, namely a severe worsening of the animal condition and eventually its death.

2. Our data strongly suggest that the deleterious effects of glucocorticoids on the intestinal mucosa, take place exclusively when the intestinal epithelium is severely damaged (acute DSS-induced colitis). Conversely, they don't appear when the glucocorticoids are used in other models of colitis in which the intestinal epithelial barrier is barely compromised, for instance the lymphocyte transfer-induced colitis.

3. The weakening of the intestinal barrier function induced by glucocorticoids implies an enhancement of the bacterial translocation from the gut to other extra-intestinal tissues. Our data point towards an inhibition of the immunological mechanisms in charge of the luminal bacteria containment, but also of the wound healing mechanisms of the intestinal epithelium as the underlying reason for this phenomenon.

4. *In vitro* studies developed on intestinal epithelial cells point to certain differences among the different glucocorticoids in terms of the modulation of the epithelial cell's invasion by enteroinvasive bacteria, cytokine release after stimulation with different PAMP and epithelial wound healing, even though more experiments are needed to clarify this diverging behaviour. Actually, during the last year of experimental work oriented to this thesis we have developed a transgenic mouse with inducible ablation of the glucocorticoid receptor in the intestinal epithelial cells. This tool will help us shedding light on the relative relevance of this cell type in the effects of locally produced and exogenous glucocorticoids on the acute DSS-induced colitis described in this work, but also on its role in the intestinal homeostasis both under steady-state and other inflammatory conditions.

5. Our results could have some implications regarding on the clinical management of IBD patients making use of glucocorticoids with local or systemic distribution, particularly if the disease is featured by a sharp increase of the intestinal permeability and/or bacterial translocation. Besides, many investigators are pointing to the intestinal barrier dysfunction as a critical factor in the establishment of other diseases like the metabolic syndrome. Thus, our results suggest that the indication of glucocorticoids like budesonide in patients with that medical condition could be controversial.

MATERIAL

Y

MÉTODOS



## 1. REACTIVOS

Todos los reactivos empleados, excepto donde se indique lo contrario, han sido suministrados por Sigma® (Madrid, España). La budesonida fue suministrada por Molekula Ltd. (Gillingham, UK).

## 2. EXPERIMENTOS *IN VIVO*

### 2.1. Animales de experimentación y modelos animales

En los experimentos *in vivo*, se emplearon ratones C57BL6/J hembras, con una edad comprendida entre las 8-10 semanas, suministrados por Harlan Laboratories® (Barcelona, España). Dichos 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 colitis inducida por dextrano sulfato sódico (DSS). Los experimentos realizados han sido aprobados por 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.

#### 2.1.1. Inducción de colitis aguda por sulfato de dextrano sulfato sódico (DSS)

De forma general, la inducción de la colitis se realizó mediante la administración de DSS2.5% (P.V<sup>-1</sup>) en agua de bebida, siendo esta repuesta a diario durante la totalidad del experimento, que oscila entre 6-8 días en función de las condiciones experimentales concretas [1, 2]. La monitorización del estado de los animales se realizó atendiendo a los criterios recogidos en el índice de daño de la enfermedad (Tabla 1). Del mismo modo, se realizó en todos los experimentos de este tipo un seguimiento diario de la evolución del peso corporal, que fue representada de forma relativa al peso inicial de cada animal en el comienzo del experimento, así como del consumo de agua y pienso.

#### 2.1.2. Depleción de la microbiota intestinal. Generación de condiciones de pseudo-esterilidad.

De forma previa a la inducción de la colitis en algunos experimentos se deplecionó la microbiota mediante la administración de una combinación de antibióticos de amplio espectro en el agua de bebida durante un mes, compuesta por ampicilina 1 g/l, neomicina 1 g/l, metronidazol 0,25 g/l y vancomicina 0,5 g/l a ratones C57BL6/J [3]. Durante el mes de exposición a antibióticos, el agua de bebida fue repuesta cada 3-4 días. A estos animales los denominamos pseudo-estériles. Con frecuencia semanal se monitorizó la depleción progresiva de bacterias en el contenido fecal, obteniéndose una ausencia total de estas a partir de la segunda semana de tratamiento. Dicha monitorización fue realizada mediante la obtención de DNA de heces (QIAamp DNA stool Minikit, QIAGEN, Hilden, Alemania) y posterior amplificación de un fragmento común de la



subunidad 16S del rRNA bacteriano mediante RT-PCR. Los cebadores utilizados fueron: hebra sentido TCCTACGGGAGGCAGCAGT y hebra antisentido GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT. Asimismo, se realizaron cultivos de homogenado de heces con medios selectivos para distintos géneros representativos de la microbiota comensal intestinal en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis, siendo estos igualmente negativos en todos los casos a partir de la segunda semana de exposición a antibióticos. Los medios de cultivo usados para tal efecto fueron, MRS Agar, Wilkins-Chalgren, Reinforced Clostridial y Agar MacConkey.

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

| Parámetro           | Aspecto                  | Valoración |
|---------------------|--------------------------|------------|
| Estado del animal   | Normal                   | 0          |
|                     | Alteración en la postura | 1          |
|                     | Pelo ligeramente erizado | 2          |
|                     | Pelo erizado             | 3          |
|                     | Pelo muy erizado         | 4          |
| Estado de las heces | Normal                   | 0          |
|                     | Ligeramente blandas      | 1          |
|                     | Blandas                  | 2          |
|                     | Diarrea                  | 3          |
| Sangre en heces     | Ninguna                  | 0          |
|                     | Heces oscuras            | 1          |
|                     | Restos de sangre         | 2          |
|                     | Mucha sangre             | 3          |

Una vez eliminada la microbiota comensal intestinal, se indujo la colitis mediante la administración de DSS2.5% (P.V<sup>-1</sup>) en agua de bebida durante 6 días, conteniendo esta además la misma combinación de antibióticos antes descrita para mantener las condiciones de pseudo-esterilidad. El agua de bebida fue respuesta cada 2 días durante el curso de la inducción de la colitis.

### 2.1.3. Inducción de colitis por transferencia linfocitaria

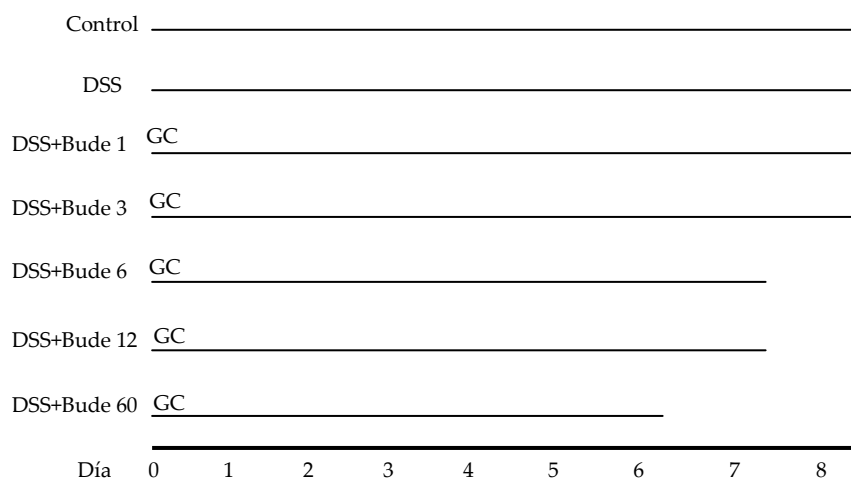
La inducción de la colitis se realizó mediante la transferencia de una subpoblación purificada de células T *naïve* (vírgenes) CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> a ratones C57BL6/J RAG1 *knock out* (KO) (ratones que carecen de linfocitos T y B funcionales). Las células T *naïve* CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> fueron obtenidas por separación magnética en columnas (Miltenyi Biotec®, Bergisch Gladbach, Alemania) a partir de esplenocitos aislados de ratones WT C57BL6/J. Una vez obtenidos, estos esplenocitos fueron filtrados mediante un filtro de 70 µM (cell strainer BD Falcon™ Ref 352350) con objeto de conseguir una suspensión celular homogénea con la que poder proceder a la separación. En un primer paso, tras lavar esta suspensión celular con tampón MACs (PBS 1X, 2% albúmina, 1 mM EDTA), se aislaron las células T CD4<sup>+</sup> por selección negativa mediante el marcaje de células no CD4<sup>+</sup> con anticuerpos específicos (anti-CD8α, anti-CD45R, anti-CD11b, anti-CD25, anti-CD49b, anti-TCRγ/δ y anti-Ter-119). En un segundo paso, el marcaje específico de CD62L permitió el aislamiento de células T *naïve* CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> mediante selección positiva. Las células T *naïve* CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> purificadas así obtenidas fueron lavadas, resuspendidas en PBS frío y finalmente inyectadas intraperitonealmente, una cantidad de 1.1x10<sup>6</sup> de ellas en un volumen de 0.15 ml de PBS a ratones C57BL6/J RAG1 KO. Otro grupo recibió el mismo volumen de PBS estéril. Los ratones fueron monitorizados durante 8 semanas tras la transferencia, controlando semanalmente el peso corporal de cada uno de ellos y se expresó como porcentaje de pérdida de peso corporal respecto al día de la inyección de células T *naïve* CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> o PBS (valor inicial de peso corporal). Además del peso corporal, también se evaluaron semanalmente parámetros como diarrea y presencia de sangre oculta en heces (Hemocult Sensa, Beckman Coulter, Miami, Florida, EEUU). La transferencia de linfocitos T CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> a ratones C57BL6/J Rag1 KO da lugar a un proceso colítico dependiente de la presencia de microbiota comensal [4] caracterizada por una progresiva pérdida de peso corporal que resulta evidente transcurridas 4-8 semanas desde la transferencia. Los animales seleccionados para este estudio mostraron una media del 10% de pérdida de peso corporal alrededor de la semana 8 y mantenida durante varios días consecutivos, lo cual junto con los parámetros anteriormente mencionados, nos permitió establecer un índice de actividad de la enfermedad que nos ayudó a determinar el momento óptimo de los animales para el comienzo de tratamiento. La evaluación del índice de actividad de la enfermedad se estableció de la siguiente manera: consistencia de las heces (0, normales; 1, algo blandas y/o prolapso rectal pero manteniendo estructura; 2, blandas y/o pérdida de estructura; 3, diarrea); sangre en heces (0, sin sangre; 1, sangre oculta; 2, sangre visible); incremento de peso corporal menor del 2% respecto a la semana anterior, +1. Cuando los animales alcanzaron un índice de actividad de la enfermedad comprendido entre 2.5 y 3.5 basándonos en la evaluación anteriormente descrita, pero principalmente en la observación del estado general del animal (presencia de prolapso rectal, encorvamiento, plegamiento de patas traseras al ser manipulado desde la cola, enrojecimiento-hinchazón mucosa ocular y bucal), se consideró instaurada una colitis clínicamente significativa y por tanto el momento óptimo para el comienzo del tratamiento farmacológico. Desde el comienzo del tratamiento, la evolución del peso corporal fue registrada diariamente. El sacrificio de los ratones se realizó 5 y 12 días después del comienzo del tratamiento, en función del grupo considerado.

## 2.2. Diseño experimental *in vivo*

Se han llevado a cabo experimentos *in vivo* utilizando tanto el modelo de colitis inducida por DSS, como el de transferencia linfocitaria, ambos en ratón.

### 2.2.1. Colitis aguda inducida por DSS

En el caso del modelo de colitis inducida por DSS se han realizado dos experimentos independientes, pero complementarios. En el primero de ellos, tras un periodo de aclimatación de 5 días, los ratones fueron distribuidos aleatoriamente en 7 grupos diferentes con un número de animales por grupo que oscila entre 4-5 dependiendo del grupo considerado, con objeto de realizar un estudio a modo de primera aproximación del efecto de la budesonida en dicho modelo, cubriendo un amplio rango de dosificación. De este modo, se dispusieron un grupo Control o no colítico, un grupo DSS o colítico no tratado, y grupos que recibieron DSS y budesonida (1, 3, 6, 12 y 60 µg/ratón/día) desde el día de inicio de la administración del DSS hasta el sacrificio (Esquema 1).



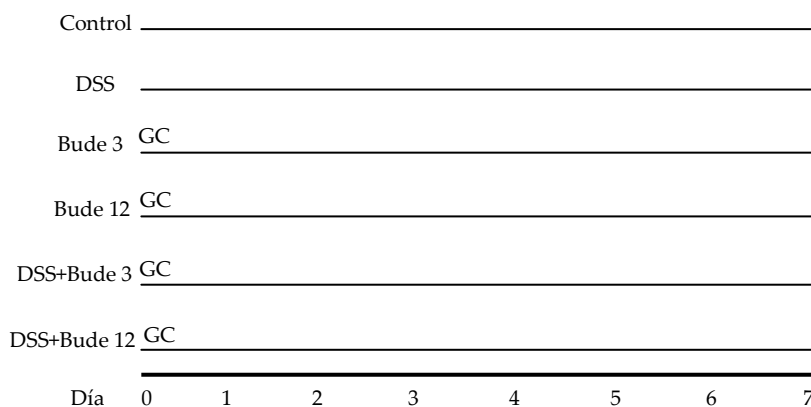
**Esquema 1:** Diseño experimental en el experimento de colitis aguda inducida por DSS denominado DSS1.

Diariamente se recogieron muestras de heces de cada grupo a lo largo de todo el protocolo experimental. Los animales fueron sacrificados secuencialmente dado que aquellos que recibieron budesonida sufrieron una pérdida de peso más temprana y notoria en términos cuantitativos de forma dosis dependiente. Por tanto, al sobrepasar claramente estos el 20% de pérdida de peso respecto al inicial, por cuestiones éticas y de calidad de los resultados a obtener de los ratones objeto de estudio se planificó su sacrificio. El grupo Bude 60 fue sacrificado en el día 6 del experimento, Bude 12 y Bude 6 en el día 7 y finalmente Bude 3, Bude 1, grupo control colítico (DSS) y grupo control sano en el día 8. Los animales fueron anestesiados mediante isoflurano, se les extrajo sangre mediante punción en la bifurcación aorto-femoral y seguidamente se les realizó la necropsia completa en campana de flujo laminar para la obtención de aquellos órganos de interés para su estudio posterior sin contaminación bacteriana externa (especialmente aquellos en los que se estudia la presencia de bacterias derivadas de translocación bacteriana en el contexto mesentérico). El colon por ser el más afectado en este modelo recibió especial atención, siendo fotografiado, pesado, medido bajo un peso constante de 2 g y sometido a una valoración macroscópica focalizada esencialmente en 2 parámetros. Fibrosis; 0 - no hay rigidez, 1 - Cierta

rigidez, 2 – Marcada rigidez. Hiperemia; 0 – aspecto normal, 1 – ligera o bien intensa y parcheada, 2 – intensa generalizada, 3 – hemorragia.

La administración de budesonida se realizó vía oral mediante sonda nasogástrica rígida utilizando un volumen de administración de 150  $\mu$ l y usando como vehículo metilcelulosa al 1% (P.V.<sup>-1</sup>) dada la escasa solubilidad de la budesonida en vehículos acuosos tradicionales. Además, 5 horas antes del sacrificio se administró a cada animal vía intraperitoneal 100  $\mu$ l de una solución de 10 mg/ml de 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU), con objeto de determinar la tasa de proliferación epitelial en virtud de la incorporación de esta molécula en las células epiteliales de la mucosa intestinal [5, 6].

En el segundo experimento (DSS2), la organización de los grupos y el diseño experimental fue similar con la salvedad de que se introdujeron de forma adicional 2 grupos no colíticos que recibieron budesonida, con objeto de testar la posible influencia de ésta en ratones no sometidos a proceso inflamatorio alguno. La distribución final de los grupos experimentales en este caso fue la siguiente; grupo control (N=6), grupo sano Bude 3 (budesonida 3  $\mu$ g/ratón/día) (N=6), grupo sano Bude 12 (budesonida 12  $\mu$ g/ratón/día) (N=7), grupo colítico DSS (N=8), grupo colítico Bude 3 (N=7) y grupo colítico Bude 12 (N=8) (Esquema 2).

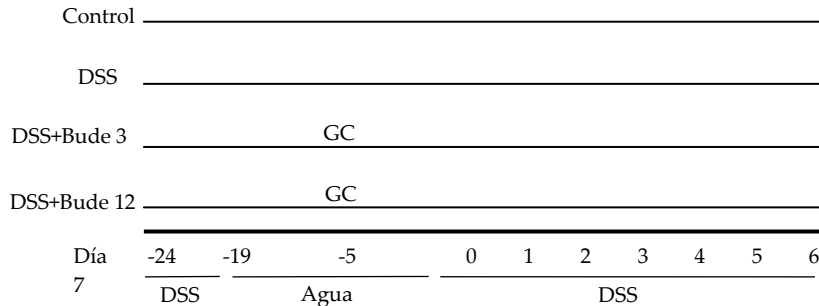


*Esquema 2:* Diseño experimental en el experimento de colitis aguda inducida por DSS denominado DSS2.

### 2.2.2. Colitis recurrente por DSS con exposición a budesonida previa al segundo ciclo

En este caso se trató de estudiar la influencia de la exposición inmunosupresora a budesonida exclusivamente administrada de forma previa a la inducción de la colitis, sobre la evolución posterior del proceso colítico. De esta forma, tras el período de aclimatación se sometió a los animales a un ciclo de DSS2.5% (P.V.<sup>-1</sup>) durante 5 días, tras el cual se les concedió 14 días de curación. En este momento es cuando se realiza la administración de la budesonida a 3 y 12  $\mu$ g/ratón/día durante un total de 5 días. Seguidamente se comienza con la administración de DSS2.5% (P.V.<sup>-1</sup>) durante 7 días sin administración de glucocorticoide (GC), momento en que los

animales son sacrificados siguiendo el procedimiento general antes descrito. La distribución de los grupos fue la siguiente; grupo control sano (N=6), grupo colítico DSS (N=7), grupo colítico Bude 3 (3µg/ratón/día) (N=7) y grupo colítico Bude 12 (12 µg/ratón/día) (N=8) (Esquema 3).

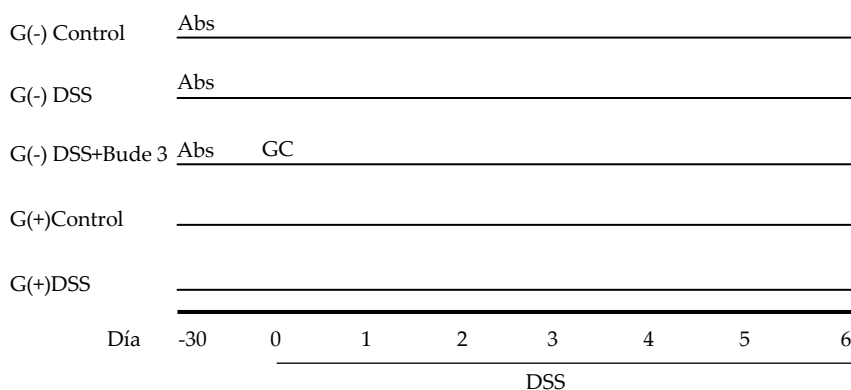


**Esquema 3:** Diseño experimental en el experimento de colitis inducida por DSS denominado DSS3.

### 2.2.3. Colitis aguda inducida por DSS en ratones pseudo-estériles

Con objeto de comparar las consecuencias de la administración de budesonida de forma concomitante al desarrollo de la colitis aguda inducida por DSS en condiciones estándar, con aquellas en las que el contenido del *lumen* intestinal está libre de microbiota comensal, se realizó la siguiente aproximación experimental.

Siguiendo el procedimiento de depleción de la microbiota intestinal anteriormente descrito, se consiguieron ratones que denominamos pseudoestériles debido a la depleción hasta niveles indetectables de microorganismos viables en su contenido fecal. A estos ratones se les indujo una colitis aguda por DSS durante 6 días, la cual se llevó en paralelo en ratones convencionales en términos microbiológicos. El protocolo se condujo durante 6 días debido a la severidad de la colitis en el grupo colítico carente de bacterias y tratado con budesonida, lo que obligó al sacrificio un día antes de lo planificado en un principio. Los grupos con depleción de bacterias comensales reciben la denominación de (G-), mientras que los estándar serán denominados como (G+).

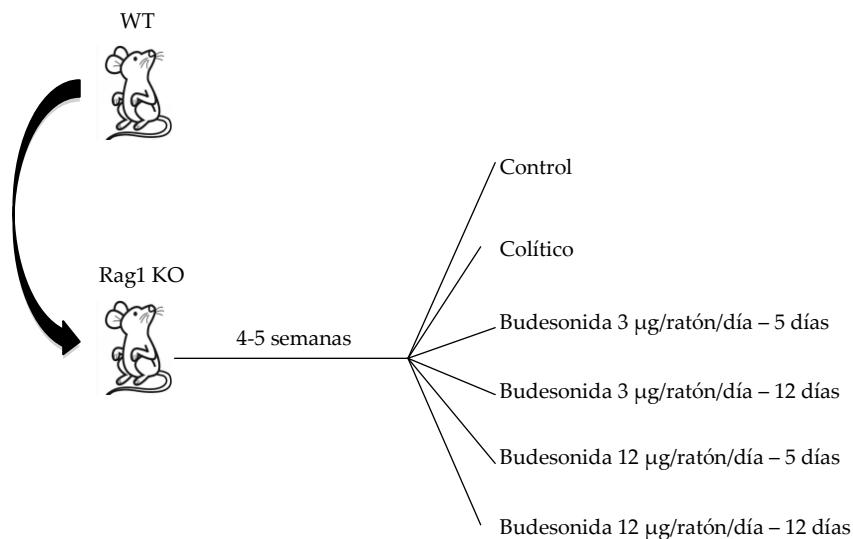


**Esquema 4:** Diseño experimental en el experimento de colitis aguda inducida por DSS en ratones pseudo-estériles denominado DSS-PGF.

Las condiciones experimentales fueron las siguientes; grupo control sano (G-) (N=8), grupo colítico DSS (G-) (N=8), grupo colítico DSS (G-) con budesonida 3  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$  (N=8), grupo control sano (G+) (N=8) y grupo colítico DSS (G+) (N=5). Transcurridos 6 días tras el inicio de la inducción colítica fueron sacrificados siguiendo el protocolo estándar ya descrito (Esquema 4).

#### 2.2.4. Modelo de colitis por transferencia linfocitaria en ratón

En el modelo de inducción de colitis por transferencia linfocitaria, tras la instauración de la colitis, los ratones fueron distribuidos en diferentes grupos, de modo que el valor medio de pérdida de peso y la afectación inflamatoria intestinal de estos fuera comparable entre ellos. La administración de budesonida (3, 12 y 60  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$ ) se realizó por vía oral con sonda nasogástrica rígida en un volumen de administración de 0.15 ml. Este tratamiento se extendió durante 5 o 12 días siendo este extremo indicado en cada caso. El vehículo utilizado, metilcelulosa al 1% (P.V. <sup>-1</sup>), fue administrado del mismo modo al grupo colítico control y al transferido con PBS (Esquema 5).



*Esquema 5:* Diseño experimental en el modelo de colitis por transferencia linfocitaria de células T CD4+ CD62L+.

En todos los experimentos se realizó un control diario del peso corporal y del estado general del animal. Concluido el protocolo experimental indicado, los animales fueron anestesiados con isofluorano, se les extrajo sangre de la bifurcación aorto-femoral y se sacrificaron por dislocación cervical. La necropsia posterior se realizó bajo condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar, permitiendo la obtención de los órganos objeto de estudio sin contaminación bacteriana externa. El órgano más afectado en este modelo es con gran diferencia el colon. Por ello, además de pesarlo y medirlo bajo un peso constante de 2 g, se le realizó un estudio macroscópico centrado fundamentalmente en la fibrosis y la hiperemia, siendo estos valorados como ya se ha detallado para el modelo de colitis inducida por DSS aunque teniendo presente que el tipo de afectación colónica es sustancialmente diferente (ver apartado 3.1.).

### 2.3. Caracterización de la inflamación en los modelos animales

El colon fue dividido en 3 segmentos longitudinales para la determinación posterior de diversos parámetros. De igual modo, se obtuvieron dos segmentos transversales situados aproximadamente a 1 cm del extremo distal para el estudio histológico y para la extracción de RNA, respectivamente. Las muestras de tejido colónico así obtenidas fueron congeladas en nitrógeno líquido y conservadas a -80°C hasta su uso, a excepción de la muestra obtenida para el estudio histológico (protocolo descrito en el siguiente apartado) y la de RNA que fue sumergida en *RNA later* y conservada a -20°C hasta su utilización. De la misma manera también se obtuvieron los segmentos de intestino delgado, en la mayoría de los casos íleon. El procesamiento fue exactamente el mismo que el descrito para colon.

En algunos casos, se aplicó un procedimiento clásico y frecuentemente usado en el campo de la gastroenterología experimental, que permite el aislamiento y purificación de diferentes poblaciones celulares de interés dentro del tejido intestinal de ratón. El método aplicado se detalla minuciosamente en un artículo publicado por Neurath *et al* en la revista *Nature Protocols* [7], aunque en este caso el que se siguió fue una adaptación del mismo, concretamente el utilizado por Mucida *et al* [8-11]. Dicha técnica permite mediante sucesivos procesos de digestión tisular controlada bajo agitación, el aislamiento independiente de las células epiteliales de la mucosa intestinal, los linfocitos intraepiteliales (IEL) y las células mononucleares de lámina propia, de forma que cada una de ellas por separado pueden ser sometidas a estudio mediante técnicas tan diversas como la citometría de flujo, cultivo celular convencional, el análisis de su expresión génica por PCR a tiempo real o proteica por Western Blot.

#### 2.3.1. Caracterización bacteriológica de los ganglios linfáticos mesentéricos (MLNs)

Con intención de caracterizar la integridad de la pared intestinal y la capacidad de esta para contener la carga bacteriana en el lumen intestinal bajo las diferentes condiciones experimentales ensayadas en este trabajo, se decidió analizar la presencia de bacterias en los MLN. Los ratones fueron sacrificados en el interior de una campana de flujo laminar para evitar que el órgano sufriera contaminación bacteriana externa. Los MLNs fueron extraídos del animal con material quirúrgico estéril, pesados manteniendo dicha esterilidad y homogenizados en 1 ml de Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) sin suplementación con ayuda de la parte posterior de una jeringa estéril de 5 ml. La caracterización bacteriológica de ese homogenado se realizó sembrando 50 µl del mismo en placas de Agar MacConkey y 100 µl en placas comerciales (Brucella Blood agar with Hemin and VitK1, Difco®), siendo el primero un medio específico para bacterias de la microbiota comensal por su contenido en sales biliares y el segundo uno muy rico para facilitar el desarrollo de bacterias anaerobias. Finalmente estas placas fueron incubadas a 37°C, durante 24 horas en aerobiosis en el primer caso, mientras que lo fueron durante 48 horas y en condiciones de anaerobiosis generadas con Anaerogen® 2.5l en el segundo. Los resultados son expresados como unidades formadoras de colonias log (CFU)\*10<sup>3</sup>/g tejido.

#### 2.3.2. Caracterización bacteriológica y cuantificación de LPS en hígado

Por la misma razón que nos indujo a evaluar la presencia de bacterias comensales viables en MLN, se decidió hacer lo propio en hígado, así como la presencia de antígenos altamente

conservados de éstas destacando el LPS. El procedimiento seguido es una adaptación del desarrollado por Sonnenberg *et al* [12]. En resumen, el hígado fue extraído en condiciones de esterilidad, pesado y un lóbulo completo homogenizado (1/3 P.V<sup>-1</sup>) en PBS estéril comercial (GIBCO®) preservando en todo caso las condiciones de esterilidad y de ausencia de pirógenos. A continuación, 50 µl de dicho homogenado fueron sembrados en placas de Agar LB y de Agar MacConkey, que posteriormente se cultivaron durante 24 horas a 37°C en condiciones de aerobiosis. Los resultados fueron expresados como log CFU/g tejido.

Por otro lado, el homogenado de hígado restante fue expuesto a ultrasonidos durante 45 minutos en un baño preparado para tal efecto. Con este paso aseguramos la lisis completa de las bacterias presentes. A continuación, el homogenado fue centrifugado a 10000 rpm/10 minutos/4°C y el sobrenadante recogido en un tubo estéril y libre de pirógenos.

En este sobrenadante se procede a la determinación de LPS mediante el siguiente procedimiento. En primer lugar, se hace una dilución 1/7.5 de la muestra en agua libre de pirógenos (Lonza®), conteniendo esta a su vez una dilución 1/200 de Pyrospense® (Lonza®). Dicha dilución es sometida a un calentamiento de 15 minutos a 70°C, paso tras el cual la muestra está lista para ser sometida a la determinación de LPS mediante el kit Lymulus Amebocyte Lysate (QCL-1000) (Lonza®), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los resultados fueron expresados como Unidades de Endotoxina (EU)/g de tejido.

### **2.3.3. Obtención del plasma sanguíneo**

La extracción de sangre se realizó en la bifurcación aorto-femoral en el momento del sacrificio de los animales. Se utilizó heparina como anticoagulante (5000 UI ml<sup>-1</sup>). La sangre fue sometida a una centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C para obtener el plasma. Las muestras fueron conservadas a -80°C hasta su posterior uso.

### **2.3.4. Análisis sanguíneo general**

Con objeto de evaluar diferentes parámetros de interés en sangre, tales como hemoglobina, hematocrito, células rojas, células blancas en general, linfocitos, monocitos y neutrófilos, una muestra de 30 µl de esta fue analizada en un contador hematológico (Mythic® 22CTC2 Diagnostics).

### **2.3.5. Determinación de la glucemia**

La determinación de la concentración de glucosa en la sangre heparinizada de los ratones se realizó justo tras el sacrificio de éstos, haciendo uso de tiras reactivas y un glucómetro comercial (Accu-Chek®, Aviva).

### **2.3.6. Determinación de la temperatura**

La temperatura de los ratones se determinó en la zona abdominal previamente rasurada para evitar la interferencia del pelaje. Para ello, se usó un termómetro por radiación infrarroja específicamente desarrollado para roedores (Bioseb®, Francia).



### 2.3.7. Estudio *in vivo* del estado inflamatorio general por imagen

Los ratones recibieron vía intraperitoneal 25 mg/kg del reactivo L-012 (120-04891) (8-amino-5-cloro-7-fenilpirido (3,4-d) piridazina-1,4-(2H, 3H) diona) (Wako®, Osaka, Japón) usando como vehículo 100 µl de agua destilada estéril [13, 14]. Inmediatamente después, fueron anestesiados con isoflurano y colocados en el interior de un IVIS Spectrum Caliper® LifeSciences. A continuación, se fueron capturando imágenes durante los siguientes 10-15 minutos, tiempo tras el cual la señal lumínica asociada a la presencia de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno con las que reacciona el reactivo administrado generando quimioluminiscencia, comienza a decaer.

### 2.3.8. Estudio histológico

Una de las secciones transversales de colon o longitudinales de pulmón obtenidas tras el sacrificio fue obtenida y conservada sumergiéndola en formaldehído al 4% (P.V<sup>-1</sup>). A continuación estas muestras se incluyeron en bloques de parafina para posteriormente realizar cortes de un grosor de 5 µm empleando un microtomo. Los cortes realizados fueron montados en portas y sometidos a una tinción de rutina con hematoxilina-eosina, que permite el estudio de la morfología, integridad y grado de infiltración del tejido objeto de estudio. Asimismo, los cortes fueron sometidos a una tinción a base de azul alcian y rojo nuclear, que permite conocer la actividad funcional de las células caliciformes en relación a la producción de mucinas y su liberación a la interfase epitelio – luz intestinal.

Un índice histológico específico fue establecido para cada modelo experimental utilizado. De este modo, los parámetros a valorar y la valoración propiamente dicha en referencia al índice histológico concreto en el modelo de colitis inducida por DSS fueron los siguientes; longitud de las criptas (0:2), infiltración leucocitaria (0:4), engrosamiento de la submucosa (0:2), erosión (0:2) y pérdida de estructura de las criptas (0:2). En el caso del modelo de colitis inducida por transferencia linfocitaria, los parámetros evaluados y su valoración fueron análogos a los descritos para el modelo del DSS. Las imágenes estudiadas se capturaron con un microscopio Leica DMI3000 B, con un aumento 10x en todos los casos y su valoración fue realizada de forma independiente y objetiva siguiendo un esquema de doble ciego.

Mediante inmunohistoquímica (IHC) siguiendo un protocolo de inmunodetección indirecta en dos etapas, se detectaron diferentes antígenos mediante el uso de anticuerpos específicos. En primer lugar las muestras se desparafinaron y rehidrataron mediante sucesivas incubaciones en xileno y posteriormente en etanol con un porcentaje decreciente (99%, 90% y 70%). A continuación se realizó la recuperación antigénica que para el marcaje de 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU) se realizó exponiendo a las secciones a una solución 2N de HCl durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente se aplicaron dos lavados específicos con borato 0.1M. Una vez enfriadas y lavadas las secciones, se bloquearon las peroxidasas endógenas con un tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en metanol durante 10 minutos (dos veces). A continuación, tras un lavado con agua corriente se realizó el bloqueo de zonas de unión inespecíficas con la solución incluida en el kit VECTASTAIN® Elite ABC, durante 1 hora. Posteriormente se añadió el anticuerpo primario; Anti-BrdU (1/50) desarrollado por el Dr. Stephen J. Kaufman (Developmental studies hybridoma bank, Iowa, EEUU) y la incubación se realizó a 4°C en atmósfera húmeda durante toda la noche. El día siguiente, las secciones fueron lavadas dos veces con TBS (Tris 50mM y NaCl 0.15M) y posteriormente se adicionó el anticuerpo secundario provisto por el kit VECTASTAIN® Elite ABC

durante 30 minutos. Finalizada dicha incubación se realizaron dos lavados en TBS e inmediatamente las secciones fueron reveladas usando el AEC Staining kit (Sigma-Aldrich®). Tras un lavado en agua corriente, se realizó la contratinción con hematoxilina de Mayer durante 1 minuto. Finalmente se procedió a la deshidratación progresiva de las secciones ya marcadas y teñidas, quedando preparadas para su montaje final. Las imágenes fueron capturadas con un microscopio Leica DMI 30008 con diferentes aumentos.

### 3. EXPERIMENTOS *EX VIVO*

#### 3.1. Cultivo de fragmentos de tejido colónico

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 en la totalidad del tejido intestinal objeto de interés, se realizó un cultivo de pequeños fragmentos de unos 0.5 cm de colon siguiendo el siguiente protocolo.

Tras el sacrificio del ratón, el colon en su totalidad fue procesado siguiendo el protocolo general antes descrito. En el caso de que se desee cultivar un fragmento de este, tras la apertura longitudinal y en el momento en que se recogen las muestras destinadas a la purificación de RNA desde el tejido total, se realizan dos cortes transversales en la zona próxima al extremo distal del colon. Dicho fragmento es dividido a su vez en dos partes de tamaño similar siendo cada uno procesado de ahora en adelante de forma paralela e independiente pero bajo las mismas condiciones experimentales. Para eliminar en la medida de lo posible microorganismos provenientes del contenido del lumen intestinal, los fragmentos son sumergidos durante al menos 15 minutos en una solución enriquecida en antibióticos (PBS, 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) inactivado (10% v/v), L-glutamina (2mM) y antimicrobianos (1% v/v: 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 CO<sub>2</sub> y a 37° C.

Para terminar, el fragmento de tejido colónico y el medio de cultivo fueron recogidos separadamente. El medio de cultivo fue centrifugado a 10000 rpm/5 min /4°C para eliminar restos de tejido y el sobrenadante fue conservado a -80°C hasta su utilización para la determinación de citoquinas por ELISA. Por otro lado, el fragmento de tejido rescatado del cultivo tras la incubación fue homogenizado en un volumen constante de 150 µl de PBS y el homogenado resultante centrifugado a 10000 rpm/10 minutos/4°C. Posteriormente este fue sometido a la determinación de concentración proteica por el método del ácido bicinchonínico (descrito detalladamente más adelante), con objeto de corregir el error que arrastraría esta técnica debido a la inevitable heterogeneidad de tamaño de los fragmentos. De este modo, los resultados podrán ser expresados en pg citoquina secretada/µg de proteína tisular.

#### 3.2. Estudio de la permeabilidad paracelular en tejido colónico distal

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 NaHCO<sub>3</sub>, 1.2

CaCl<sub>2</sub>, 1.2 MgCl<sub>2</sub>, 2.4 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.4 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, y 10 glucosa). Se hicieron montajes de tejido intacto sobre cámaras de Ussing con dispositivos de voltaje DVC-1000 (Word Precision Instruments, Aston, United Kingdom). Transcurridos 10-15 minutos del montaje del tejido se consiguió una estabilización en los valores de I<sub>sc</sub> (I<sub>0</sub>) y conductancia (G<sub>0</sub>), en ese momento se añadió FITC dextrano (MW 4000 Da) al reservorio de la cara apical del tejido a una concentración de 2.5 mg/ml. Se fueron tomando muestras de la solución Ringer de la cara basolateral cada 30 minutos durante 180 min. Tras la medida de la intensidad de la fluorescencia (excitación 490 nm; emisión, 520 nm; usando el fluorímetro FLUOstar-Control, Polarstar OPTIMA, BMG Labtech), la permeabilidad al FITC-dextrano se calculó haciendo uso de una curva de FITC dextrano disuelto en solución Ringer (1000–1 µg/ml) de la cual se obtuvieron los pertinentes valores de fluorescencia. Bajo las mismas condiciones de excitación, emisión y ganancia se obtuvieron valores de fluorescencia para cada uno de los fragmentos colónicos ensayados a cada uno de los puntos temporales de toma de muestra. Dichos valores, previa resta del valor de fluorescencia mostrado por la solución Ringer fresca, se interpolaron en la curva anteriormente obtenida y de este modo para cada caso se obtuvo un valor de FITC dextrano en la cara basolateral del tejido, el cual es expresado en µg/ml.

## 4. EXPERIMENTOS *IN VITRO*

### 4.1. Diseño experimental *in vitro*

En todos los experimentos *in vitro*, excepto en aquellos en los que se indica lo contrario, se siguió el mismo protocolo experimental. Las placas de cultivo utilizadas en todos los casos fueron de polipropileno con tratamiento superficial para células adherentes, las cuales fueron suministradas por Thermo Scientific NUNC™ (Roskilde, Dinamarca). Todos los GC fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO). La cantidad de DMSO añadida a los distintos grupos experimentales fue igualada, utilizando como concentración máxima una dilución 1:1000 para dicho disolvente en el medio de cultivo en contacto con las células. La concentración a la que fueron ensayados los diferentes GC osciló desde 0.1 nM hasta 10 µM dependiendo de las condiciones experimentales ensayadas en cada caso y del tipo de efecto que se deseaba testar. En cualquier caso, dicha concentración está expresamente indicada en cada uno de los experimentos que seguidamente se describirá. En el caso de aquellos experimentos en los que las células reciben una exposición al GC de forma previa a la recepción de un estímulo, este tratamiento previo osciló entre 4 y 12 horas dependiendo de cada experimento, siendo esto indicado en cada caso. Estas incubaciones se decidieron hacer más prolongadas de lo habitual, para tener instaurados con seguridad todos los efectos de estas moléculas, aquellos tempranos pero también los que son algo más diferidos en el tiempo como los derivados de la modificación del patrón de expresión génico al actuar el receptor de glucocorticoides (GR) como factor de transcripción. El tiempo de incubación posterior al estímulo principal en cuestión depende del tipo celular, la técnica y el objetivo perseguido en cada aproximación experimental, y por tanto, se especifica donde corresponde.

### 4.2. Cultivo de líneas celulares de enterocitos

De las tres líneas celulares de epitelio intestinal empleadas, dos de ellas, IEC18 (rata) y Caco-2 (humano) fueron obtenidas del Servicio de Cultivo Celular de la Universidad de Granada. Por su parte las IEC4.1 (ratón) fueron gentilmente cedidas por el Dr. Anthony Jevnikar de la University of Western Ontario. Como norma general, excepto donde se indique lo contrario, se empleó como

medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suplementado con suero fetal bovino (FBS) inactivado (10% v/v), L-glutamina (2mM), antibióticos (1% v/v: penicilina [100 U/ml], estreptomycin [0.1 mg/ml] y anfotericina B [2.5 µg/ml]). Los diversos cultivos se mantuvieron en una atmósfera con el 5% de CO<sub>2</sub> y a 37° C. De forma rutinaria las células fueron mantenidas en placas de 78 cm<sup>2</sup> hasta su confluencia y el medio de cultivo renovado cada 2-3 días. La exposición previa a GC, los estímulos empleados y los tiempos de incubación en cada caso son descritos en el apartado correspondiente.

### **4.3. Estudio del efecto de los glucocorticoides sobre la sensibilidad de células epiteliales intestinales a LPS**

Las líneas celulares de epitelio intestinal IEC4.1 e IEC18 fueron cultivadas en DMEM hasta un 80-90% de confluencia, momento en que fueron expuestas a budesonida, dexametasona, prednisolona e hidrocortisona a concentraciones que oscilan desde 0.1 nM hasta 1 µM, durante 12 horas. Seguidamente, se refrescó el medio en todos los casos y manteniendo la presencia del GC en cuestión se realizó la estimulación con lipopolisacárido (LPS) 1 µM, incubándose bajo estas condiciones durante 24 horas. El medio de cultivo fue recogido y centrifugado, para posteriormente conservar el sobrenadante a -80°C hasta su utilización para la determinación de citoquinas por enzimo-inmunoensayo (ELISA).

En el caso del experimento que trata de dilucidar si la exposición a GC de las células IEC4.1 e IEC18 exclusivamente previa a la adición de LPS modifica la sensibilidad de las mismas a dicha sustancia, las células recibieron los GC durante 4 días antes de la adición de LPS. Antes de añadir el LPS a los cultivos, se realizaron tres lavados con PBS para eliminar cualquier resto de GC que pudiera quedar. Una vez añadido el estímulo las células fueron incubadas durante 24 horas.

### **4.4. Estudio del efecto de los glucocorticoides de forma directa e indirecta sobre la respuesta a R-spondin-1 (RSPO1) en células epiteliales intestinales IEC4.1**

*Estudio directo:* Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos y crecidas hasta un 80-90% de confluencia. En ese momento se repuso medio fresco y adicionaron los GC a una concentración de 1 µM, siendo las células incubadas durante 6 horas bajo esas condiciones. Transcurrido ese período, las células recibieron RSPO1 (R&D Systems®, Abingdon, Reino Unido) de ratón (100 ng/ml) amablemente cedido por los Dres. Gil y Fontana de la Universidad de Granada. Posteriormente, fueron incubadas durante 24 horas para finalmente retirar el medio de cultivo, lavar las células con PBS frío y posteriormente procesarlas hasta su análisis por Western Blot.

*Estudio indirecto:* En primer lugar se obtuvo el medio condicionado por células IEC4.1 previamente expuestas a GC. Para ello se sembraron en placas de Petri de 150 mm de diámetro con objeto de obtener un volumen de medio condicionado relativamente elevado. Estas se incubaron en DMEM convencional hasta un 80-90% de confluencia, momento en que recibieron los GC a 1 µM, exposición que se mantuvo durante 48 horas. Tras esto, se procedió a la retirada del medio de cultivo y su renovación con DMEM libre de FBS manteniendo los GC. En estas condiciones se incubaron las células durante toda la noche. El día siguiente a primera hora, se realizaron 12 heridas en vertical y 8 heridas en horizontal en la monocapa celular con una punta de 200 µl estéril, esta fue sometida a dos lavados con Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) para eliminar restos

celulares y el medio fue renovado con DMEM libre de FBS y manteniendo al exposición a GC. Las células fueron incubadas bajo estas condiciones durante 6 horas, período tras el cual el medio se retiró, se realizaron dos lavados con HBSS y se repuso con 30 ml de DMEM libre de FBS y carente ya de GC. Las células se incubaron bajo estas condiciones durante 72 horas sin cambio de medio con objeto de permitir un condicionamiento significativo del mismo. Finalmente este fue recogido, centrifugado a 10000 rpm/10 min/4°C y usado sin sufrir proceso de congelación alguno sobre células IEC4.1 del modo que se describe a continuación.

De forma independiente a lo anterior, células IEC4.1 fueron sembradas en placas de 6 pocillos, incubadas hasta un 90% de confluencia en DMEM y sometidas a deprivación de FBS mediante una incubación durante toda la noche en DMEM libre de este. En este momento, se sustituyó el medio de cultivo por el medio condicionado cuya generación ya se ha descrito, siendo este condicionado por células no expuestas a GC o expuestas a cada uno de forma independiente a una concentración de 1  $\mu$ M. En ese momento se adicionó el RSPO1 (100 ng/ml) en los pocillos correspondientes y las células fueron incubadas durante 24 horas. Finalizado dicho período, las células fueron lavadas con PBS frío y recogidas para su posterior análisis por Western Blot.

### 4.5. Cultivos primarios de células mononucleares

Tras el sacrificio de los animales, se extrajo el bazo y/o ganglios linfáticos mesentéricos (MLNs) que fueron dispuestos en medio de cultivo DMEM, suplementado con L-glutamina (2mM), antibióticos (1% v/v: penicilina [100 U/ml], estreptomycin [0.1 mg/ml] y anfotericina B [2.5  $\mu$ g/ml]). Una vez eliminada la grasa adherida a dichos órganos, éstos fueron presionados mecánicamente con la parte posterior del émbolo de una jeringa de 5 ml estéril, con objeto de desorganizar la estructura del órgano y obtener una suspensión celular. La lisis de los eritrocitos fue realizada durante 1-3 minutos a temperatura ambiente resuspendiendo las células en un tampón de lisis comercial. Posteriormente estas fueron rápidamente lavadas para evitar daño celular alguno y filtradas para obtener una suspensión monocelular y eliminar restos del órganos de procedencia utilizando un filtro de 70  $\mu$ M (cell strainer BD Falcon™ Ref 352350). Las células mononucleares aisladas se dispusieron en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino (FBS) (10%), L-glutamina (2mM), antibióticos (1% v/v: penicilina [100 U/ml], estreptomycin [0.1 mg/ml] y anfotericina B [2.5  $\mu$ g/ml]) y 50  $\mu$ M de  $\beta$ -mercaptoetanol.

A continuación, se procedió al conteo celular mediante el empleo de una solución de azul tripán al 0.4% (P.V<sup>-1</sup>). Seguidamente, 0.5 millones de células fueron sembradas en placas de 24 pocillos o 1 millón en placas de 12 pocillos, pero en cualquier caso manteniendo siempre una densidad celular de 1 millón de células/ml. En el caso de la inclusión de GC directamente en el cultivo, las células fueron expuestas a estos durante 6 horas antes de recibir cualquier estímulo y mantenidos durante la incubación tras ser estimuladas. El cultivo se realizó durante 48 horas en una atmósfera de CO<sub>2</sub> (5 %) y a 37°C, empleándose como estímulos la lectina concanavalina A (Con A) (5  $\mu$ g/ml), LPS (1  $\mu$ g/ml), peptidoglicano (PGN) (1  $\mu$ g/ml), CpGDNA (1  $\mu$ M) y Flagelina (100 ng/ml), siendo estos tres últimos suministrados por (Hycult Biotech®, Holanda). Las muestras de medio de cultivo obtenidas fueron centrifugadas a 10000 rpm/5 min/4°C y conservadas a -80°C hasta su posterior utilización para la determinación de citoquinas por ELISA.

#### 4.6. Purificación celular magnética

Para la obtención de poblaciones purificadas de linfocitos T CD4+ y células dendríticas (DCs), se empleó el sistema de separación magnética en columnas (Miltenyi Biotec®, Bergisch Gladbach, Alemania). Una vez obtenida la suspensión heterogénea de células de bazo a separar siguiendo el procedimiento habitual ya detallado, esta suspensión fue filtrada utilizando un filtro de 70 µM (cell strainer BD Falcon™ Ref 352350), para obtener así una suspensión celular homogénea con la que poder proceder a la separación.

En el caso de la purificación de linfocitos T CD4+ se usó el CD4+ T cell Isolation Kit II (130-095-248) (Miltenyi Biotec®, Bergisch Gladbach, Alemania) siguiendo el protocolo del fabricante y añadiendo mouse Fc-Block Anti-CD16/CD32 (eBiosciences®, San Diego, CA, EEUU) a una dilución 1/500 conjuntamente con el “cocktail” de anticuerpos del kit, mediante el cual se realiza una purificación negativa de estas células en la medida que el resto de componentes celulares son marcados y retenidos en el seno de las columnas LS (130-042-401) usadas en este caso, obteniéndose la población T CD4+ purificada en la fracción no retenida en la columna. Por otra parte, las DCs fueron obtenidas usando el kit CD11c Microbeads Mouse (N418) (Miltenyi Biotec®, Bergisch Gladbach, Alemania) siguiendo el protocolo del fabricante y usando mouse Fc-Block Anti-CD16/CD3 del mismo modo antes descrito. En este caso se trata de un procedimiento de selección positiva en el que las DCs son retenidas en una columna LS en virtud de su expresión específica (al menos en ratón) de CD11c, para posteriormente ser liberadas de dicha columna por elución mecánica. La pureza de la población obtenida en cada caso fue comprobada mediante citometría de flujo utilizando un FACSCalibur™ (BD Biosciences®, California EEUU). En el caso de los linfocitos T CD4+ estas fueron marcadas con el anticuerpo PE-CD4 (1/200), mientras que las DCs lo fueron con PercP-CD11c (1/150), respectivamente, todos obtenidos de BD Biosciences®. La pureza obtenida en todos los casos fue de alrededor del 90% (ver apartado correspondiente de resultados).

Las células T CD4+ fueron sembradas en placa de 96 pocillos a una densidad de 2 millones/ml utilizando como medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con L-glutamina (2mM), antibióticos (1% v/v: penicilina [100 U/ml], estreptomycin [0.1 mg/ml] y anfotericina B [2.5 µg/ml]) y 50 µM de β-mercaptoetanol y sin FBS. Posteriormente fueron expuestas a GC durante 6 horas a la concentración indicada, estimuladas con IL23 (130-096-676) (Miltenyi Biotec®, Bergisch Gladbach, Alemania) (50 ng/ml) y finalmente incubadas durante 48 horas. Por su parte las DCs fueron sembradas en las mismas condiciones que las descritas para las T CD4+ recibiendo similar exposición previa a GC. Posteriormente fueron estimuladas con IL23 (50 ng/ml) y CpGDNA 1 µM e incubadas durante 48 horas. Finalmente, el medio de cultivo fue centrifugado y los sobrenadantes conservados a -80°C hasta su posterior utilización para la determinación de citoquinas por ELISA.

#### 4.7. Cultivo de células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón

Para la obtención de células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón (BMDCs) se hizo uso de ratones C57BL6/J de 8-14 semanas de edad y se siguió una adaptación del protocolo desarrollado por Lutz *et al* [15] y por el Dr. Steiner quien instruyó al doctorando en las cuestiones prácticas de esta técnica durante la estancia que desarrolló en la University of British Columbia (Vancouver, British Columbia, Canadá) [16]. Estos fueron sacrificados por dislocación cervical y se les extrajo el fémur y la tibia de ambas patas traseras. Desde este momento todo el protocolo se

realizó en campana de flujo laminar y con material quirúrgico esterilizado, procediéndose a la limpieza exhaustiva de los huesos con objeto de eliminar restos de músculo adherido. Seguidamente se sumergen los huesos aún completos en etanol 70% (v/v) durante 1 minuto, para posteriormente lavarlos repetidamente en RPMI-1640 con objeto de eliminar restos del alcohol. En este momento se ha de preparar 45 ml de RPMI-1640 suplementado con FBS inactivado 10%, L-glutamina (2mM), antibióticos (1% v/v: penicilina [100 U/ml], estreptomicina [0.1 mg/ml] y anfotericina B [2.5 µg/ml]) y 50 µM de β-mercaptoetanol, por cada pareja de fémur y tibia de la cual vayamos a extraer la médula ósea, se cortan los extremos de ambos huesos con tijeras quirúrgicas quedando expuesta la médula ósea, de modo que ya se puede realizar la elución mecánica de ésta. Usando una jeringa de 10 ml cargada con el medio antes citado, acoplada a una aguja de 25 G, se introduce esta última en uno de los orificios de la médula ósea que hemos dejado expuestos y se va haciendo pasar el medio de cultivo por el interior del hueso. Con los 45 ml de medio de cultivo preparados por cada pareja de fémur y tibia es suficiente para realizar la elución completa de ambas médulas óseas sobre un único tubo de 50 ml receptor.

Para conseguir la diferenciación selectiva hacia células dendríticas, así como el enriquecimiento deseado en dicho tipo celular, se suplementa el medio de cultivo con *recombinant murine Granulocyte Colony Stimulating Factor* (rm GM-CSF) (Immunotools®, Friesoythe, Alemania) a una concentración de 40 ng/ml. Dicha suspensión celular fue distribuida homogéneamente en tres placas Petri bacteriológicas e incubadas bajo estas condiciones durante 7 días. En los días 3 y 5 de cultivo, se renueva el 50% del medio de cultivo de cada placa, recuperando las células arrastradas en el medio retirado por centrifugación, las cuales vuelven al cultivo en el medio fresco adecuadamente suplementado.

Concluida la diferenciación, la BMDCs son recogidas pipeteando repetidamente con pipeta serológica, contadas haciendo uso de una solución de azul tripán al 0.4% (P.V<sup>-1</sup>) y sembradas en placas de 24 pocillos a una densidad de 1 millón/ml en RPMI-1640 suplementado con L-glutamina (2mM), antibióticos (1% v/v: penicilina [100 U/ml], estreptomicina [0.1 mg/ml] y anfotericina B [2.5 µg/ml]) y 50 µM de β-mercaptoetanol. En este momento las células fueron expuestas durante 6 horas a los GC ensayados en cuestión, para luego ser estimuladas con LPS 1 µg/ml, PGN 1 µg/ml y CpGDNA 1µM e incubadas durante 48 horas. Los sobrenadantes de dichos cultivos fueron centrifugados a 10000 rpm/5 min/4°C y conservados a -80°C hasta ser utilizados para determinar citoquinas por ELISA.

#### **4.8. Ensayo de permeabilidad epitelial *in vitro***

La función barrera epitelial puede ser monitorizada *in vitro* mediante el estudio de la permeabilidad paracelular a FITC-dextrano (MW 4000 Da). En este caso sembramos las células epiteliales intestinales, IEC4.1, IEC18 y CACO-2, sobre membranas de policarbonato usando DMEM en los volúmenes recomendados por Transwell™ (Corning Life Sciences®, Nueva York, EEUU). El medio de cultivo se renovó a partir del cuarto día tras la siembra a fin de garantizar la adherencia de las células a la membrana y a partir de entonces se renovó cada dos días. Tras comprobar la confluencia de las células mediante la medición de la resistencia transepitelial (TEER) (ver apartado 4.9), se procedió al desarrollo del siguiente protocolo experimental. Se realizó un tratamiento con el GC en cuestión a una concentración de 1 µM durante 48 horas, tanto en la cara apical como la basolateral de la monocapa epitelial. A continuación se añade FITC-dextrano a 1

mg/ml en la cara apical de la monocapa epitelial en medio DMEM sin rojo fenol. Este momento fue considerado como tiempo 0 y a partir de entonces se retiraron 55  $\mu$ l a modo de muestra de la cara basolateral cada 30 minutos durante un total de 7 horas. Finalmente, la intensidad de la fluorescencia de cada muestra fue determinada (excitación 490 nm; emisión, 520 nm; FLUOstar-Control, Polarstar OPTIMA, BMG Labtech). El flujo paracelular fue calculado como el cambio relativo comparado con la señal de fluorescencia ofrecida por el grupo control.

#### 4.9. Medición de la resistencia transepitelial (TEER)

La resistencia eléctrica transepitelial (TEER), es un indicador de la confluencia celular y de la integridad de la monocapa. Asimismo, se emplea para controlar si las células se encuentran polarizadas y/o diferenciadas, ya que ésta se ve incrementada en estos casos [17]. Su valor se determinó con un EVOM2 Epithelial Voltohmmeter, (World Precision Instruments), que mide el potencial de membrana y la resistencia de las células epiteliales en cultivo. Las células empleadas en los ensayos fueron IEC4.1, IEC18 y CACO-2. Estas fueron sembradas en membranas de policarbonato usando DMEM en los volúmenes recomendados por Transwell™ (Corning Life Sciences®, Nueva York, EEUU). El medio de cultivo se repuso fresco cada dos días a partir de la siembra. La TEER se determinó antes de la renovación del medio comenzando transcurridos 4-5 días de la siembra de las células y continuando hasta el final de la experiencia, en cada momento en que se realiza una renovación del medio de cultivo o un cambio de condiciones experimentales. Las unidades en que se expresa el valor obtenido son  $\Omega/\text{cm}^2$ .

#### 4.10. Ensayo de invasión bacteriana sobre células epiteliales intestinales

Las células epiteliales intestinales usadas fueron, IEC4.1 e IEC18, siendo sembradas y cultivadas en DMEM convencional bajo las condiciones generales antes especificadas. Las cepas bacterianas utilizadas, por su parte, fueron *E. Coli* K12 y LF82 que fueron amablemente cedidas por la Dra. Arlette Darfeuille Michaud. En nuestro laboratorio las transformamos para que expresaran constitutivamente la proteína verde fluorescente (GFP). Estas fueron cultivadas frescas para cada experimento en LB broth a 37°C, agitación y con gentamicina (20  $\mu$ g/ml) como presión selectiva, durante toda la noche previa a la realización del mismo. El protocolo seguido en este enfoque experimental fue el siguiente. En primer lugar, las células epiteliales intestinales fueron sembradas en placas de 12 pocillos y cultivadas hasta confluencia. A continuación, recibieron la exposición al GC en cuestión durante 24 o 48 horas en DMEM convencional. Seguidamente, las monocapas fueron lavadas, para posteriormente colocar DMEM sin antibióticos conteniendo la cepa bacteriana a una multiplicidad de infección (MOI) de 100 bacterias por cada célula epitelial, siendo incubadas bajo estas condiciones durante 4 horas. Seguidamente, ese medio fue retirado y las monocapas celulares lavadas tres veces con *Hank's balanced salt solution* (HBSS). Para minimizar en la medida de lo posible la presencia de bacterias adheridas a la superficie celular, dado que nuestro objetivo era detectar aquellas que se localizan en el interior de estas tras haberlas infectado, las monocapas fueron expuestas durante 1 hora a DMEM conteniendo kanamicina (100 mg/l), estreptomycin (500 mg/l) y penicilina (500 mg/l). Para terminar, las células fueron lavadas tres veces más con HBSS y recogidas mediante tripsinización. Finalmente, las éstas fueron analizadas haciendo uso de un citómetro de flujo FACSCalibur™ (BD Biosciences®, California EEUU), considerándose como célula infectada aquella que apareciera como evento positivo dentro del canal FL1 en el que emite la GFP tras ser adecuadamente excitada. De este modo, los resultados son expresados como



porcentaje de células infectadas respecto del total, en virtud de su señal relativa dentro del canal FL1-GFP respecto del total [18].

#### **4.11. Ensayo de curación de herida epitelial in vitro**

Las células epiteliales intestinales IEC4.1 fueron sembradas en placas de 12 pocillos e incubadas hasta un 90% de confluencia en DMEM convencional. En este momento se sustituyó el medio por DMEM con FBS 1% (v/v) conteniendo los GC a la concentración indicada en cada caso y fueron incubadas durante toda la noche. A la mañana siguiente, se realizan tres heridas horizontales en cada pocillo para obtener un número elevado de campos objeto de estudio haciendo uso de puntas de pipeta de 10  $\mu$ l (Corning Life Sciences®, Nueva York EEUU), se lavan las monocapas en dos ocasiones con HBSS para eliminar los restos celulares para posteriormente adicionar DMEM FBS 1% (v/v) conteniendo los GC donde corresponde. Seguidamente se adicionaron los factores de crecimiento en los pocillos correspondientes, IL22 (100 ng/ml) y Keratinocyte growth factor (KGF) (50 ng/ml) ambos suministrados por (Immunotools®, Friesoythe, Alemania) e IL27 (50 ng/ml) (R&D Systems®, Abingdon, Reino Unido), siendo considerado este como tiempo 0. Inmediatamente se capturaron imágenes de las heridas que van a ser sometidas a seguimiento y su evolución fue monitorizada a lo largo de 12-20 horas dependiendo de cada aproximación experimental, siendo escogido como punto final del experimento aquel en el que la herida estudiada más avanzada en su curación estuviera próxima a cerrarse. Las imágenes estudiadas se capturaron con un microscopio Leica DMI3000 B, con un aumento 10x en todos los casos y fueron procesadas para la cuantificación del área curada durante la evolución del experimento mediante el programa informático Image J. Los resultados son expresados de forma relativa al área curada por las células que no recibieron exposición a GC ni factor de crecimiento alguno.

## **5. TÉCNICAS GENERALES**

### **5.1. Determinación de la actividad mieloperoxidasa y fosfatasa alcalina en colon**

Una de las muestras de colon obtenidas tras el sacrificio del animal fue homogenizada en un tampón compuesto por Tris Base (50 mM) y HTAB al 0,5% (P.V<sup>-1</sup>). Una vez centrifugado el homogenado, el sobrenadante resultante fue empleado para la determinación de actividades enzimáticas en colon. La determinación de la actividad mieloperoxidasa (MPO), utilizada como marcador de infiltración neutrofílica, se llevó a cabo mediante un método espectrofotométrico basado en el uso de o-dianisidina en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [19]. Los resultados fueron expresados como mUnidades/mg de proteína. Igualmente, la actividad fosfatasa alcalina (AP) fue determinada usando para ello un método espectrofotométrico descrito por Sánchez de Medina *et al* en el cual el sustrato de la reacción catalizada por dicha enzima es el p-nitrofenilfosfato sódico [20]. Los resultados se expresan igualmente como mU/mg de proteína.

### **5.2. Cuantificación de la sangre oculta en heces**

El modelo de colitis inducida por DSS se caracteriza por un profuso sangrado rectal siendo este uno de los factores decisivos en la severidad del proceso colítico. Por tanto, se aplicó el siguiente método espectrofotométrico adaptado del desarrollado en un principio por el Dr. Donald S. Young [21] para la cuantificación de esta en heces. Brevemente, las heces fueron homogenizadas en agua

destilada ultrapura (EIA Grade Ultra Pure Water, SpiBio, Reino Unido) a una proporción de 0.105 mg de heces/ $\mu$ l. Se seleccionó una alícuota de 200  $\mu$ l representativa del total de dicho homogenado, la cual se llevó a un tubo de 15 ml y se incubó a 100°C en baño hirviendo durante 10 min para degradar las peroxidasa derivadas de la dieta presentes en las heces. A continuación, se dejó enfriar brevemente para posteriormente añadir 1.2 ml de una mezcla en proporción (30/70) de ácido acético glacial y agua destilada respectivamente. Seguidamente, se añadieron 1.8 ml de acetato de etilo puro sobre la anterior mezcla, se agitó y centrifugó a 2500 rpm/3 min/temperatura ambiente. Finalmente, se recogió la fase superior y se la hizo reaccionar con 3,3', 5, 5' tetrametilbenzidina en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La actividad peroxidasa endógena del grupo hemo de la hemoglobina sanguínea realiza la conversión de dicha molécula generando una coloración espectrofotométricamente mensurable a 660 nm. Paralelamente se usa como referencia una curva de hemoglobina generada en agua destilada y que se somete al protocolo arriba descrito desde el primero de los pasos. Los resultados son expresados como mg Hemoglobina/mg de heces.

### 5.3. Determinación de nitratos y nitritos en plasma

Dada la asociación entre una elevación de los niveles de nitratos/nitritos en plasma derivados de un aumento de la presencia de NO, con la reacción inflamatoria sistémica típicamente asociada a la septicemia, se aplicó un protocolo basado en la reacción de Griess [22] para la cuantificación de éstos en plasma. Brevemente, en primer lugar se realiza la conversión de todos los nitratos presentes hacia nitritos, ya que la reacción de Griess solo es sensible a éstos. Posteriormente, los nitritos así generados fueron cuantificados espectrofotométricamente mediante una reacción en presencia de sulfanilamida 1% (p/v), naftiletileno diamina dihidrocloruro 0.1% (p/v) y H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 2.5% (p/v), mediante la cual se genera un producto coloreado detectable a 540 nm. Paralelamente se realizó una curva patrón generada con nitrito sódico. Los resultados son expresados en concentración  $\mu$ M.

### 5.4. Determinación de la secreción de citoquinas en sobrenadante de cultivo celular/tisular o en plasma mediante ELISA

Tras el cultivo de los distintos tipos celulares, el sobrenadante obtenido fue centrifugado a 10.000 rpm para eliminar los restos celulares y conservado a -80° C hasta su utilización. Diversos kit comerciales fueron empleados para la cuantificación de las citoquinas en dichos sobrenadantes mediante la técnica de ELISA. En todos los casos se siguieron estrictamente las instrucciones recomendadas por el fabricante. Los kit empleados fueron suministrados por eBiosciences®, San Diego, CA, EEUU (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL17A, IL6, IL22, IL27, GM-CSF e IL18, todos ellos de ratón), R&D Systems®, Abingdon, Reino Unido, (CXCL1/KC y Dickkopf-related protein 1 (Dkk1), ambos de ratón) y Enzo® LifeSciences Inc, Nueva York, EEUU (Corticosterona). En general, los resultados se expresan como pg/ml o en pg/ $\mu$ g proteína en el caso de explantes colónicos.

### 5.5. Extracción y cuantificación del contenido proteico

Las tejidos de origen murino o de cultivo celular fueron sometidos a homogenización mecánica en tampón de lisis (RIPA) frío compuesto por sodium dodecyl sulfate (SDS) 0.1%, desoxicolato sódico 0.1% y Tritón X-100 1% en PBS, conteniendo inhibidor de proteasas comercial (Sigma-Aldrich, P8340) en una proporción de 1/200 e inhibidor de fosfatasa (SC-45045, Santa Cruz

Biotechnology®, Dallas, Texas, EEUU) en una proporción de 1/100. Seguidamente el homogenado se expuso a ultrasonidos para forzar la completa lisis celular y finalmente se sometió a centrifugación a 10.000 rpm/10 min/4°C con objeto de eliminar los restos celulares. El sobrenadante obtenido que contiene la totalidad de las proteínas celulares fue conservado a -80°C hasta su utilización para el estudio de expresión proteica. El contenido proteico total fue cuantificado mediante el método del ácido bicinchonínico [23], empleando albúmina sérica bovina como estándar.

### 5.6. 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 100°C durante 5 minutos. Tras la separación de las proteínas mediante electroforesis en gel de acrilamida, éstas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa 0.25 µm (GE Healthcare Lifesciences®, Pittsburgh, PA, EEUU). Estas 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 usados y sus diluciones empleadas fueron: β-Actina (1/1500) y caspasa-7 (1/1000) (Abcam®, Cambridge, Reino Unido); iNOS (1/1000), PCNA (1/1000) y eNOS/NOS (1/1000) (BD Biosciences®, California, EEUU); β-Catenina (1/3000) (C2206, Sigma-Aldrich®); Claudina-4 (1/500) (Invitrogen®, Life Technologies); fosfo-eNOS, fosfo-GSK3β, GSK3β, fosfo-β-catenina, fosfo-LRP6, LRP6, fosfo-Akt y Akt (Cell Signaling®) todos ellos usados a una dilución de 1/1000; BCL-2 (1/500) y BAX (1/1000) (eBiosciences®, San Diego, CA, EEUU) y caspasa-3 (1/1000) (MBL®, Woburn, MA, EEUU). Todos estos anticuerpos fueron diluidos en TBS-T con albúmina sérica bovina al 5% (m.V<sup>-1</sup>), excepto fosfo-LRP6 y GSK3β que lo fueron en leche en polvo desnatada al 5% (m.V<sup>-1</sup>) en TBS-T. Como control de carga genérico se usó la expresión de β-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 90 minutos al anticuerpo secundario de la especie apropiada según el anticuerpo primario empleado, estando este conjugado con una enzima peroxidasa, de modo que 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 programa Image J.

### 5.7. Extracción de RNA y reacción de retrotranscripción

El RNA total de las distintas muestras fue obtenido usando TriReagent® (Ambion®, Life Technologies), siguiendo para ello las recomendaciones del fabricante. En el caso de muestras provenientes de animales tratados con DSS, es necesario eliminar los restos de este arrastrados conjuntamente con el RNA [24], debido a la interferencia que este causa en la eficiencia de la DNA polimerasa y el consecuente perjuicio que ello implica en la eficacia y fiabilidad de la PCR a tiempo real. Por tanto, tras la obtención del RNA este fue precipitado con LiCl 4M, incubado durante toda una noche a -20°C y posterior centrifugado a 15000 rpm/45minutos/4°C. El sobrenadante es descartado de modo que el RNA precipitado ya puede ser utilizado para la reacción de retrotranscripción. La cuantificación del contenido 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. Una cantidad total de 1 µg de RNA por muestra fue retrotranscrito para la obtención del DNA complementario, mediante el empleo de la enzima transcriptasa inversa según las indicaciones del fabricante del kit empleado (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.

### 5.8. Análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real

La reacción en cadena de la polimerasa fue realizada usando Sybr Green como fluoróforo (iQ™ SYBR® Green Supermix, Biorad Laboratories, California, EEUU) para el análisis de la expresión de diversos genes. Los genes de referencia elegidos fueron generalmente la subunidad 18 S del RNA ribosómico y la hipoxantina-guanina-fosforribosil transferasa (HPRT), siendo generalmente el promedio de la expresión de ambos empleado como control de carga en los distintos experimentos. Los cebadores empleados en cada caso vienen detallados en la Tabla 2, teniendo en cuenta que en todos los casos la especie de interés fue el ratón.

### 5.9. 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 un citómetro de flujo FACSCalibur™ (BD Biosciences®, California EEUU). 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, BSA 2 % (m.V<sup>-1</sup>), EDTA 10 mM, Azida 0.1% (m.V<sup>-1</sup>)). Seguidamente se les realizó el marcaje de moléculas superficiales mediante anticuerpos específicos, todos ellos suministrados por BD Biosciences® (California, EEUU) a diluciones que oscilan entre 1/100 y 1/200, excepto el anti-mouse  $\delta$ TCR-FITC (eBiosciences®, San Diego, CA, EEUU) que en su caso fue usado a una dilución de 1/150. En la misma solución de marcaje se incluye mouse Fc-Block Anti-CD16/CD32 (eBiosciences®, San Diego, CA, EEUU) a una dilución de 1/500. Transcurridos 30 minutos de exposición a anticuerpos superficiales a 4°C, las células fueron lavadas y fijadas en PBS-paraformaldehído al 2 % (m.V<sup>-1</sup>) durante 10 minutos/4°C, lavadas una vez y finalmente resuspendidas en tampón de marcaje hasta su adquisición.

En el caso de necesidad de marcaje intracitoplásmico las células fueron estimuladas durante 4 horas con forbol-12-miristate-13-acetato (PMA) e ionomicina a las concentraciones recomendadas por el kit que se usa a continuación con bloqueo del aparato de Golgi concomitante. Una vez realizado el marcaje superficial, las células fueron permeabilizadas usando el kit BD Cytotfix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Solution Kit with BD GolgiPlug™. Los anticuerpos para el marcaje intracelular fueron también suministrados por BD Biosciences®, California, EEUU, utilizados a una dilución 1/100 e incubados durante toda la noche a 4°C. 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®, San Diego, CA, EEUU), marcadas usando el anticuerpo PercP-Foxp3 (eBiosciences®, San Diego, CA, EEUU) a una dilución de 1/150 e incubados durante toda la noche a 4°C. Los datos arrojados por el citómetro de flujo fueron analizados mediante la herramienta informática FlowJo (Tree Star, California, EEUU).

## 6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados han sido expresados como media aritmética  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Para determinar la significancia estadística, se utilizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y un test de significancia *a posteriori* (Fisher LSD). La significancia estadística se consideró para un valor de  $P < 0.05$ . El análisis estadístico descrito se realizó mediante la plataforma informática SigmaStat 2.0 (Jandel Corporation, San Rafael, CA, EEUU).

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

| Gen          | Hebra sentido 5'-3'      | Hebra antisentido 3'-5'   |
|--------------|--------------------------|---------------------------|
| TLR4         | GATCAGAAACTCAGCAAAGTC    | TGTTTCAATTTACACCTGG       |
| 18S          | TGGTGGAGCGATTTGTCTGG     | ACGCTGAGCCAGTCAGTGTACC    |
| HPRT         | AGGGATTTGAATCACGTTTG     | TTTACTGGCAACATCAACAG      |
| CLDN4        | GACTGTGCAAAGTTACTAGC     | ACCAGCAATTTGGATGTAAG      |
| CLDN5        | AACAGTTCCTACTGAGATCC     | CTTTTAAACACGTCCCTCTG      |
| Ocludina     | ACGGACCCTGACCACTATGA     | TCAGCAGCGCCATGTACTC       |
| Reg3g        | CAGAGGTGGATGGAGTGGAG     | CACAGTGATTGCCTGAGGAAGAGA  |
| ZO1          | GGGCCTACACTGATCAAGA      | TGGAGATGAGGCTTCTGCTT      |
| MUC3         | AAAGATTACCTCCAATCTCC     | TAAAATAAGCATGCCCTTG       |
| IL10         | CAGGACTTAAAGGGTACTTG     | ATTTTCACAGGGGAGAAATC      |
| IL17A        | ACGTTTCTCAGCAAACCTTAG    | CCCCTTTACACCTTCTTTTC      |
| TNF $\alpha$ | CGTGGAAGTGGCAGAAGAGG     | CAGGAATGAGAAGAGGCTGAGAC   |
| IFN $\gamma$ | GCTCTGAGACAATGAACGCTACAC | TTCTTCCACATCATGCCACTTGAG  |
| IL1 $\beta$  | AAGGGCTGCTTCCAAACCTTTGAC | TGCCTGAAGCTCTTGTGATGTGC   |
| S100A8       | GCCCTCTACAAGAATGACTTCAAG | ATCACCATCGCAAGGAAGTCC     |
| CD14         | GAATCTACCGACCATGGAG      | AAGTTCAGGAACAACCTTC       |
| HP           | ATGGACTTTGAAGATGACAG     | GTAGTCTGTAGAAGTGTCCG      |
| IL22         | ATCAGTGCTACCTGATGAAG     | CATTCTTCTGGATGTTCTGG      |
| IL27         | AATCTCGATTGCCAGGAG       | CTCAGAGTCAGAGAGGTG        |
| DKK1         | ATATCACACCAAAGGACAAG     | CCTTCTTTAAGGACAGGTTTAC    |
| CiclinaD1    | GTCCTACTGTTGCGGCTTG      | GCAGACGCCTCTTGGGTCTACAATA |
| c-Myc        | TTTTGTCTATTTGGGGACAG     | CATAGTTCCTGTTGGTGAAG      |
| c-Jun        | CATGTTTGTGTTGTTGGGTG     | ATGGATAATGCAGCAAAGAG      |
| SOCS3        | CCAAAGAAATAACCACTCCC     | GATCTGCGAGGTTTCATTAG      |
| TFF3         | TATCAGTCGGATCGAGGCTATG   | AGGTACCGATCCCATCTGTGT     |
| IAP          | CATGGACATTGATGTGATCC     | AGACTGGTACTGTCACTTG       |
| Lgr5         | AGAACACTGACTTTGAATGG     | CACTTGGAGATTAGGTAAGT      |
| VEGF         | TAGAGTACATCTTCAAGCCG     | TCTTTCTTTGGTCTGCATTC      |
| Lyz2         | ATTTCCCTCTAAGTCACAG      | TGAAGAACTGACCTACAGAG      |
| G6Pc         | TTCAAGTGGATTCTGTTGG      | AGATAGCAAGAGTAGAAGTGAC    |
| Pck1         | AATATGACAACTGTTGGCTG     | AATGCTTTCTCAAAGTCCTC      |
| iNOS         | GATGTGCAGTCCCTATTTGGTC   | GCATCGTCCCAATCTTGGTCTC    |
| NR3C1        | CTTCTCTCCTCAGTTCCTAAG    | CCAATTCTGACTGGAGTTTC      |
| IL6          | AAGAAATGATGGATGCTACC     | GAGTTTCTGTATCTCTCTGAAG    |
| TLR2         | CTAGAAGTGGAAGATGTCCG     | TAGCATCCTCTGAGATTTGAC     |
| TNAP         | ATTCCCACTATGTCTGGAAC     | CTCAAAGAGACCTAAGAGGTAG    |
| LBP          | CTGGATTCATCGATAAGCTG     | TTTGCATGATGCTCTTTAGG      |



# INTRODUCCIÓN





# 1. SISTEMA INMUNITARIO GASTROINTESTINAL

El sistema inmunitario gastrointestinal tiene una composición realmente heterogénea, incluyendo desde las células que componen la pared intestinal en sí misma, hasta las integradas dentro de los órganos linfoides cuya localización anatómica es adyacente e incorporada dentro de la propia estructura intestinal. Asimismo, dentro de la mucosa intestinal y los órganos linfoides asociados al intestino (Gut-Associated Lymphoid Tissue, GALT) se encuentra un elevado número de células de naturaleza tanto mieloide como linfoide, conformándose de este modo el que probablemente sea el sistema inmunitario de mayor complejidad en cuanto a su regulación en los organismos superiores.

El tracto gastrointestinal es la superficie del organismo humano expuesta al medio externo con mayor extensión (alrededor de 200 m<sup>2</sup>). Además, se encuentra constantemente expuesta a una ingente cantidad de estímulos provenientes del medio externo, muchos de ellos nocivos, destacando una amplia variedad de microorganismos, antígenos provenientes de la dieta y diversos elementos inorgánicos. Esta es una situación común en la práctica totalidad de los organismos vertebrados [25]. Por tanto, la mucosa intestinal tiene la difícil tarea de segregar espacialmente las capas subyacentes en la pared intestinal y, por extensión, la totalidad del organismo hospedador, de la masiva y constante llegada de microorganismos y sustancias potencialmente nocivos del medio externo. Dicha tarea se complica enormemente por la necesidad de que la mucosa intestinal participe activamente en la digestión y absorción de nutrientes, fluidos e iones desde el medio externo para satisfacer las necesidades en lo referente a la nutrición y al balance hidroelectrolítico del organismo. Por esta razón, la pared intestinal se comporta como una barrera semipermeable, asistida por un complejo sistema inmunológico local, el cual para el adecuado mantenimiento de la homeostasis inmune debe ser capaz de mostrar tolerancia ante la microbiota comensal y de mantener la competencia inmunológica ante bacterias patogénicas que pudieran atravesar la barrera epitelial. Antes de comenzar con la descripción de los diferentes elementos que intervienen activamente en la regulación de la función de barrera intestinal, resulta interesante destacar el mecanismo más primario pero no por ello menos importante con el que cuenta el tracto gastrointestinal en ese sentido. Este no es otro que el peristaltismo intestinal, el cual favoreciendo la motilidad impide la adhesión mantenida de un determinado microorganismo sobre un pequeño espacio de la mucosa intestinal, reduciendo el riesgo de invasión.

## 1.1 Barrera epitelial

La barrera epitelial está compuesta por una monocapa epitelial 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 [26], las cuales proliferan continuamente permitiendo su propia renovación, que se completa en un periodo de 2-5 días [27]. De este modo se generan unas células que van a ir escalando dentro de la monocapa en dirección al borde apical. Paralelamente a la proliferación en sí misma van a sufrir un proceso de maduración selectiva estrechamente regulado por factores como la señalización de glucocorticoides tanto de origen adrenal como local intestinal [28], diversos elementos solubles como las señales WNT [29, 30] y las señales NOTCH [31], que deben estar proporcionados entre sí [32], y la propia señalización por parte de los antígenos de la microbiota comensal. Este proceso de transición progresiva desde un estado proliferativo hacia un estado madurativo-diferenciado, terminará

dando lugar a los tipos celulares que componen el epitelio de la mucosa intestinal; enterocitos o células entero-absortivas, células caliciformes, células de Paneth y las células enteroendocrinas.

El enterocito, cuya función activa más relevante es la absortiva, es el tipo celular más abundante en el epitelio intestinal razón por la cual tiene una contribución decisiva a la función de barrera física que esta ejerce, separando los medios interno y externo. Para conseguir que la mucosa intestinal sea en efecto una barrera semipermeable los enterocitos, además de regular el transporte pasivo y activo de una amplia variedad de nutrientes y otras sustancias [33], deben contener eficazmente la enorme carga antigénica luminal, para lo cual, éstos se adhieren entre sí mediante las denominadas uniones estrechas, compuestas por proteínas como zonula occludens 1 (ZO-1), zonula occludens 2 (ZO-2), diversas claudinas y la ocludina. La influencia de cada una de ellas sobre la permeabilidad intercelular varía en función de cada caso. Así, mientras la expresión de Claudina-4 (CLD-4) [34] se asocia con una menor permeabilidad paracelular, la de la Claudina-5 (CLD-5) o Claudina-2 (CLD-2) lo hace con la consecuencia opuesta [35]. Además, independientemente del grado de expresión de las proteínas antes citadas, las células epiteliales intestinales se ensamblan entre sí mediante un sistema que gráficamente se ha descrito como muy similar al modo en que los anillos de plástico asocian las latas de refresco en los packs múltiples [36]. El modo en que este fenómeno se establece y por extensión la regulación de la permeabilidad paracelular, está influenciado esencialmente por el grado de fosforilación y activación de la proteína *myosin light chain* (MLC) [37], de hecho haciendo uso de ratones transgénicos con una activación constitutiva elevada de la MLC, se puso de manifiesto que esta situación genera un aumento significativo de la permeabilidad paracelular en el intestino delgado, sin que ello suponga el desencadenamiento de proceso inflamatorio alguno *per se*. Una situación análoga se da con frecuencia en familiares de pacientes con EII que aún no han presentado sintomatología alguna [38]. Actualmente existe gran cantidad de literatura relacionada con la expresión de las proteínas que componen las uniones estrechas, así como con el modo en que se ensamblan mutuamente, pero en cambio no hay mucha información disponible sobre los factores que modulando las uniones estrechas regulan la permeabilidad a moléculas de pequeño tamaño. En este sentido, el eje establecido por la zonulina/zonula occludens toxin y la haptoglobina (HP) está recibiendo un interés creciente en los estudios centrados en la función de barrera epitelial en el contexto intestinal. La zonulina es una proteína sintetizada por las células epiteliales intestinales en la mucosa intestinal, y tanto su grado de expresión en intestino, como su presencia en plasma se ven sustancialmente incrementadas en los desórdenes intestinales que cursan con un defecto en la función de barrera, a nivel clínico o experimental. Su acción está mediada por el *proteinase activated receptor 2* (PAR2) y posterior transactivación del *epidermal growth factor receptor* (EGFR), aunque se considera que deben existir otros mecanismos de acción aún desconocidos [39, 40]. El efecto final de la zonulina demostrado tanto *in vivo* como *in vitro* se basa en un aumento de la permeabilidad paracelular mediado por una desorganización de la fijación mutua existente entre las proteínas de las uniones estrechas y de estas al citoesqueleto, al parecer de un modo dependiente de la proteína *myosin C1* [41], lo que le permite regular positivamente el flujo hidroelectrolítico, de macromoléculas y leucocitos entre el torrente sanguíneo y la luz intestinal. Las acciones favorecedoras de la permeabilidad intestinal asociadas a la zonulina se dan preferentemente en el intestino delgado, debido a que los receptores PAR2 antes descritos presentan una distribución mayoritaria en dicho segmento intestinal [42]. Además, se ha demostrado que la exposición de este epitelio a bacterias, independientemente de su carácter patogénico o comensal, así como de su viabilidad, induce un

aumento de la expresión de zonulina que, atendiendo a los efectos anteriormente mencionados, contribuye a luchar contra dicha colonización bacteriana mediante lavado físico o “*flush out*” [43]. El aumento de la permeabilidad celular inducido por zonulina no solo cuenta con esta vertiente beneficiosa, sino que contribuye al compromiso de la función de barrera que precede y conduce al desarrollo inflamatorio en ciertos modelos de colitis como la que se desarrolla espontáneamente en ratones IL10 KO [44]. Por otro lado, la HP, de la cual es precursora la zonulina (pre-HP) antes descrita, es una  $\alpha$ -sialoglucoproteína con capacidad de unión a la hemoglobina, lo cual le permite colaborar en la prevención de la pérdida de hierro, la hemólisis y el efecto oxidante del grupo hemo *per se* [45], pero que destaca principalmente por sus propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias sobre la inmunidad innata y adaptativa intestinales. De forma resumida, la HP presenta un efecto atenuante sobre los procesos inflamatorios mediados por citoquinas Th1 o Th17. Esto explica la mayor susceptibilidad al shock séptico inducido por la administración de LPS intraperitoneal [46], la encefalomiелitis experimental [47] y los modelos experimentales de colitis inducida por DSS y oxazolona [48], que caracteriza a los ratones con deficiencia en HP. En línea con lo expuesto acerca de zonulina y la HP, existen dos alteraciones genéticas que afectan al gen codificante de la HP, denominadas HP1 y HP2, para las cuales se ha encontrado un significativo grado de asociación, no solo con la EII, sino también con otros desórdenes de naturaleza autoinmune [49, 50].

El enterocito se encuentra estructural y funcionalmente polarizado, de forma que en su borde apical, en constante contacto con el contenido del lumen intestinal, presenta una membrana rica en microvellosidades que expresa diversas enzimas (disacaridasas, fosfatasa alcalina, leucin aminopeptidasa...) que intervienen en el proceso de digestión de diversos nutrientes sencillos, en consonancia con la función absorptiva de este tipo celular [51]. Del mismo modo, en dicho borde apical se localizan algunas mucinas (MUC-1,3,4,13 y 17) sintetizadas de forma independiente por las células epiteliales intestinales que se sitúan generalmente asociadas a la membrana celular y que presentan una función relevante en la formación de la capa de moco [52]. De hecho, la relevancia de estas proteínas y de la capa de moco que crean es tal que la simple deficiencia en MUC-2 es suficiente para desencadenar una inflamación intestinal espontánea.

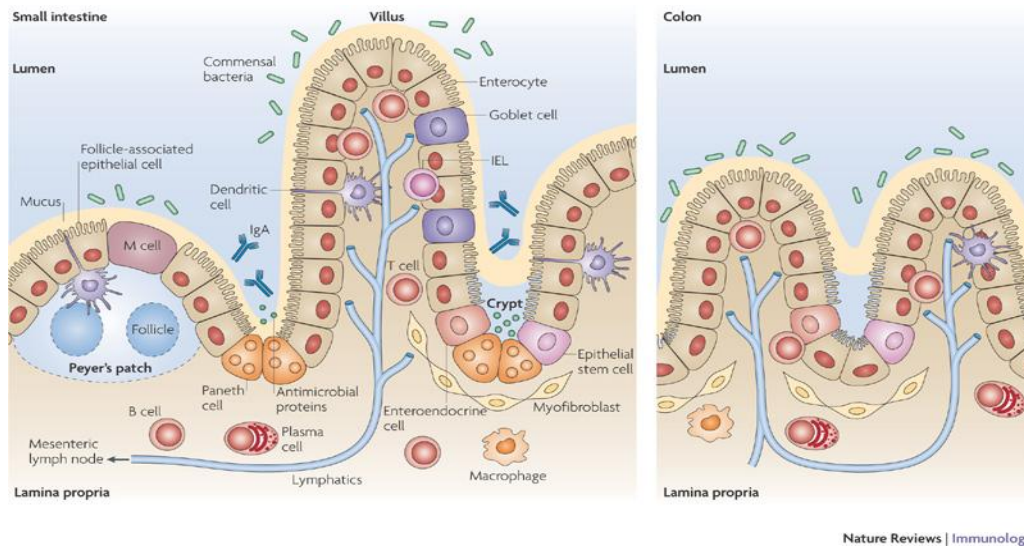
Las células caliciformes son mucho menos abundantes que los enterocitos y presentan una gran especialización funcional. Son las responsables de la secreción de las mucinas [53] que componen mayoritariamente el glucocálix, siendo funcionalmente la más relevante MUC-2 como se puede deducir de lo comentado en el párrafo anterior [54]. Debido a su alto contenido en glucoproteínas y glucolípidos, el glucocálix genera una barrera física que se establece entre el borde apical de los enterocitos y el lumen intestinal, constituyendo así el primer elemento de contención con el que cuenta el organismo ante la constante llegada de xenobióticos principalmente de naturaleza bacteriana [55].

Las células enteroendocrinas liberan de forma localizada en la mucosa intestinal diversas hormonas con funciones reguladoras relevantes en dicho contexto. Entre ellas, destacan la gastrina, somatostatina y la serotonina. La primera de ellas ejerce una acción prosecretora a nivel gástrico sobre la producción de clorhídrico y pepsinógeno. La somatostatina reduce la secreción ácida gástrica y de las enzimas constituyentes del jugo pancreático, así como la motilidad intestinal y la absorción de nutrientes. Finalmente, la serotonina ejerce un efecto opuesto al de las dos anteriores

a nivel de la motilidad intestinal, siendo un potente procinético, al tiempo que también reduce la secreción gástrica.

Las células de Paneth son, junto con los enterocitos, el componente celular del epitelio intestinal más directamente implicado en la defensa inespecífica ejercida por parte de la mucosa intestinal. Esto es así gracias a su alto contenido en un amplio abanico de sustancias con acción antimicrobiana, las cuales son liberadas en dirección a la luz intestinal de forma dependiente de la acción de agonistas colinérgicos [56] y la señalización de antígenos de naturaleza bacteriana sobre los *receptores de reconocimiento de patrones microbianos conservados* (PRRs) que expresan de forma abundante en su superficie [57]. Asimismo, se ha demostrado recientemente la influencia de ciertas citoquinas provenientes de células inmunocompetentes infiltradas en la mucosa intestinal en la estimulación de la desgranulación de las células de Paneth, como la IL13 [58] o el IFN- $\gamma$  [59], así como citoquinas tipo Th17 como la IL22 que utiliza en su señalización a STAT3 como factor de transcripción [60]. Debido a la dependencia de las señales bacterianas para la desgranulación de las células de Paneth se establece un diálogo bidireccional entre la microbiota intestinal y este tipo celular, el cual queda muy bien reflejado en el modo en que desde recientes fechas un número creciente de investigadores asocian ciertos casos de disbiosis a un comportamiento alterado de las células de Paneth [61]. Los péptidos antibacterianos más relevantes producidos por este tipo celular son las  $\alpha$  y  $\beta$  defensinas [62], lisozimas, fosfolipasas y lectinas tipo C como las *regenerating islet-derived protein* (REG) Reg3 $\gamma$  o Reg3 $\alpha$  [57, 63]. Las defensinas, independientemente de sus acciones antimicrobianas, desempeñan un papel relevante generando un gradiente quimiotáctico para células dendríticas y linfocitos de lámina propia.

Una vez descritos en detalle cada uno de los tipos celulares que componen el epitelio intestinal, cabe destacar que el hecho de que las células epiteliales intestinales en su polo apical estén en contacto directo con el contenido de la luz intestinal, les confiere la capacidad de actuar como células presentadoras de antígenos (APC), y como interlocutores privilegiados y necesarios en el diálogo que se establece entre la microbiota y las células dendríticas (APC en general) infiltradas en la mucosa o realizando tareas de inmunovigilancia desde la lámina propia. La expresión de receptores de antígenos bacterianos como FcRn [64], DEC-205 [65] o CEACAM6 [66] en el polo apical de las células epiteliales intestinales permite el paso de dichos antígenos por endocitosis mediada facilitada por estos receptores hacia capas subyacentes en la pared intestinal, donde las APC van a encargarse de procesarlos y presentarlos, conectando así con el componente adaptativo de la inmunidad intestinal. Pero mucho más relevante si cabe resulta el hecho de que las células epiteliales intestinales, de forma regulada por la señalización de la microbiota y ciertos nutrientes aportados desde la dieta, tienen la capacidad de liberar en la mucosa intestinal sustancias como ácido retinoico (RA), IL10, *transforming growth factor  $\beta$*  (TGF $\beta$ ), *thymic stromal lymphopoietin protein* (TSLP) y PGE<sub>2</sub> [67] cuya presencia es decisiva en la inducción de un comportamiento tolerogénico en las APC. Esto, resulta esencial en el mantenimiento de la homeostasis intestinal en condiciones basales y en la represión de los procesos inflamatorios activos. Así, un estudio describió el modo en que la presencia y funcionalidad del receptor de prostaglandina EP<sub>4</sub> confiere cierto grado de protección ante la colitis aguda inducida por DSS [68].



**Imagen 1:** Anatomía básica del sistema inmune intestinal

La barrera epitelial se comporta como una barrera selectivamente permeable, en la medida que debe permitir el flujo de nutrientes, agua e iones a través de ella misma, pero contener al mismo tiempo la presión antigénica luminal. Del mismo modo, se encarga de realizar un transporte controlado de antígenos bacterianos hacia capas inferiores de la pared intestinal, sin que ello implique perturbación alguna de la función barrera, es decir, en condiciones homeostáticas. Existen diversos mecanismos mediadores de este transporte, en primer lugar, las células caliciformes median el transporte de ciertos antígenos luminales [69] específicamente dirigidos hacia una población de células dendríticas (DC) de carácter tolerogénico (CD103+) [70], las cuales al presentarlos sobre células T vírgenes polarizan a estas hacia un fenotipo T regulador (Treg) que reciben además la impresión del sello de localización intestinal (*gut homing*) [71]. Además existe otro mecanismo, denominado fuga paracelular (*paracellular leak*), que contribuye significativamente al paso de antígenos bacterianos y otras moléculas de muy pequeño tamaño (< 10 kDa) a través de la barrera epitelial [34], los cuales van a ser liberados directamente en la lámina propia donde serán procesados y presentados por APC residentes.

El epitelio intestinal es una barrera dinámica en la medida que esta formado por una monocapa celular en constante renovación. En la base de las criptas se encuentran las células madre o pluripotenciales, de cuya constante división derivan los diferentes tipos celulares que componen este epitelio, y que previamente han sido descritos. La proliferación de estas células madre, su paulatina diferenciación, y por tanto la renovación constante del epitelio en condiciones de homeostasis, así como su restitución en caso de daño asociado a un proceso inflamatorio, es regulada por una amplia variedad de factores que deben estar adecuadamente armonizados. Un desequilibrio en la contribución relativa de estos podría conducir a fenómenos hipoplásicos que comprometerían la función de barrera epitelial, o por el contrario a procesos de hiperplasia potencialmente carcinogénicos. Desde hace bastante tiempo es bien conocido cómo la señalización de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) bacterianos sobre los PRR de las células madre intestinales de la base de las criptas, es un factor estimulante relevante para su proliferación [3]. Una alteración en la capacidad de estas células para percibir las señales bacterianas, es capaz por sí solo de generar alteraciones tan profundas en la homeostasis epitelial que sensibilizan a los animales que lo sufren a la colitis experimental. Esta situación queda nítidamente reflejada en los

modelos desarrollados en ratón con deleción genética inespecífica de *myeloid differentiation primary response gene 88* (MyD88), TLR4 y TLR2 [3, 5, 72-74] que son más susceptibles a la colitis inducida por DSS, así como con deleción específica de tejido de MyD88, *NF- $\kappa$ B essential modifier* (NEMO) o *transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase-1* (TAK1) en las células epiteliales intestinales [75-77], caso en el que la disfunción en la función de barrera epitelial es tal que desemboca en un proceso inflamatorio intestinal de carácter espontáneo, en cuyo desarrollo también participa la reducida capacidad de síntesis de los péptidos bacterianos de la familia de las proteínas REG. Sin embargo, recientemente se ha descrito la relevancia de dicha señalización sobre los PRR de una población de macrófagos que se localiza en el entorno de la base de las criptas, la cual de forma paracrina regula la función proliferativa de las células madre [78]. Por otro lado, existen diversas citoquinas que en estudios *in vitro* han mostrado un efecto perjudicial para la integridad de la barrera epitelial, ya que producen un significativo aumento de la permeabilidad paracelular. Entre ellas destacan TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL4 e IL13, efecto esencialmente mediado por una reducción en la expresión de las proteínas que conforman las uniones estrechas, así como por una alteración en el sistema de adhesión intercelular regulado en gran medida por la proteína MLC [79, 80]. En cambio, hay una serie de citoquinas de carácter inflamatorio pertenecientes a la familia de citoquinas de la IL10 y que utilizan el factor de transcripción STAT3 en su señalización intracelular, que ejercen un papel protector sobre la mucosa intestinal, destacando la IL22, IL27, IL6 e IL10 [60, 81-86]. Las tres primeras lo hacen esencialmente estimulando la proliferación y maduración epiteliales, por lo que favorecen la restitución de la integridad de la barrera epitelial comprometida en muchos procesos inflamatorios agudos, aunque en el caso concreto de la IL22 se sabe que además al actuar sobre las células epiteliales intestinales, que son su tipo celular diana esencial, estimula la producción por parte de estas de quimioquinas, favoreciendo el reclutamiento leucocitario hacia la mucosa. En el caso de la IL10 se ha demostrado que su señalización sobre las células epiteliales intestinales ejerce un papel beneficioso protegiéndolas del estrés asociado al retículo endoplásmico y su consecuente inducción de apoptosis, típicamente relacionados con procesos inflamatorios crónicos [87, 88]. En línea con esto, recientes publicaciones atribuyen un papel beneficioso para la integridad de la barrera epitelial a otras dos citoquinas cuya expresión se encuentra típicamente elevada en los procesos inflamatorios intestinales, como son el GMCSF [89] e IL1 $\beta$  [90] en la medida que estimulan la restitución epitelial temprana ante una agresión sobre el epitelio. El hecho de que a diversas citoquinas clásicamente consideradas como pro-inflamatorias y teóricamente perniciosas, algunas de las cuales he citado anteriormente, actualmente se les atribuya un papel beneficioso en la curación de agresiones que afectan a la mucosa intestinal y que comprometen su función de barrera, ha supuesto un cambio sustancial en el modo de entender la fisiopatología de algunos modelos de colitis inducida en ratón en los que la afectación de la función de barrera epitelial es decisiva (DSS por ejemplo), y secundariamente de la EII a nivel clínico.

## **1.2. Tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal (GALT)**

Dada la creciente prevalencia de las diversas afecciones inflamatorias crónicas que afectan al entorno intestinal, el modo en que se organizan y los factores que intervienen en la regulación del conjunto de tejidos linfoides que lo asisten ha recibido un creciente esfuerzo investigador. Además dado que la barrera epitelial antes descrita es la única separación física existente entre la masiva presencia de bacterias lumbales en términos cuantitativos pero también cualitativos (unas 500 especies diferentes) [91], resulta lógico el hecho de que la mayor parte del tejido linfoide asociado a

mucosas del organismo y sus componentes celulares se localicen en efecto en el entorno mesentérico. A continuación, describiré los aspectos estructurales y funcionales más relevantes de los órganos que lo componen [92].

### 1.2.1. Placas de Peyer, folículos linfoides aislados y apéndice vermiforme

Las placas de Peyer son órganos linfoides secundarios macroscópicamente distinguibles localizados en la mucosa-submucosa del intestino delgado, en los cuales se concentra una elevada cantidad de células inmunológicas, comprendiendo desde linfocitos T y B, hasta APC como macrófagos y células dendríticas (DC). Asimismo, en las placas de Peyer se encuentra una población de células epiteliales que conforma el denominado epitelio asociado a folículo (FAE), el cual es único en todo el organismo y está funcionalmente adaptado al papel que desempeña en este contexto. El FAE se sitúa en el borde que la placa de Peyer orienta hacia la luz intestinal, y desde allí, actúa como barrera semipermeable a los antígenos propios de la microbiota, pero siendo mucho más permeable a estos que cualquier otra zona epitelial de la mucosa intestinal. Esto es posible gracias a que está esencialmente compuesto por las *microfold cells* (células M), para cuya diferenciación desde la célula madre pluripotencial de la base de la cripta es esencial la señalización de ligando de RANK [93]. Estas células carecen del clásico borde en cepillo de un enterocito diferenciado, presentan un borde lateral que se encarga de la adhesión a células M adyacentes y un borde basolateral con extensiones que le permiten estar en contacto íntimo con las células mononucleares presentes en el interior de la estructura de la placa. Están funcionalmente especializadas en el transporte de antígenos lumenales intactos hacia el interior de la placa de Peyer donde macrófagos y DC se encuentran preparados para procesarlos e incluirlos en una sinápsis inmunológica en ese contexto [94]. En condiciones normales esta vía de acceso de antígenos supone su procesamiento y presentación, desencadenándose una respuesta adaptativa tolerante, aunque lógicamente existen ciertos microorganismos enteroinvasivos que hacen uso de esta ventana de acceso, generándose en ese caso una activación del sistema inmune adaptativo residente en las placas de Peyer, orientada a combatir al microorganismo agresor en cuestión.

En la región central de las placas de Peyer se encuentran los folículos linfoides poblados por células B. Estos están rodeados por DC como células profesionalizadas en la tarea de presentación antigénica, y por células T vírgenes. De este modo, en las placas de Peyer se establece una conexión entre la inmunidad innata y la adaptativa, siendo activada esta última tanto en su vertiente celular (T CD4 / T CD8), como la humoral a través de la activación de células B que en el entorno de la mucosas en general y la mucosa intestinal en particular tiene como elemento efector esencial la liberación de IgA secretora (sIgA) y en menor medida de IgM al medio externo. Actualmente está descrito que esta sIgA, ejerce un efecto modulador cualitativo sobre la microbiota intestinal, siendo esto último esencial en el diálogo cruzado que se establece entre los microorganismo externos y el sistema inmune organizado en la mucosa intestinal [95]. En el caso del colon, no encontramos placas de Peyer, sino unos órganos linfoides secundarios denominados folículos linfoides aislados (ILF) en este caso no distinguibles a simple vista al menos en ratón, pero que estructural y funcionalmente responde exactamente a lo ya comentado arriba en referencia a las placas de Peyer [94].

Finalmente, merece comentario el apéndice vermiforme. Este se localiza anatómicamente en la inserción de los intestinos delgado y grueso. A nivel estructural, está en lo esencial organizado del



mismo modo que las placas de Peyer, con ligeras diferencias como la ausencia de irrigación linfoide individual para cada folículo linfoide, el mayor calibre de dichos folículos y el hecho de que estos se encuentran organizados siguiendo una distribución reticulada más regular [96].

### **1.2.2. Ganglios linfáticos mesentéricos (MLN)**

Los MLN se localizan insertados en el mesenterio del intestino, dividiéndose estructuralmente en tres regiones con distinta composición celular; corteza, paracorteza y médula. Mientras que en la corteza los folículos linfoides están enriquecidos en células B teniendo abundantes DC en su entorno cercano, en la paracorteza los folículos presentan un predominio de células T. Por el contrario en la médula encontramos similares proporciones de ambos tipos linfocitarios, pero cierta presencia de células plasmáticas ya comprometidas en la síntesis de anticuerpos [97].

A nivel funcional, los MLN son similares al resto de componentes del GALT anteriormente descritos, con la salvedad de que, a diferencia de lo que ocurre en las placas de Peyer, en este caso no existe tanta cercanía con el contenido antigénico de la luz intestinal. Mientras que en las placas de Peyer las APC y los antígenos lumenales únicamente se encuentran separados por el FAE que se caracteriza por un alto grado de permeabilidad, los MLN se encuentran distantes respecto del epitelio intestinal. En este caso, la presentación de antígenos bacterianos sobre las poblaciones linfocitarias vírgenes que se encuentran a la espera en este órgano, va a ser realizada por macrófagos y sobre todo DC que tras haber estado funcionalmente comprometidas con la inmunovigilancia y el muestreo antigénico desde su localización inicial en la lámina propia, maduran y migran hacia los MLN donde realizarán la presentación de dicho antígeno a las células inmunocompetentes adaptativas que allí aguardan [98].

### **1.3. Sistema inmunitario innato**

El sistema inmunitario innato dentro del sistema inmune gastrointestinal tiene como principal función la de patrullar desde el punto de vista inmunológico el entorno de la mucosa intestinal. Su acción se basa en el reconocimiento y respuesta temprana ante los PAMP que teniendo su origen en la luz intestinal puedan alcanzar estratos inferiores dentro de la pared intestinal. A continuación, se describen los diferentes mediadores solubles y elementos celulares que en las diferentes estructuras del epitelio intestinal y los GALT ejercen una contribución significativa a la inmunidad intestinal.

#### **1.3.1. Péptidos antimicrobianos y otros mediadores solubles**

En la mucosa intestinal existen diferentes tipos de mediadores solubles con relevancia en la homeostasis inmunológica, regulando el equilibrio entre la tolerancia ante bacterias comensales y la inmunocompetencia ante microorganismos patógenos.

Los péptidos antimicrobianos han sido descritos detalladamente en su mayoría en la sección anterior dedicada a las células de Paneth. Sin embargo, existen otras proteínas con reconocida actividad antimicrobiana que no son producidas por las citadas células de Paneth. En este sentido, vale la pena destacar la calprotectina. Esta es una proteína heterodimérica formada por la conjunción de las proteínas S100A8 o MRP8 y S100A9 o MRP14. S100A8 es una proteína con capacidad para quelación de cationes divalentes como  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ , propiedad que le confiere una significativa actividad antimicrobiana con implicaciones relevantes en la inmunidad inespecífica

propia de la mucosa intestinal, pero también en la epidermis [99] y en el epitelio pulmonar [100]. Es principalmente producida por los neutrófilos (20-35% de sus proteínas citoplasmáticas), aunque del mismo modo algunas células epiteliales también tienen capacidad para sintetizarla, aunque cabe recordar que su liberación suele asociarse a procesos de daño celular. Además, a la calprotectina se le atribuye cierta afinidad y capacidad de activación de receptores importantes en la regulación positiva de la inmunidad innata en las mucosas, como son el TLR4 [101] y el *receptor for advanced glycation end products* (RAGE) [102]. Esto último hace que se le atribuyan funciones como alarmina y se la considere como una proteína de carácter inflamatorio [103]. Otras proteínas con acción antimicrobiana significativa son la lactoferrina, elafina, catelicidina e incluso algunas quimioquinas del grupo de las *C-C motif ligand* (CCL) como la CCL14 y CCL15, algunas de ellas liberadas por células de Paneth, pero que cuentan con fuentes alternativas como las células epiteliales intestinales [104]. El caso concreto de la lactoferrina es curioso, en la medida en que necesita ser digerida por una pepsina de origen gástrico para generarse de ese modo en la luz intestinal el metabolito que presenta las propiedades antimicrobianas [105]. Por otro lado en su forma no digerida, la lactoferrina colabora en el transporte y absorción de hierro a través de la mucosa epitelial. Todas ellas, junto con las ya atribuidas previamente a las células de Paneth, se integran en el seno de la capa de moco localizada encima del borde apical de los enterocitos de la mucosa epitelial, lugar en el que colaboran activamente en la contención de bacterias, hongos y en general cualquier agente biológico potencialmente pernicioso para el hospedador. Además, algunas como la catelicidina cuentan con actividad biológica independiente de la antibacteriana, destacando su acción antiapoptótica y promotora de la proliferación epitelial y por tanto de la restitución de la mucosa ante un estímulo que comprometa su integridad [104].

El conjunto de mediadores solubles con funciones más relevantes en el sistema inmunológico gastrointestinal tanto en su vertiente innata, como en lo referente a la adaptativa, son las citoquinas. Esto es así porque son pequeñas proteínas que son producidas en su mayoría por células inmunes, aunque no de forma exclusiva ya que las propias células epiteliales y algunas células endoteliales también son capaces de producir algunas de ellas, que van a permitir la comunicación entre los distintos tipos celulares de un modo paracrino o incluso distante, es decir, sin necesidad de cercanía espacial. De forma general, estas son clasificadas en varias superfamilias en virtud principalmente de su actividad biológica; IL12, IL17, IL10, TNF, IL1, TGF $\beta$  y las quimioquinas. Con objeto de simplificar, otra clasificación quizá más práctica es aquella que las distribuye en Th1 (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  y IL12), Th2 (IL4, IL14 y IL15) y Th17 (IL17A, IL23, IL22, IL21 y IL35) por un lado, siendo estas consideradas responsables en general de la iniciación y mantenimiento de los eventos inflamatorios. Por el otro, las citoquinas inmunoreguladoras (IL10 o TGF $\beta$ ), a las que en general se las relaciona con la inducción de tolerancia, así como con la represión y la resolución final de procesos inflamatorios. Y finalmente se encuentran las quimioquinas, cuya función esencial es la de generar gradientes quimiotácticos que permitan el reclutamiento regulado de células inmunocompetentes hacia los focos inflamatorios cuando estas son funcionalmente requeridas. Dentro de las quimioquinas a su vez, se establecen cuatro grupos en función de la distribución de sus residuos de cisteína. Así encontramos el grupo C, CC (por ejemplo CCL2 o MCP1 como ejemplo más representativo), CXC (CXCL2 o MIP2 como ejemplo más representativo) y CX3, donde X es cualquier aminoácido excepto la cisteína a efectos de nomenclatura.

En el epitelio intestinal, así como en otras mucosas del organismo, existe una producción constitutiva relevante de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, las cuales se ven dramáticamente incrementadas al desencadenarse un proceso inflamatorio local o sistémico. Actualmente existen opiniones divergentes en lo relativo al papel que juega el óxido nítrico en la inflamación intestinal. Por un lado, hay cierta producción de este en condiciones basales por medio de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), mientras que cuando se desencadena un proceso inflamatorio la producción de este se dispara siendo en este caso responsable la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) [106]. Debido a la toxicidad que caracteriza a estas moléculas de naturaleza radicalaria, tanto en condiciones basales como en inflamación se considera que contribuyen a la defensa inespecífica de la mucosa intestinal y por extensión del hospedador en general. No obstante, su propia naturaleza también los convierte en lesivos para el tejido del propio hospedador, de modo que actualmente se asume que el efecto de los radicales activos de nitrógeno sobre el epitelio intestinal depende básicamente de un equilibrio cuantitativo [107]. Este concepto, viene apoyado por la existencia de mecanismos autónomos propios del hospedador para controlar la exacerbada actividad oxidativa de estos radicales en inflamación, destacando en ese sentido la producción de glutatión.

El sistema del complemento también ejerce una función destacada en la defensa inespecífica en el contexto intestinal. Independientemente de que dicha activación se realice por la vía clásica dependiente de la presencia de anticuerpos sobre el microorganismo, la vía alternativa dependiente del reconocimiento directo de estructuras conservadas microbianas o la vía dependiente de la lectina de unión a manosa, este sistema media la opsonización y posterior fagocitosis de microorganismos, así como la lisis directa de los mismos lo que a su vez ejerce un efecto amplificador de la respuesta inflamatoria ante el microbio potencialmente agresor ya neutralizado.

Por último, destacar la implicación en la función de barrera intestinal que se ha descrito para la proteína C. Esta es producida significativamente por las células epiteliales, que conjuntamente con los receptores que para ella se disponen en las células endoteliales conforman un eje funcionalmente implicado en la contención microbiana de la barrera intestinal. De este modo, los ratones deficientes en la esta proteína desarrollan un proceso inflamatorio espontáneo pero cualitativamente significativo, al tiempo que son mucho más susceptibles a la colitis inducida por DSS [108]. Además, se ha comprobado *in vitro* como la exposición de las células epiteliales intestinales a la proteína C las protege ante el deterioro de la función barrera posteriormente inducido por la exposición a TNF $\alpha$  [108].

### **1.3.2. Componentes celulares del sistema inmune innato**

Los mediadores celulares funcionalmente relevantes dentro de la inmunidad innata intestinal, comprenden a los macrófagos, DC, células linfoides innatas (ILC), células *natural killer* (NK) y células polimorfonucleares infiltradas (neutrófilos en su mayoría). En el presente apartado se describen detalladamente las acciones que desarrollan orientadas a la función de barrera inmunológica intestinal y a la iniciación de las respuestas adaptativas en el GALT, haciendo énfasis especialmente en los mecanismos que en cualquiera de las dos vertientes funcionales anteriores mediante un equilibrio activo permiten mantener la tolerancia inmunológica ante la microbiota comensal y/o patogénica. Es importante destacar que en los últimos años existe una corriente de

pensamiento con creciente relevancia, la cual atribuye un papel crítico a los macrófagos y DC de lámina propia en el desarrollo inicial de la EII, debido principalmente al descubrimiento de múltiples mutaciones puntuales (SNP) con asociación a la EII, que afectan directamente a la regulación de la sensibilidad antigénica y funcionalidad general de las APC que desarrollan funciones de inmunovigilancia en la mucosa intestinal en general y la lámina propia en particular [109]. Por tanto, la clasificación y descripción funcional de estos tipos celulares adquiere gran importancia, por lo que a continuación describiré aquellos más relevantes.

### **Macrófagos**

Los macrófagos son una población celular que dentro de la mucosa intestinal es cuantitativamente muy relevante, presenta una enorme heterogeneidad fenotípica y funcional, así como una destacable plasticidad que permite la transición entre los diferentes tipos que se describen más adelante en este apartado. Los macrófagos residentes en la lámina propia, debido precisamente a su ubicación, están continuamente expuestos a una ingente presión antigénica, lo cual a diferencia de los monocitos circulantes y macrófagos residentes en otros tejidos menos expuestos al medio externo y sus determinantes antigénicos, les ha hecho evolucionar en general hacia un comportamiento inmunológico dominado por la tolerancia. Los mecanismos exactos que determinan dicho comportamiento no se encuentran hoy por hoy descritos, pero hay estudios que sugieren que es de origen “autónomo-celular” durante la maduración intestinal y no tan dependiente de la percepción de la cercanía de la microbiota como se pensaba [110, 111].

De forma general se establecen tres tipos de macrófagos en la mucosa intestinal, diferenciados esencialmente en el perfil de citoquinas que liberan, lo cual a su vez determina la polarización funcional que se le va a imprimir a las células T vírgenes con las que contacten en el acto de presentación antigénica (sinápsis inmunológica).

Macrófagos M1: la polarización de un macrófago inmaduro hacia uno activo de tipo M1 depende principalmente de la señalización sobre él de PAMP de naturaleza bacteriana, estando presentes en dicho entorno citoquinas tipo Th1 como IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ . Estos macrófagos son extraordinariamente competentes en las tareas inmunológicas que se les atribuyen como la fagocitosis y el procesamiento y presentación antigénica. Además producen grandes cantidades de IL12, TNF $\alpha$  e IL6, así como especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Precisamente por dicho perfil de producción de citoquinas, al realizar la presentación antigénica y activación de células T vírgenes en lámina propia o GALT a los que migran también con frecuencia una vez activados, las polarizan hacia un perfil Th1 y Th17 [112, 113]. Por esta razón, se establece un bucle de activación inmunológica que en el caso de descontrolarse puede determinar el inicio de un proceso inflamatorio crónico [114].

Macrófagos M2: este subtipo de macrófago se genera bajo la influencia de citoquinas como la IL4, liberada por granulocitos y linfocitos del sello Th2. Producen *matrix metalloproteases* (MMP), algunos factores de crecimiento epitelial TGF $\beta$  e IL10, siendo esa la razón por la que se les atribuye una función relevante en la inducción de la restitución epitelial ante una agresión a la integridad de este, ya sea de origen inflamatorio o infeccioso [115, 116]. Sin embargo, hay cierta controversia sobre las bondades de esta producción de factores favorecedores de la proliferación epitelial en ciertos contextos inflamatorios [117]. Por otro lado, están muy implicados en la resolución de procesos inflamatorios agudos. Esto es así porque son muy activos en la fagocitosis de restos

celulares que se generan en los focos inflamatorios activos, retirándolos de la zona y evitando así que reactiven la inflamación que se encuentra en fase de resolución. No obstante, su relevancia en este sentido se asocia principalmente a la inducción de polarización de las células T vírgenes hacia Treg, lo cual colabora decisivamente a mantener un ambiente tolerogénico en la mucosa intestinal [118].

Macrófagos reguladores; en este caso la polarización hacia este subtipo es inducida por inmunocomplejos de IgG, IL10, TGF $\beta$  [119], prostaglandinas y restos de células apoptóticas, todo ello asociado a PAMP de origen luminal. Funcionalmente son muy similares a los M2, especializados en la resolución de procesos inflamatorios agudos y la inducción de tolerancia para mantener la homeostasis intestinal en condiciones basales y tras un proceso inflamatorio. La principal diferencia reside en su incapacidad para la síntesis de MMP.

Atendiendo a lo expuesto arriba acerca de cada uno de los tipos de macrófagos presentes en la lámina propia de la mucosa intestinal, resulta lógico pensar que lo ideal sería que los M2 y reguladores fueran predominantes, dado que son fuertes inductores de tolerancia inmunológica mientras que mantienen una relevante capacidad fagocitaria. Sin embargo, debido a su relativa tendencia a inducir un cierto estado de inmunosupresión sobre las células T con las que interaccionan, hay trabajos que relacionan el predominio funcional de estos dos subtipos de macrófagos con una mayor susceptibilidad del hospedador a infecciones de microorganismos patógenos desde la luz intestinal [120, 121]. Incluso se asocia su presencia en determinados tumores sólidos a un mecanismo favorecedor de la evasión de las células transformadas respecto de la inmunidad antitumoral [122].

Finalmente, cabe destacar que, a pesar de la inabarcable complejidad de las múltiples asociaciones posibles de marcadores de superficie en los macrófagos de lámina propia, en general se pueden definir como CX<sub>3</sub>CR1<sup>hi</sup> y F4/80+. Desde hace unos años se tiene conocimiento de la capacidad de ciertas APC presentes en lámina propia de emitir prolongaciones celulares a través del epitelio intestinal para captar, procesar y presentar de forma tolerogénica antígenos luminales. Esta capacidad se atribuía a las DC por cuestiones estructurales, entre otras [123]. Sin embargo, estudios más recientes en virtud del patrón migratorio y perfil de expresión génica, atribuyen dicha capacidad a los macrófagos localizados en lámina propia [124].

### Células dendríticas

Las células dendríticas constituyen el tipo celular con un mayor grado de especialización en la presentación antigénica que se encuentra presente en las mucosas. Del mismo modo que ocurre con los macrófagos, existe una gran heterogeneidad fenotípica y funcional dentro de las DC, de modo que si atendemos a aquellas presentes en el bazo podremos encontrar infinidad de subpoblaciones definidas en virtud de la presencia relativa de diferentes marcadores de superficie. Sin embargo, las que se localizan específicamente en la lámina propia de la mucosa intestinal, pueden ser clasificadas de un modo más sencillo e intuitivo basado en la expresión de CD103 (receptor para la e-cadherina), que describiré a continuación.

DC de lámina propia CD103 - : este tipo está clásicamente asociado a la instauración y mantenimiento de procesos inflamatorios crónicos en el contexto intestinal. Esto es así porque se ha descrito que cuando estas células encuentran PAMP procedentes de la luz intestinal y responden

mediante sus PRR, producen cantidades significativas de citoquinas pro-inflamatorias como la IL12, TNF $\alpha$  e IL6. Por tanto, cuando van a presentar el antígeno a una célula T virgen, ya sea en la propia lámina propia o en los MLN, va a favorecer la polarización de esta hacia un fenotipo Th1 o Th17 [125] y la orientación de las células B hacia células plasmáticas productoras de sIgA [126]. Su repoblación constante se realiza a partir de monocitos circulantes Ly6C<sup>+</sup> que se hacen residentes en la lámina propia.

DC de lámina propia CD103<sup>+</sup> : al contrario que el tipo antes descrito, estas células ejercen un papel inmunoregulador favoreciendo la tolerancia antigénica. Están localizadas insertadas en el seno del epitelio intestinal gracias precisamente a su expresión de CD103, siendo esa situación decisiva en su comportamiento funcional ya que son las células epiteliales y las células estromales de ese entorno las encargadas de producir mediadores como el TGF $\beta$ , el RA, la prostaglandina E2 y el TSLP, todos ellos esenciales junto con las señales derivadas de la interacción célula-célula en la inducción del comportamiento inmunotolerante que caracteriza a estas células [127, 128]. Además de lo anterior, recientemente se ha descrito el decisivo papel que juega la adecuada señalización del factor de transcripción  $\beta$ -catenina en la perpetuación de dicha tolerancia [129, 130]. Independientemente de lo anterior, las DC de lámina propia CD103<sup>+</sup> cuentan con la maquinaria biosintética necesaria para la producción de RA a partir de la vitamina A aportada por la dieta. Esto es fundamental, porque hace que las células Treg que se generan por la acción de estas células como APC, tras ser activadas, se localicen específicamente en la mucosa intestinal (*gut homing*) ejerciendo su acción inmunomoduladora donde más necesaria es esta. En lo referente a su origen, derivan de precursores ya comprometidos con el linaje DC que llegan desde el torrente sanguíneo hasta la lámina propia. Su papel decisivo en la inducción de tolerancia inmunológica queda patente atendiendo a los resultados de algunos trabajos que han puesto de manifiesto la práctica desaparición de estas células durante el desarrollo de un proceso colítico agudo [131].

### Células innatas linfoides

Las ILC comprenden un heterogéneo grupo celular del sistema inmune en general pero con especial presencia y relevancia funcional en las mucosas tanto humana como murina, que presentan dos características básicas en común. En primer lugar, todas derivan de un precursor linfoide compartido del cual se desarrollan no solo ellas, sino también las células B y T, siendo el primer marcador de superficie específico para el linaje ILC el CXCR6. Y en segundo lugar, la carencia de cualquier tipo de receptor con especificidad clonal, es decir, no presentan ninguna estructura análoga al TCR o al BCR de las células T y B, respectivamente. Es precisamente esta segunda característica la que determina su clasificación dentro de los componentes celulares de la inmunidad intestinal innata, a pesar de su naturaleza linfoide [132]. Funcionalmente ejercen un papel relevante en procesos relacionados con la inmunidad inespecífica temprana mucosal, la regulación de la conexión de la respuesta inmune innata con la adaptativa, el desarrollo y maduración del GALT y principalmente en la inducción de la restitución de los epitelios que conforman las mucosas en las que residen [133, 134].

Clásicamente se clasifican en tres grupos, los cuales se diferencian esencialmente en el perfil de producción de citoquinas efectoras que las caracteriza.

ILC 1: este subtipo se caracteriza por la expresión del factor de transcripción T-Bet y el marcador de superficie NK1.1, el cual comparte con las células NK. Su perfil de citoquinas

producidas es de tipo Th1, destacando el IFN $\gamma$ , cuya secreción es estimulada por la recepción de citoquinas como IL12, IL21, IL15 e IL18 [135].

ILC 2; en este caso expresan preferentemente el factor de transcripción GATA3, el cual determina su característico perfil de citoquinas liberadas con el sello Th2, entre las que destacan la IL4, IL5, IL13 y anfiregulina [136]. Los mediadores que estimulan dicha secreción son la IL25, IL33 o el TSLP para los cuales presentan receptores específicos.

ILC 3; estas células se encuentran funcionalmente dirigidas por su característica expresión del factor de transcripción ROR $\gamma$ t. Mientras que los dos subtipos descritos arriba están preferentemente relacionados con la inducción de respuestas adaptativas de tipo Th1 y Th2, las ILC 3 están orientadas hacia la regulación de la homeostasis de los epitelios que revisten las mucosas, siendo esto posible gracias a su capacidad para producir IL22, IL27 e IL17 con efecto estimulador de la proliferación celular en dichos tejidos.

### 1.4. Sistema inmunitario adaptativo

La respuesta inmunitaria adaptativa se diferencia de la innata esencialmente en tres características, presenta un desarrollo mucho más lento, está focalizada en un antígeno específico y a nivel celular esta mediada por linfocitos B y T.

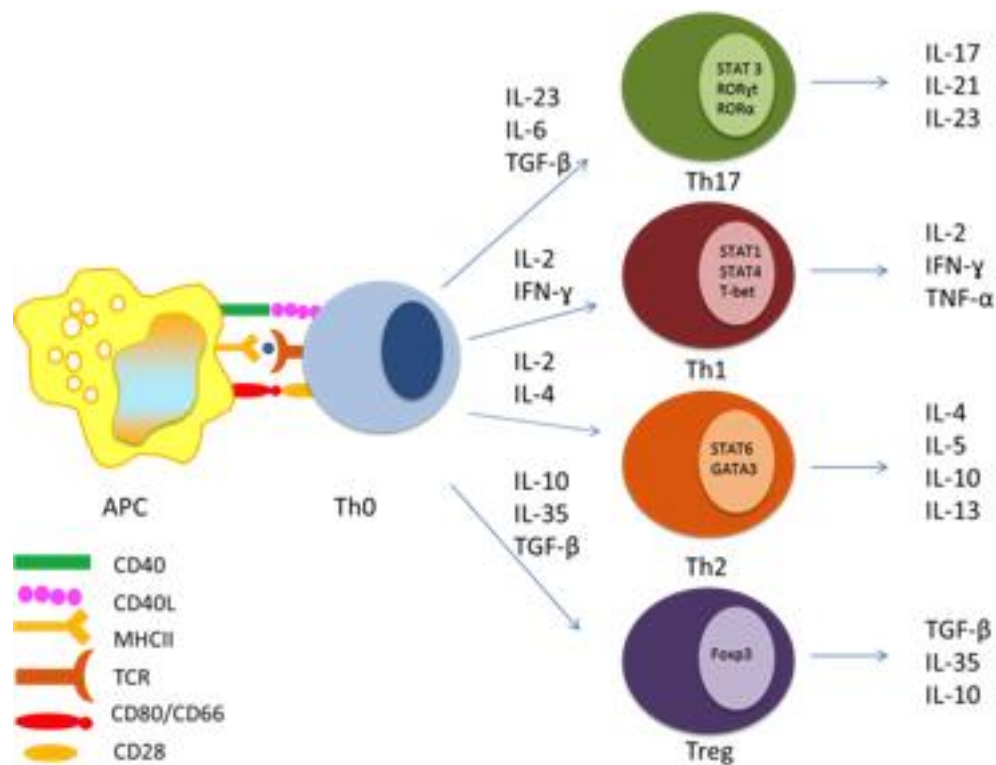
#### 1.4.1. Linfocitos T en el GALT

La gran mayoría de los linfocitos residentes en el GALT son linfocitos T TCR $\alpha\beta$ + CD4+ colaboradores vírgenes (Th0), caracterizados por una total inmadurez que deriva de no haber participado previamente en una sinapsis inmunológica. Además en el GALT hay una presencia representativa de células T CD8+ citotóxicas, funcionalmente especializadas en la destrucción de células del hospedador infectadas por virus. Estas, del mismo modo que se describe más adelante para las CD4+, requieren la presentación del antígeno para el cual tienen especificidad antigénica para activarse y madurar, pero con posterioridad a dicho evento no sufren un proceso de polarización selectiva hacia un subtipo específico como sí ocurre en el caso de las CD4+.

Los linfocitos que se encuentran formando parte de los folículos linfoides en el GALT, se sitúan precisamente ahí gracias a la expresión de marcadores de superficie como la L-selectina y el  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 (LPAM-1), los cuales interactúan con ciertas moléculas expresadas en dichos órganos linfoides secundarios como MadCAM1 y GlyCAM1. La activación de estas células T requiere el reconocimiento específico del antígeno para el cual su TCR muestra reactividad inmunológica específica, para lo cual dicho antígeno debe ser presentado al TCR en el contexto de la molécula principal de histocompatibilidad (MHCI para T CD8+ y MHCII para T CD4+) aportado por las células APC, que a su vez expresan marcadores superficiales como el CD40 que ejercen funciones de co-estimulación. Aquellos linfocitos que no sufran la presentación de su antígeno específico dejarán el órgano linfoide secundario vía linfática eferente, para seguir en su búsqueda en otro tejido. Los linfocitos T CD4+ inmaduros o Th0 presentan una enorme plasticidad funcional, que se refleja claramente en su capacidad de diferenciación hacia los subtipos Th1, Th2, Th17 y Treg, dependiendo esencialmente del contexto inmunológico en general y los mediadores solubles en particular que se encuentren presentes cuando se establece la sinapsis inmunológica. Pero dicha plasticidad no es una característica que estos linfocitos presenten exclusivamente mientras son

inmaduras, sino que de forma contraria al concepto estanco e irreversible que se tenía sobre los diferentes subtipos funcionales linfocitarios hasta hace muy poco tiempo, un linfocito ya comprometido hacia un subtipo determinado puede evolucionar hacia otro si el entorno es el adecuado desde un punto de vista inmunológico. De hecho, hoy en día está perfectamente descrita la plasticidad bidireccional constante entre Th17 y Th1 [137, 138], entre Th17 y Th2 [139], e incluso sorprendentemente, cierta plasticidad unidireccional desde Th17 hacia Treg [140, 141], siendo todas ellas descritas atendiendo al perfil de citoquinas producidas y la expresión de factores de transcripción característicos de cada subtipo.

El perfil de citoquinas preferentemente producidas por cada uno de los subtipos hacia los que en general puede polarizar una célula T CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> inmadura (Th0), así como los factores de transcripción que los definen, quedan esquemáticamente reflejados en la Imagen 2.



**Imagen 2:** Diferenciación de los linfocitos T CD4

Como ya se ha comentado anteriormente, es la composición cuali/cuantitativa en los diferentes mediadores solubles producidos por la APC la que determina el destino de los linfocitos T CD4 inmaduros hacia uno u otro subtipo [142]. Además, estos linfocitos activados en el GALT suelen localizarse como linfocitos residentes en la mucosa intestinal, lo cual es funcionalmente lógico pues estas células han sido activadas de un modo antígeno-específico con un antígeno originariamente procedente de la luz intestinal. La impresión del sello de localización intestinal (*gut homing*) caracterizado por la expresión en superficie de  $\alpha 4\beta 7$ , L-selectina y el receptor de quimioquinas CCR9, depende una vez más del entorno que genere la APC durante la sinapsis inmunológica, siendo en este sentido decisiva la liberación por su parte de RA como ya se ha descrito en detalle previamente.



### 1.4.2. Linfocitos de lámina propia (LPL)

Las células que aparecen en la lámina propia son bastante diferentes de las que podemos encontrar en un homogenado de GALT. Mientras que en el GALT hay una proporción muy baja de células plasmáticas y prácticamente todo lo que encontramos son linfocitos T (CD3+) y B (CD19+) en similar proporción entre sí, en la lamina propia podemos hacer una distinción entre el análisis por FACs de células mononucleares pequeñas y las relativamente grandes. Entre las pequeñas en torno a un 80% son linfocitos T con una proporción 2:1 CD4:CD8, mientras que el resto son linfocitos B no desarrollados. Pero al contrario de lo observado en el GALT, en la lámina propia hay una presencia muy significativa de células de gran tamaño entre las cuales la inmensa mayoría son células plasmáticas productoras de anticuerpos, principalmente sIgA [143, 144].

Los linfocitos T y células plasmáticas de lámina propia presentan dicha localización íntimamente asociada con la mucosa intestinal gracias a que presentan el ya descrito sello superficial que implica el *gut homing*. En condiciones de homeostasis intestinal, estos linfocitos T tienen muy escasa actividad proliferativa y un comportamiento anérgico, fenómeno que parece ser decisivo en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica ante la carga antigénica luminal [145].

### 1.4.3. Linfocitos intraepiteliales (IEL)

La primera característica llamativa de los IEL es que son casi exclusivamente linfocitos T, y a diferencia de lo que ocurre en sangre periférica y en lamina propia, la mayoría expresan en su superficie el antígeno CD8, lo cual parece estar relacionado con la mayor proximidad de estos al medio externo, siendo en dicha localización muy necesaria la actividad citotóxica directa de estas células.

Los IEL expresan TCR $\alpha\beta$  o TCR $\gamma\delta$ , llegando los segundos a alcanzar en muchas ocasiones hasta el 60% del total de su representación en el intestino delgado. Son células que ya están experimentadas en todo caso ante el reconocimiento antigénico, lo que implica que expresen marcadores de activación como CD44 y CD69. Además expresan CD103, lo que les permite anclarse a la E-cadherina del epitelio, y CD8 $\alpha\alpha$  (*thymus leukemia antigen*, TLA).

Los linfocitos intraepiteliales pueden ser clasificados de forma general como “naturales” o “inducidos”. Los naturales son células que vienen definidas por la expresión de TCR $\alpha\beta$  o TCR $\gamma\delta$ , y que han sido educadas a nivel antigénico en el timo, desde donde son dirigidas hacia su lugar de residencia final en el epitelio intestinal. Además su carencia en cuanto a expresión de CD4 o CD8, quizá la característica más llamativa de estas células es que se dispone de un número de ellas determinado el cual no varía desde el momento del nacimiento hasta la muerte del hospedador, siendo estas dirigidas hacia el epitelio por la expresión de E-cadherina en el tejido diana y un gradiente de CCL25. Este grupo celular no requiere de activación expresa de su TCR mediante presentación vía MHC, por lo que pueden responder de forma autónoma a PAMP y proteínas no procesadas, lo cual refleja un comportamiento innato destacable. Los IEL inducidos en el momento del nacimiento representan un número muy reducido, pero con la exposición de la mucosa del individuo a antígenos microbianos y de la dieta se va produciendo la activación y reclutamiento de estos, de modo que paulatinamente la relación naturales/inducidos va decantándose hacia los segundos que con el transcurso de los años terminan siendo mayoritarios, lo que justifica su escasez en los ratones *germ-free* nacidos por cesárea y mantenidos en condiciones de esterilidad.

Los IEL inducidos son siempre TCR $\alpha\beta$ , pudiendo ser a su vez CD4 o CD8, aunque en estas células se produce fenómenos de plasticidad muy interesantes en virtud de los cuales cierta proporción de células CD4 cambian dicha expresión por la de CD8. La activación y reclutamiento se suele dar en las placas de Peyer o en los MLN donde linfocitos T vírgenes encuentran antígenos derivados de la microbiota o la dieta, se activan, y de un modo dependiente de moléculas de adhesión y de localización en mucosa (LFA-1, VLA-1,  $\alpha4\beta7$  y CCR9), terminan infiltrándose en el epitelio intestinal [146].

Existen algunos trabajos que relacionan la hiperactivación de IEL tanto naturales como inducidos con la exacerbación de algunos modelos experimentales de inflamación intestinal, ya sea por un excesiva actividad citotóxica local o por una elevada producción de citoquinas proinflamatorias, principalmente del sello Th17. Esto parece lógico teniendo en cuenta la localización de estas células en la primera línea de exposición a los antígenos de la microbiota intestinal, pero como se describe a continuación, es esa precisa razón la que justifica el efecto protector que diferentes subtipos linfocitarios incluidos dentro de los IEL presentan ante el desarrollo de diversos modelos de colitis experimental y la homeostasis del epitelio intestinal en general.

Los IEL naturales TCR $\gamma\delta$  en virtud de sus acciones regulando positivamente la producción de sIgA por parte de células plasmáticas y produciendo ellas mismas IL22 y KGF ante una agresión al epitelio presentan un papel protector ante modelos de colitis experimental de tipo infeccioso [147, 148] o inducida por DSS [149, 150]. En cambio a las IEL naturales TCR $\alpha\beta$  CD8 $\alpha\alpha$  se les atribuye una función relevante en la inmunovigilancia antitumoral en los epitelios mucosales.

Entre los IEL inducidos, la inmensa mayoría son TCR $\alpha\beta$  CD8, pero es precisamente la población menos abundante (TCR $\alpha\beta$  CD4) la que parece tener un papel más relevante en la homeostasis intestinal manteniendo la competencia en la función de barrera epitelial. En los enfermos con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), que sufren una depleción específica en las células CD4 en general, esta población es prácticamente eliminada y ello justifica al menos en parte la enteropatología acompañada de significativa translocación bacteriana que forma parte del típico cuadro clínico de estos pacientes [151].

#### 1.4.4. Linfocitos B

Los linfocitos B en la mucosa intestinal requieren una activación específica dependiente de los linfocitos T, la cual permite el cambio de isotipo hacia IgA, independientemente de la señalización de PAMP sobre los TLR de la célula B inmadura que es la señal primaria que promueve dicho proceso [152, 153]. El subtipo linfocitario *T follicular helper* (Tfh) es decisivo para la maduración y la diferenciación final de las células B de los centros germinales hacia células plasmáticas, siendo este proceso específicamente regulado en la mucosa intestinal para conseguir la diferenciación hacia células plasmáticas específicamente productoras de IgA. Concretamente, es un subtipo de células Th17 presentes en las placas de Peyer o en los ILF el que de un modo independiente de IL23, que suele ser decisiva para la estimulación funcional de estas células, y haciendo gala de una marcada plasticidad, se polariza hacia Thf, colaborando de ese modo decisivamente en la inducción del cambio de isotipo hacia IgA en las células B en el contexto intestinal [154, 155]. Una vez activada la célula B y con el cambio de isotipo desarrollado, esta migra hacia MLN y finalmente desde allí va a localizarse en su mayoría en la lámina propia desde donde liberará la sIgA en dirección hacia la luz

intestinal. Una vez que esa sIgA ha sido transportada por vía transepitelial mediante transportadores específicos hasta el lumen, esta actúa como elemento inmunitario innato fijando y neutralizando virus, bacterias y antígenos o toxinas derivados de estos, impidiendo su contacto con la mucosa intestinal.

## 2. MICROBIOTA

La microbiota residente en el tracto gastrointestinal humano está compuesta por alrededor de 100 trillones de microorganismos, pudiendo llegar a suponer una parte representativa del peso del hospedador de entre 1 y 2 kg, siendo la inmensa mayoría de naturaleza bacteriana, aunque haya cierta representación residual de algunos hongos eucariotas, virus y arqueas. Esa ingente cantidad de bacterias se dispone en términos cuantitativos siguiendo un gradiente positivo hacia la zona distal del tracto gastrointestinal, presentando además una gran heterogeneidad, de modo que podemos encontrar representadas entre 300-1000 especies diferentes [156]. Hasta hace escasamente dos décadas, el estudio de la microbiota intestinal desde un punto de vista cualitativo era muy limitado debido a la imposibilidad de realizar un cultivo fiable de la mayoría de las bacterias presentes en ella. Sin embargo, desde el desarrollo de la tecnología de la pirosecuenciación en masa esta situación ha sufrido un giro radical, ya que esta permite la identificación de los diferentes *filum* bacterianos presentes y conocer su abundancia relativa, en base a la especificidad de determinados segmentos de la secuencia de genes conservados en todas las especies bacterianas, destacando el uso en ese sentido del 16S rRNA bacteriano [157, 158]. A raíz del florecimiento de este tipo de estudios, apareció el concepto de microbioma, con el cual hoy en día se está muy familiarizado en el campo de la gastroenterología clínica y experimental, así como en otros campos de la medicina dada la creciente relevancia que la microbiota intestinal está adquiriendo en desórdenes de muy diferente naturaleza como se describirá más adelante.

Lógicamente la primera reflexión que surge es la razón por la cual el organismo permite la colonización bacteriana de su tracto gastrointestinal, teniendo en cuenta lo complejo y costoso del sistema inmunitario que debe disponer en dicho entorno para evitar precisamente la translocación y el acceso de dicha microbiota o sus determinantes antigénicos al interior del hospedador. La respuesta a esta cuestión reside en algunos de los conceptos que a continuación se citan. En general, las bacterias que componen la microbiota son en su mayoría de carácter comensal, aunque siempre hay cierta representación de bacterias patógenas e indeseables cuya abundancia relativa es mínima precisamente gracias a la presión que ejercen las comensales limitando el espacio y recursos que estas últimas tienen disponible para su desarrollo y proliferación por un mecanismo de competencia. El caso mejor descrito de este tipo de relación es la restricción del desarrollo de las bacterias patógenas *Clostridium difficile* y *Salmonella* [159] por parte de las bacterias comensales en condiciones normales, y como ante la aplicación de algunas terapias con antibióticos vía oral estas bacterias comensales se ven específicamente deplecionadas y ello permite el desarrollo descontrolado de las patógenas. Independientemente de lo anterior, las bacterias comensales establecen una relación de simbiosis con el hospedador, ya que por un lado aprovechan el entorno favorable y rico en nutrientes que supone el tracto gastrointestinal, mientras que por el otro son imprescindibles en el aporte de algunos nutrientes esenciales para el hospedador como la vitamina K o vitamina B12 y generan como producto de sus procesos fermentativos sustancias como el butirato o propionato que presentan efectos relevantes y bien caracterizados favoreciendo la proliferación y maduración del epitelio intestinal. Otro efecto beneficioso bien descrito de la microbiota sobre el intestino deriva del contacto directo de las bacterias con las células epiteliales de la mucosa intestinal, del cual depende directamente la expresión del repertorio enzimático esencial en la función digestiva que estas células expresan en su borde apical [160].

De forma general se asume que la colonización microbiana del tracto gastrointestinal se da en el momento del nacimiento, siendo durante las primeras horas de vida cuando adquiere la mayor parte de la diversidad bacteriana con la que contará el individuo durante su vida. Sin embargo, estudios recientes han puesto de manifiesto la presencia de cierta microbiota en el meconio recogido en condiciones de esterilidad, presentando esta un perfil cualitativo muy diferente al de la que se adquiere tras el nacimiento, lo que pone en cuestión el dogma hasta hace poco establecido según el cual el feto se desarrollaba en condiciones de estricta esterilidad [161, 162]. Se conoce muy poco acerca de la procedencia y relevancia funcional de estas bacterias que generan el llamado “microbioma fetal”, pero hay estudios que apuntan a que deben acceder a la placenta procedentes de un fenómeno de translocación bacteriana constitutiva en el entorno mesentérico materno [163, 164], y que funcionalmente deben colaborar con el proceso de maduración intestinal intrauterino. En cualquier caso, la adquisición temprana de la microbiota intestinal tiene un papel relevante en el normal desarrollo estructural y funcional del GALT, así como en la inducción de maduración de las poblaciones celulares que lo componen. Además se le atribuye un papel pro-angiogénico de tipo indirecto en la medida que su señalización sobre los PRR de las células de Paneth estimula en estas la liberación de ciertos mediadores solubles con dicho efecto [165], siendo esto relevante en la maduración del propio epitelio intestinal.

La microbiota intestinal sufre una evolución en su composición cualitativa a lo largo de la vida del hospedador. De este modo, mientras que en el momento de la colonización durante las primeras horas de vida esta está muy enriquecida en anaerobios estrictos como *Bacteriodes* y *Bifidobacterium spp.*, esta situación va evolucionando paulatinamente con un enriquecimiento relativo en Firmicutes y Bacterioidetes [156] que son las predominantes en la luz intestinal de un adulto, hasta que entre los 3-5 años de vida el hospedador, este cuenta con una microbiota plenamente desarrollada en términos cuanti-cualitativos.

En los últimos años se ha atribuido a la microbiota intestinal una gran relevancia difícil de imaginar hace poco tiempo, sobre la instauración y desarrollo de muchas patologías de carácter no infeccioso y de etiología muy diversa. Independientemente de la EII y el cáncer colorectal (CRC) cuyo caso será descrito en detalle más adelante, entre los desórdenes que se asocian al menos de forma parcial con una disbiosis intestinal destacan: el síndrome metabólico, en el que se ha demostrado que el trasplante de la microbiota de animales obesos sobre animales libres de gérmenes los predispone a desarrollar dicho desorden [166]; el síndrome de intestino irritable, la aterosclerosis, la artritis reumatoide, la espondilitis anquilosante, el desarrollo de procesos alérgicos (relacionados con la denominada “teoría de la higiene”) [167], e incluso alteraciones de índole psiquiátrica como la depresión, el estrés o incluso el autismo [168].

En referencia al caso del CRC, en efecto la señalización de los determinantes antigénicos derivados algunos géneros bacterianos como *Fusobacterium* y *Escherichia* parecen ser decisivos, por un lado en la generación de un estado inflamatorio subyacente que favorece la génesis de las células epiteliales transformadas en un principio, y por otro en el aporte de señales favorecedoras de la proliferación de estas y de la angiogénesis asociada [169]. Estas observaciones se ven apoyadas con otro trabajo que muestra como la microbiota disbiótica generada con dieta rica en grasa, favorece el desarrollo de CRC experimental de un modo independiente de la obesidad en sí misma [170].

La presencia de la microbiota intestinal no es imprescindible para la supervivencia del individuo, lo cual ha sido constatado mediante la generación de ratones nacidos por cesárea y mantenidos bajo condiciones de esterilidad en aislador. Estos son perfectamente viables, pero al mismo tiempo muestran ciertas alteraciones a diversos niveles, aunque centrando la atención en el tracto gastrointestinal se observan alteraciones relacionadas esencialmente con la maduración y actividad proliferativa del epitelio intestinal, con un menor grado de desarrollo estructural del GALT y sobre todo con una menor maduración y competencia inmunitaria de las células que se localizan en dichas estructuras. Entre el sistema inmunitario gastrointestinal y la microbiota presente en la luz del mismo se establece un diálogo bidireccional, para cuyo establecimiento es necesaria la presencia en las células del hospedador de un sistema receptorial que permita integrar la señales procedentes de las bacterias y sus determinantes antigénicos. El conjunto de estos receptores y sus diferentes tipos, se describen detalladamente en el siguiente apartado.

## **2.1. Receptores de reconocimiento de patógenos**

El establecimiento de una comunicación estrechamente regulada entre la microbiota intestinal y las células con función inmunológica del hospedador resulta esencial para afrontar con perspectivas de éxito el reto que supone, por un lado, mantener un comportamiento tolerante frente a las bacterias comensales y, por el otro, la capacidad de generar respuestas inmunes lo suficientemente robustas como para eliminar los microorganismos patógenos, sin que esto último de lugar a un proceso inflamatorio descontrolado desencadenante de una patología de carácter crónico. En este proceso el sistema inmune innato es mucho más relevante que el adaptativo. Esto es así porque las células del sistema inmune innato suponen la primera línea de defensa en la mucosa intestinal, de modo que van a ser las primeras en detectar los microorganismos invasores, independientemente de que de forma secundaria se pueda desencadenar una vertiente adaptativa durante la respuesta del hospedador. El sistema receptorial del que hace uso preferentemente el sistema inmune innato para la detección de microorganismos o de productos derivados de ellos, recibe el nombre de receptores de reconocimiento de patógenos (PRR). Por tanto, estos PRR estarán ampliamente distribuidos entre las células epiteliales intestinales, macrófagos, DC, ILC, células NK y neutrófilos, aunque del mismo modo hay cierta expresión pero de menor grado de algunos de ellos en células pertenecientes a la inmunidad adaptativa, como células T [171] y células B [153] residentes en el GALT.

Los PRR reconocen diferentes PAMP altamente conservados a nivel evolutivo, de forma que con un repertorio bastante limitado de PRR el sistema inmune intestinal innato es capaz de reconocer a la práctica totalidad de microorganismos que puede encontrar provenientes de la luz intestinal. Además los PRR tienen la capacidad de reconocer a algunas alarminas (DAMP), siendo un ejemplo destacado la calprotectina. Dado que los PAMP están presentes por igual en los microorganismos comensales y en los patógenos, para ser más precisos deberíamos hablar de patrones moleculares asociados a microbios (MAMP), puesto que la mayor parte de este diálogo cruzado que estamos describiendo se establece con bacterias comensales beneficiosas y en condiciones de homeostasis intestinal [172].

En general, la estimulación de los PRR implica la activación de diversas cascadas de señalización que van a terminar provocando liberación de citoquinas pro-inflamatorias o de péptidos antimicrobianos, en función del tipo celular en cuestión [74]. Los PRR se clasifican de

forma general en tres familias; *toll-like receptors* (TLR), *nucleotide binding oligomerisation domain-like receptors* (NLR) y *retinoic acid induced-like receptors* (RLR).

### 2.1.2. Toll-like receptors (TLR)

Los TLR son proteínas transmembrana de tipo I, presentes en macrófagos, DC, células epiteliales, células endoteliales, células estromales, e incluso en algunas células T y B. Estructuralmente presentan una región extracelular que contiene repeticiones ricas en leucina (LRR) que le confieren la especificidad por el ligando, y una región intracelular denominada dominio TIR (debido a su similitud con la familia de receptores de la IL1), que se encarga de desencadenar la cascada de transducción de señal a nivel intracelular [173]. Una vez unido el ligando, se produce generalmente una homodimerización del receptor de modo que los dominios TIR contactan entre sí, lo cual constituye la señal que determina la unión de los complejos de proteínas adaptadoras. Todos los TLR, con la única excepción del TLR3, utilizan como proteína adaptadora a MyD88, formando esta parte de un complejo que estará formado por la asociación de algunas de las siguientes proteínas; TIRAP, TRIF, TRAM, SARM, cuya combinación relativa será una u otra en función del TLR considerado. Como se puede observar en la Imagen 3, tras el reclutamiento de las proteínas adaptadoras se activa en la mayoría de los casos la ruta canónica de *nuclear factor κ-B* (NF-κB) y las *mitogen activated protein kinases* (MAPK) en ambos casos de forma dependiente de la proteína TAK1, proceso que será descrito en detalle más adelante, o bien la ruta alternativa dependiente de la proteína *TRAF family member-associated NF-κB activator binding kinase-1* (TBK1) la cual utiliza como factor de transcripción a *interferon regulatory transcription factor* (IRF3) y estimula la síntesis de interferones de tipo I (IFNα e IFNβ) [174].

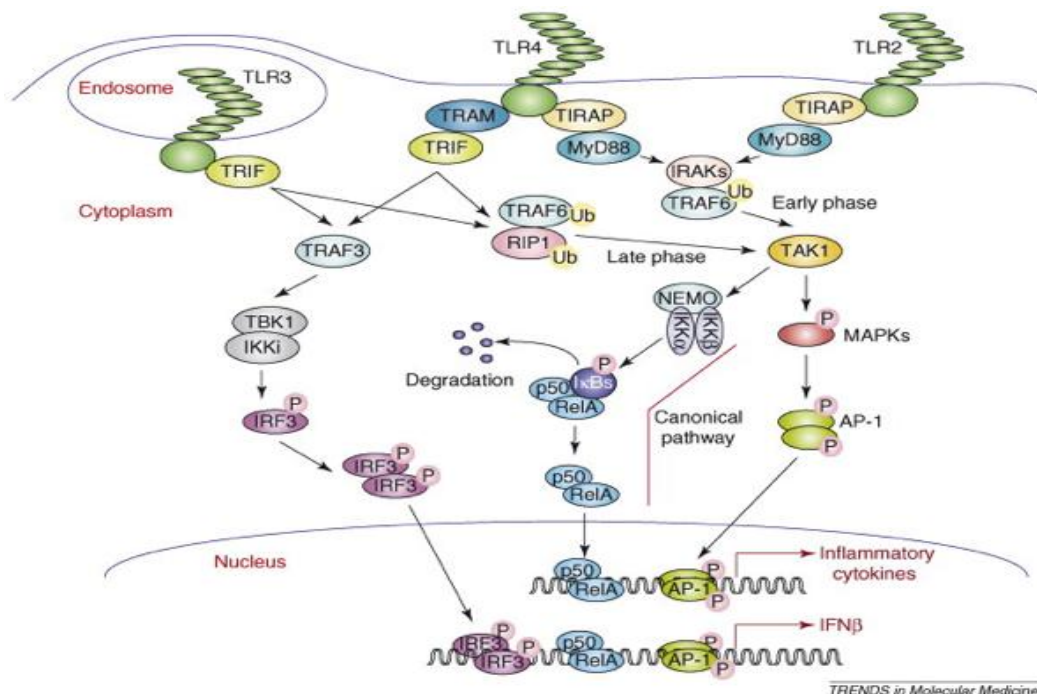


Imagen 3: Ruta de señalización intracelular de los TLR

Tabla 3: Patrón de expresión de TLR y sus ligandos

| TLR       | Ligandos  | Células   | Localización celular              |
|-----------|---|---|-----------------------------------|
| TLR1/2    | Lipopéptido bacteriano<br>Proteínas procedentes de protozoos parásitos (T. cruzi, C52, profilin)  | Mayoría de las células incluyendo células dendríticas IEC   | Membrana plasmática               |
| TLR2      | Lipoproteínas bacterianas/lipopeptidos, peptidoglicanos, ácido lipoteicoico, porinas, zimosán<br>Proteínas víricas estructurales (Lipoarabinomano)<br>Lípidos procedentes de helmintos<br>Componentes de la pared celular de hongos<br>HSP60, HSP70, HSP96, HMGB1, ácido hialurónico de carácter endógeno   | IEC, células de Paneth, leucocitos mononucleares periféricos, células dendríticas, monocitos y células                                      | Membrana plasmática               |
| TLR3      | ARN vírico, RNm Poly(I:C), Poly(I:C <sub>12</sub> U)<br>RNAm endógeno   | IEC, células dendríticas, células NK y células  | Endosomas                         |
| TLR4      | Lipopolisacárido bacteriano<br>proteínas de envoltura víricas<br>Protozoos parásitos<br>Glicoinositolfolípidos (Trypanosoma cruzi)<br>Componentes de la pared celular de hongos<br>HSP22, HSP60, HSP70, HSP96, HMGB, defensina $\alpha$ , $\beta$ , dominio de la fibronectina, ácido hialurónico, sulfato de heparina, fibrinógeno, proteína A sulfactante | IEC, células de Paneth, macrófagos, células dendríticas y células   | Membrana plasmática               |
| TLR5      | Flagelina   | IEC, células de Paneth, monocitos, células dendríticas, células NK y células  | Membrana plasmática               |
| TLR6/TLR2 | Lipopéptidos bacterianos, ácido lipoteicoico<br>Modulina soluble en fenol, zimosán  | IEC, alta expresión en células B y células dendríticas, baja expresión en monocitos y NK  | Membrana plasmática               |
| TLR7      | ARN de cadena simple de origen vírico<br>ARN endógeno   | IEC, células B, células dendríticas, monocitos y células  | Endolisoma                        |
| TLR8      | ARN de cadena simple de origen vírico<br>ARN endógeno   | IEC, monocitos, células dendríticas, células NK y células   | Endolisoma                        |
| TLR9      | motivos CpG no metilados procedentes de bacterias, virus y protozoos parásitos<br>Hemozoina procedente de protozoos parásitos (Plasmodium)<br>oligodesoxinucleótidos CpG endógenos  | IEC, Células de Paneth, células dendríticas, células B, leucocitos mononucleares periféricos, macrófagos, células NK y células microgliales | Endolisomas y membrana plasmática |
| TLR10     | Desconocido, podría interactuar con TLR2 y TLR1   | Células B, células dendríticas, monocitos y células   | Intracelular                      |
| TLR11     | Superficie celular de bacterias uropatógenas,<br>Moléculas tipo profilina de Toxoplasma gondii  |   | Membrana plasmática               |



Hasta la fecha han sido descritos en el ser humano 11 receptores pertenecientes a la familia de los TLR, descritos todos ellos en detalle en la Tabla 3. Estos reconocen a PAMP procedentes de bacterias pero también a otros presentes en virus, hongos o protozoos [175].

En el tracto gastrointestinal de un organismo con una microbiota intacta, las células que poseen estos TLR (principalmente las células epiteliales intestinales en este caso) están en un contacto íntimo y continuo con los ligandos para estos receptores procedentes de la microbiota intestinal. Sin embargo, estas células no responden iniciando una respuesta inflamatoria como se podría esperar atendiendo a las consecuencias de la activación de TLR antes descritas, sino que en condiciones de homeostasis intestinal muestran un comportamiento tolerante hacia dichas señales [176]. Esa tolerancia inmunológica que se traduce en una señalización de perfil bajo en los TLR no es óbice para que dicha percepción de los antígenos luminales sea aprovechada para, por un lado, mantener la homeostasis epitelial en cuanto a su estado proliferativo y su capacidad de restitución ante una posible agresión, así como el mantenimiento de una adecuada expresión de proteínas de unión estrecha, péptidos antimicrobianos y la producción de quimioquinas (CXCL1/KC o MCP1), y por el otro, para aportar una estimulación sutil pero constante sobre los elementos celulares del sistema inmune innato mucosal que se mantienen así mucho más preparados para combatir una posible agresión que si esta señalización no existiera. También la competencia de la vertiente adaptativa se ve favorecida por dicha señalización, al ser decisiva en la producción de sIgA como ya se ha comentado.

Otro aspecto que ilustra muy bien el delicado equilibrio que en condiciones homeostáticas controla la señalización de los TLR en las células epiteliales intestinales es la expresión específica de algunos de ellos en un extremo concreto de la estructura polarizada de las mismas, siendo la consecuencia de su señalización radicalmente opuesta en función de su localización [74]. Así, el TLR5 se expresa únicamente en la cara basolateral de estas células, lo que implica su respuesta exclusiva ante bacterias que ya han atravesado la barrera epitelial. Esto justifica el hecho de que la flagelina carezca de efecto alguno al ser administrada a animales sanos, alcanzando solo el TLR5 cuando el epitelio está desorganizado como ocurre en la colitis inducida por DSS, aportando en ese caso un beneficio desde el punto de vista de la evolución del proceso inflamatorio en el animal dado que los ratones TLR5 *knock out* son más susceptibles a este modelo [177]. Otro caso curioso es el del TLR9, el cual se expresa en las caras apical y basolateral por igual, pero al encontrar a su ligando responde de un modo tolerante en el primer caso e inflamatorio en el segundo, estableciéndose una relación de tolerancia cruzada [178]. Los dos ejemplos citados se encuentran insertados en la membrana celular, pero algunos de estos receptores, por ejemplo TLR3 y TLR7, presentan localización intracelular (endosomas), lo cual es funcionalmente lógico teniendo en cuenta que reconocen PAMP de naturaleza viral. En general, estas respuestas con una consecuencia divergente en función de la localización del TLR dentro de la estructura polarizada de una células epiteliales intestinales, están en consonancia con la idea de que el reconocimiento de un PAMP por un TLR solo debe dar lugar a una respuesta inflamatoria potencialmente perniciosa, cuando este es reconocido en un lugar que implica un compromiso en la barrera epitelial y por tanto es necesario construir una respuesta inmunológica efectora de forma inmediata.

Finalmente, cabe destacar que la expresión de los TLR no es estática, sino que sufre modificaciones en el caso de desarrollarse un proceso inflamatorio en la mucosa intestinal. En este sentido, el caso más estudiado es el de los receptores TLR2 y TLR4, los cuales en condiciones

normales presentan un bajo perfil de expresión en el colon humano, viéndose este incrementado al parecer preferentemente en el borde apical de las células epiteliales intestinales en pacientes con enfermedad de Crohn (EC), pero no en el caso de la colitis ulcerosa (CU) [179], lo cual parece lógico atendiendo a que este fenómeno depende fundamentalmente de la señalización de TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  [180]. Este fenómeno se da del mismo modo en los macrófagos de lámina propia de pacientes tanto con EC como con CU. Este aumento de la expresión de muchos de los TLR al desarrollarse un proceso inflamatorio, descrito a nivel clínico pero también en los modelos de colitis experimental, invita a pensar en un teórico papel conductor del proceso inflamatorio, y por tanto patogénico, para estos receptores. Sin embargo, al aplicar el modelo de colitis inducida por DSS a ratones *knock out* totales o condicionales en células epiteliales intestinales para diferentes TLR, se ha observado que estos son en general más susceptibles a la inducción de colitis. Este papel protector ha sido constatado por algunos TLR, como TLR2, TLR4, TLR5 y TLR9 [181]. Si bien el papel de estos receptores está esencialmente relacionado con la inmunidad innata intestinal, recientemente ha sido descrito el papel relevante que el TLR2 juega en el normal funcionamiento del sistema nervioso entérico, y la relación de este fenómeno con la mayor susceptibilidad de estos animales a la colitis por DSS [182, 183]. Por tanto, no es descartable que en los próximos años vayan saliendo a la luz nuevas implicaciones funcionalmente relevantes de los TLR en la homeostasis intestinal.

### 2.1.3. Nucleotide binding oligomerization domain-like receptors (NLR)

Los NLR comprenden una gran familia de PRR que tienen en común un dominio conservado denominado *nucleotide oligomerisation domain*. A nivel estructural, estos receptores cuentan con (1) una región de unión efectora N-terminal que presenta dominios de unión proteína-proteína, pudiendo ser estos, *caspase recruitment domain* (CARD), *pyrin domain* (PYR) y *baculovirus inhibitor repeat domain* (BIR); (2) un dominio de localización intermedia imprescindible para la oligomerización receptoral (NOD); (3) una región C-terminal que ostenta la especificidad antigénica, LRR. En función del tipo de dominio N-terminal que esté presente, se establecen las tres subfamilias existentes dentro de los NLR.

En ausencia de ligando, el dominio LRR se encuentra plegado sobre el NOD, de forma que se genera un impedimento estérico sobre la tendencia automática de este último a realizar un proceso de auto-oligomerización y la consecuente activación del NLR. En cambio, cuando un ligando se une a LRR se genera un cambio conformacional que permite la oligomerización antes descrita. Cuando esto ocurre, los dominios N-terminal exponen sus secuencias que permiten el reclutamiento de proteínas que compartan con ellas los dominios CARD o PYR [184]. En función del tipo de dominio N-terminal podremos distinguir dos subgrupos dentro de los NLR. Los NOD que presentan dicho dominio de tipo CARD, y los NALP que lo presentan tipo PYR. De ahora en adelante serán descritos únicamente los NOD, debido al profundo conocimiento que hoy en día se tiene de ellos y sobre todo a la asociación que se ha descrito entre mutaciones puntuales que afectan a sus genes codificantes y una mayor susceptibilidad al desarrollo de EII, aunque existen estudios en ratones que han levantado cierta controversia sobre el papel de este receptor en la homeostasis intestinal, como se detallará más adelante.

Los receptores NOD1 y NOD2 reconocen como ligandos específicos a moléculas de origen bacteriano que se generan durante la síntesis y/o degradación del peptidoglicano (PGN), de modo que mientras que NOD1 reconoce al dipéptido  $\lambda$ -D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid, NOD2 es

activado por muramildipéptido (MDP) [185]. El reconocimiento de estos ligandos induce el reclutamiento de la *receptor-interacting serine/threonine kinase* (RICK), mediante interacción homotípica mediada por dominios CARD presentes en esta proteína y en el dominio N-terminal del receptor en cuestión. A continuación, RICK media la ubiquitinación de NEMO, la cual al ser degradada permite la activación del complejo IKK formado las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , provocando la consecuente fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$  (Imagen 4). De forma alternativa RICK puede activar a TAK1. De ambas formas se descarga la cascada de señalización canónica de NF- $\kappa$ B, aunque la colaboración de TAK1 implica la activación paralela de la ruta de las MAPK que termina por inducir la translocación a núcleo del factor de transcripción AP1.

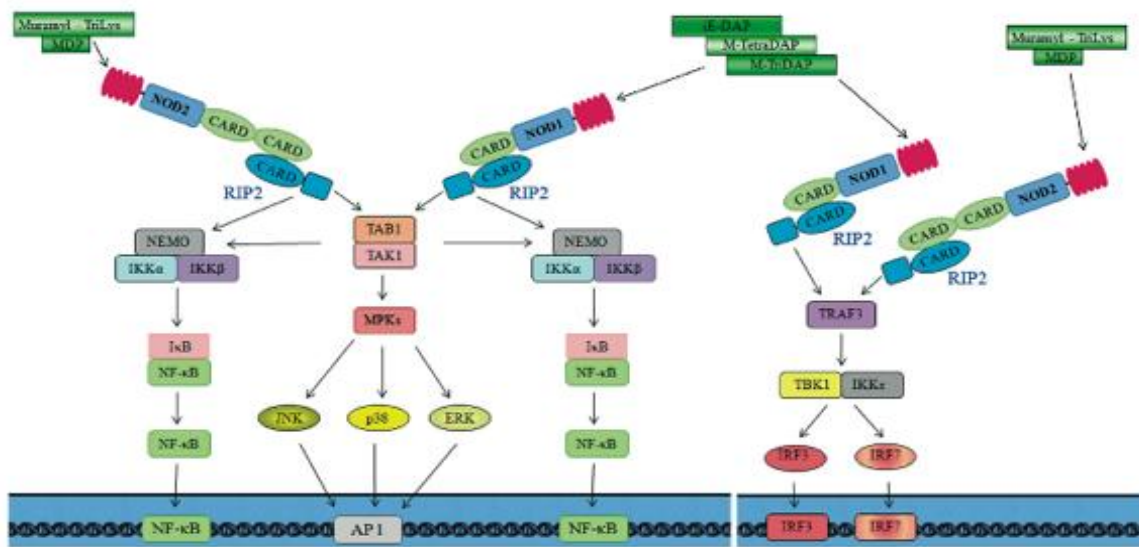


Imagen 4: Señalización de NOD1 y NOD2

De un modo paralelo a lo anteriormente descrito, NOD1 y NOD2 inducen el reclutamiento de RICK, el cual tiene la capacidad de unirse con la proteína adaptadora TRAF3. Esta proteína activa a la quinasa TBK1, que a su vez fosforila a los factores de transcripción IRF3 e IRF7, los cuales ante dicha señal homodimerizan y traslocan al núcleo donde van a inducir la expresión de interferones de tipo I (principalmente IFN $\beta$ ) mediante la interacción con los llamados *IFN-stimulated response elements* (ISRE) (Imagen 4). Dado que estos interferones de tipo I son esenciales en la inmunidad de carácter citotóxico que permite la destrucción de las células infectadas por virus, es lógico pensar que esta vertiente de la señalización de estos receptores es funcionalmente más relevante si cabe que la anterior al tratarse de receptores de localización intracelular [186].

Dado el papel relevante que se atribuye a NOD1 y NOD2 en el control de la inmunidad innata de la mucosa intestinal, diversos modelos de colitis experimental han sido realizados en animales carentes de estos receptores. Estos estudios muestran como los ratones NOD1 KO, pero sobre todo los NOD2 KO, son más susceptibles a la colitis inducida por DSS y por ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS). La peor evolución de la colitis experimental en estos animales se asocia a una mayor translocación bacteriana, derivada de una pérdida de competencia en la

función de barrera intestinal, la cual se caracteriza por una menor expresión de Reg3 $\gamma$  y una mayor permeabilidad paracelular [187].

#### 2.1.4. Retinoic acid induced-like receptors (RLR)

Los ácidos nucleicos son uno de los tipos de PAMP de mayor tamaño y con mayor representación relativa en la microbiota intestinal. Independientemente de los ácidos nucleicos de origen microbiano, las células eucariotas también lo contienen, siendo necesaria la localización de los PRR orientados al reconocimiento de estos en estructuras específicas en el interior celular, denominadas endosomas. En los endosomas se localizan PRR como por un lado TLR3, 7, 8 y 9, que reconocen RNA y DNA microbiano, mientras que en el propio citosol se encuentran RIG-I (representante principal de los RLR), MDA5 y LGP2, todos ellos con capacidad para reconocer a RNA de doble cadena (dsRNA) [188]. La significancia biológica de estos receptores deriva de la existencia de partículas virales con capacidad para inyectar este tipo de RNA en la célula hospedadora. De ahora en adelante y para tratar de simplificar, me centraré en la descripción exclusiva de RIG-I, al ser el ejemplo más representativo de este grupo receptorial.

A nivel estructural, RIG-I presenta una distribución tal como la que se describe a continuación: (1) en el extremo N-terminal presenta un dominio rico en CARD, análogo a los ya descritos anteriormente en el apartado de los NLR; (2) un dominio intermedio denominado DExD/H-box helicase (formado por las proteínas Hel1, Hel2 y Hel2i); (3) un extremo C-terminal (CTD). Desde el punto de vista funcional, en ausencia de ligando, RIG-I se encuentra plegado sobre sí mismo, pero la unión del dsRNA (< 300 pb), sobre el dominio que contiene helicasa o al CTD, implica la exposición de los restos CARD del dominio N-terminal y el reclutamiento sobre este de la proteína adaptadora *mitochondrial-antiviral signaling protein* (MAVS) [189, 190]. Esta proteína, una vez que polimeriza, tiene una gran capacidad de amplificación de la señal iniciada en un principio por RIG-I [191]. Una vez acontecida la asociación de filamentos de MAVS, generando el polímero activo en la membrana mitocondrial, esta realiza la activación mediante un proceso de fosforilación de la proteína TBK1 y del complejo IKK $\alpha/\beta$  antes citados. Estos van a desencadenar la activación de la cascada de los interferones de tipo I y la canónica de NF- $\kappa$ B, respectivamente [192], las cuales desembocan en toda una serie de respuestas a nivel celular encaminadas a la lucha contra la infección viral detectada. Al mismo tiempo, el complejo multimérico de MAVS precisamente al establecerse en la membrana de la mitocondria, genera una reordenación de esta que conlleva la pérdida del potencial de membrana y la muerte de la célula que en un principio el virus trataba de parasitar [193]. La relevancia inmunológica en la contención práctica de los virus presentes en la luz intestinal, quedó patente al ponerse de manifiesto que los ratones con delección específica en el receptor RIG-I, desarrollaban un biológicamente significativo proceso inflamatorio intestinal de una forma espontánea [181].

Según lo anterior, la formación del complejo multimérico de MAVS es el eje sobre el que pivota toda esta respuesta inmunitaria antiviral de carácter innato. Por tanto, no resulta extraño que muchos virus hayan desarrollado estrategias para evadir esta respuesta inmunológica, las cuales se centran en impedir mediante la producción de proteasas específicas, la normal polimerización del complejo proteico MAVS antes citado [194, 195].

### 2.1.5. Inflamasomas

Los inflamasomas son unos complejos multimoleculares formados por varias proteínas, que se encargan de la activación de la enzima proteolítica caspasa-1. Dicha activación es imprescindible para el procesamiento de los precursores inactivos de la IL1 $\beta$  y la IL18 (pro-IL1 $\beta$  y pro-IL18), lo que la convierte en una proteína muy importante para la liberación a la periferia de las formas biológicamente activas de estas citoquinas, siendo estas muy relevantes en la vertiente adaptativa del sistema inmunológico del hospedador.

Actualmente están descritos cuatro tipos de inflamasoma diferentes, cuya nomenclatura deriva del nombre de la proteína que actúa como eje central sobre el que se asocian el resto de proteínas que lo conforman. De este modo, tres de ellos utilizan un NLR como proteína principal, siendo estos los inflamasomas NLRP1, NLRP3 y NLRC4, mientras que el cuarto utiliza a la proteína *absent in melanoma 2* (AIM2) [196].

La enorme diversidad de PAMP que son capaces de activar un inflamasoma (RNA bacteriano, MDP, LPS...), implica que ello no depende de la especificidad antigénica de su proteína principal (por ejemplo NLRP3), y por tanto que el mecanismo de activación de estos debe ser más complejo y probablemente implicando dos fases bien diferenciadas. Aunque aún hoy en día no se conoce a ciencia cierta el mecanismo que conduce dicha activación, la teoría más aceptada para el más conocido de ellos, el NLRP3 es la siguiente. En principio se establece la primera fase que recibe el nombre de "*priming*", en la cual intervienen moléculas capaces de estimular a TLR, NOD1, NOD2 o al receptor de TNF; en definitiva, estímulos capaces de desencadenar la cascada canónica de NF- $\kappa$ B. Este proceso de pre-activación es estrictamente dependiente de proteínas implicadas en ella como MyD88 e IRAK1, aunque de un modo dependiente e independiente de la transcripción, respectivamente [197, 198]. Como consecuencia de la acción de este factor de transcripción se estimula la síntesis *de novo* de NLRP3, pro-IL1 $\beta$  y pro-IL18, cuya expresión en condiciones basales es demasiado baja como para que se pudiera producir una estimulación directa y funcionalmente relevante del inflamasoma NLRP3 [199-201]. Uno de los inhibidores mejor descritos de esta activación es el micro-RNA 223 [202], que tiene como diana el RNA mensajero codificante para NLRP3. Una vez se ha dado esta fase de "*priming*", se produce la activación propiamente dicha del complejo proteico, orientada a la activación de la caspasa-1 y la digestión de los precursores antes citados, dando lugar a las formas activas de IL1 $\beta$  e IL18. El estímulo desencadenante de este proceso aún es desconocido, aunque existen sospechas sobre el ATP actuando sobre el receptor purinérgico P2X7R, así como sobre algunas moléculas cristalinas de aluminio o silicio que lo podrían hacer tras ser fagocitados por la propia célula en cuestión [203].

Para terminar, es interesante reseñar que la necesidad de dos estímulos potentes, independientes y necesariamente simultáneos para la completa activación de los inflamasomas, supone en sí mismo un relevante mecanismo de control que limita el desarrollo de respuesta inflamatorias potencialmente dañinas para el hospedador, sin que estas estén justificadas.

### 2.1.6. C-type lectin receptors (CLR)

Los CLR son expresados esencialmente en la membrana celular de células de naturaleza mieloide, destacando monocitos, macrófagos y DC, así como en granulocitos. Los ligandos que se unen a estos receptores son generalmente restos de carbohidratos procedentes de la microbiota

intestinal, aunque también pueden tener origen en el propio hospedador o su dieta [204]. Algunos como dectin-1 y dectin-2 reconocen a ligandos de naturaleza microbiana, como el  $\beta$ -glucano y la manosa unida a lipoarabinomano, lo que les permite intervenir en las respuestas inmunes de tipo antifúngico y ser considerados PRR en el sentido original del término. Por otro lado, otros como Lox-1 y DNGR1 responden ante ligandos derivados del propio hospedador, como alarminas y restos de cuerpos apoptóticos.

Algunos de estos receptores tienen la curiosa capacidad de, tras captar el ligando endógeno en la superficie celular, de un modo directo y sin mediar proceso molecular alguno de señalización intracelular, internalizar dicho antígeno y dirigirlo hacia la maquinaria de procesamiento y presentación antigénica en el caso de que estemos hablando de una APC [205].

Un ejemplo bastante representativo de este grupo receptorial es dectin-1. Este receptor utiliza para su señalización intracelular una proteína adaptadora con motivos ITAM tipo hem. Estos mediante un proceso de fosforilación activan a la proteína adaptadora secundaria *spleen tyrosine kinase* (SYK), la cual actúa como centro de la señalización, pues desde ella se va a producir la activación de señalizaciones efectoras tan diferentes como la ruta canónica de NF- $\kappa$ B, la cascada de las MAPK, la activación del *nuclear factor for activated T cells* (NFAT) e incluso parece colaborar con la activación final del inflamasoma NLRP3 de un modo dependiente de la generación previa de especies reactivas de oxígeno. Lo más interesante del modo de señalización intracelular que utiliza dectin-1 tras unirse a su PAMP específico, el  $\beta$ -glucano, es que en última instancia termina por activar la práctica totalidad de los mecanismos de señalización celular que usan los PRR descritos con anterioridad, lo cual es fiel reflejo del alto grado de interconexión, en muchos casos con resultado sinérgico, que presentan estos receptores implicados en el reconocimiento de la microbiota intestinal [206].

### **2.1.7. Otros receptores relevantes en la inmunidad innata, ajenos a los PRR**

Receptores purinérgicos: este grupo receptorial tiene como ligandos a nucleótidos (destacando el ATP). Tanto en la mucosa intestinal como en el sistema nervioso entérico está relacionado con la regulación de alteraciones gastrointestinales asociadas de forma más o menos directa con la EII, afectando a funciones tan dispares como la motilidad intestinal, la secreción iónica y por tanto el flujo hidroelectrolítico, la sensibilidad visceral al dolor, e incluso se le atribuye cierto papel potenciador de la inmunidad innata en la mucosa intestinal contribuyendo de esa forma a la función de barrera epitelial [207-209]. En línea con el último concepto expuesto, hay estudios que apuntan a una asociación entre elevados niveles de adenosina desaminasa en suero y un peor pronóstico en pacientes afectados de CU [210]. Además, estos receptores están implicados en la regulación funcional de las células madre en general, y en el contexto específicamente intestinal en la regulación de su auto-renovación, así como de los procesos de proliferación, diferenciación y maduración de las células que estas van generando [211].

## **2.2. Animales axénicos, libres de gérmenes o *germ-free* (GF)**

Los animales libres de gérmenes, por definición, son aquellos que carecen de microorganismos vivos detectables, ya sean bacterias, virus, hongos, parásitos u organismos saprófitos. La obtención de estos animales requiere en primer lugar de la realización de una cesárea en condiciones

asépticas, y en segundo lugar de su mantenimiento en todo momento en aisladores bajo estrictas condiciones de esterilidad.

La ausencia de microbiota en el tracto gastrointestinal tiene un impacto relevante a muy diversos niveles en el organismo del hospedador, generándose un fenotipo que mayoritariamente revierte en el momento que se permite la colonización microbiana del individuo. La mayoría de ellos derivan de la ausencia de la normal señalización de la carga antigénica microbiana en el contexto de la mucosa intestinal y sus alrededores dado que es allí donde esta se concentra en mayor medida en condiciones normales, pero otros reflejan el impacto indirecto pero funcionalmente relevante de esta en procesos que se gestan en lugares distantes de la luz intestinal. En referencia a este último tipo de efectos cabe destacar que los animales GF presentan un menor metabolismo basal asociado con un mayor consumo de agua y comida, lo que justifica su cierta tendencia a la ganancia de peso [212]. Otro aspecto que se encuentra significativamente afectado es el metabolismo lipídico y de los ácidos biliares [213, 214], lo cual en un principio parecía sorprendente, pero evidencias clínicas y sobre todo experimentales más recientes establecen una conexión inequívoca entre la disbiosis y la obesidad como una vertiente del síndrome metabólico [215-217], apoyando esas primeras observaciones. En línea con este concepto, se ha descrito que los ratones GF son resistentes a la obesidad inducida por dieta rica en grasa [218] y que los ratones que reciben un trasplante fecal procedente de otros con obesidad previamente inducida, son significativamente más sensibles al modelo de obesidad antes citado. Otro factor que se ve afectado es la longevidad, de forma que los animales GF presentan una mayor esperanza de vida, siendo para ello especialmente importante la ausencia de exposición a microbiota alguna durante las primeras etapas de la vida [219]. Por otro lado, los animales GF son mucho más sensibles a la ansiedad y el estrés inducidos experimentalmente. Este fenómeno es dependiente, por una lado de una mayor sensibilidad del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HHA) que se traduce en una extraordinaria elevación de los niveles de corticosterona en plasma [220], y por el otro de un cambio sustancial del patrón de expresión génica en diferentes áreas del cerebelo y el hipocampo cerebrales, afectando a genes como el *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) y el receptor de glucocorticoides (GR) [220, 221]. Este último tipo de alteraciones son mucho más eficazmente reversibles si la colonización microbiana se permite en edades tempranas que cuando el animal alcanza la madurez [222].

En lo referente al campo de aplicación de esta tesis doctoral, resultan sin duda mucho más interesantes las alteraciones que se producen en la mucosa intestinal y el entorno mesentérico, las cuales por otro lado son más significativas que las anteriormente descritas dada la ingente cantidad de bacterias presentes en el tracto gastrointestinal bajo condiciones normales. En este sentido, los animales GF exhiben un acortamiento intenso de las criptas de la mucosa colónica asociado a una menor tasa de proliferación y restitución epitelial, una menor diferenciación de las células de Paneth y un peristaltismo intestinal menos activo. En términos macroscópicos, la primera característica que llama la atención en un animal GF es la presencia de un ciego de un tamaño y peso desproporcionados. Este fenómeno ha sido profusamente estudiado, de forma que hoy en día se acepta como causa subyacente la acumulación de sustancias que en condiciones normales serían degradadas por las bacterias comensales [223], principalmente moco y parte de la fibra de la dieta. Además, si bien hasta el ciego el transporte hidroelectrolítico es normal, siguiendo en dirección distal la ausencia de bacterias provoca una severa reducción en la absorción de agua que

paradójicamente se acompaña de un ligero aumento en la absorción de electrolitos como sodio y cloro probablemente por un hiperaldosteronismo sobrevenido, contribuyendo en definitiva también al aumento del tamaño del ciego [224].

La ausencia de microbiota tiene un gran impacto en el sistema inmunitario gastrointestinal, que aparece relativamente atrofiado en la medida que no recibe la señalización antigénica luminal que promueve su maduración y el desarrollo de su adecuada arquitectura estructural, así como su competencia inmunológica. Por tanto los animales GF presentan unos GALT muy poco desarrollados [225], lo que se traduce por ejemplo en una reducida producción de sIgA en la mucosa intestinal. Además, está demostrado que la señalización de los antígenos bacterianos sobre las células epiteliales intestinales en la mucosa intestinal es decisiva en el mantenimiento de un nivel basal de expresión de TLR adecuado que permita a este epitelio preparado para responder apropiadamente ante una hipotética agresión. De hecho, los ratones GF presentan una menor expresión en condiciones no inflamatorias de TLR2, TLR3, TLR4 y TLR5 [226]. En referencia a las células inmunes innatas del sistema gastrointestinal, su número y maduración en condiciones basales no se ve afectado por la ausencia de microbiota, pero sí se ha observado que su competencia desde un punto de vista funcional está afectada, siendo un ejemplo la menor producción de IL22 por parte de las ILC asociada a la señalización de IL25 cuya secreción esencialmente epitelial es dependiente de la percepción directa de la microbiota [227]. Un tipo celular que se ve directamente afectado son los IEL del subtipo inducido TCR $\alpha\beta$  los cuales aparecen en menor número en los animales GF, así como los IEL naturales TCR $\gamma\delta$  que por su parte ven limitada su funcionalidad más que su número [228, 229]. Estos efectos sobre las IEL son debidos a la ausencia de señalización microbiana directa sobre ellas, pero sobre todo de tipo indirecto por la ausencia de los factores tróficos derivados de las células epiteliales intestinales tras su percepción de la microbiota. Las células T CD4 de lámina propia, por su parte, sufren un descenso en la presencia de células polarizadas a los subtipos Th17 que median respuestas inflamatorias decisivas en la función de barrera y Treg determinantes en la represión y resolución de eventos inflamatorios, siendo este fenómeno patente en la mucosa intestinal pero también a nivel sistémico [230-232]. Todo este conjunto de alteraciones relativas a la presencia y funcionalidad de los diferentes componentes de la inmunidad innata y adaptativa intestinal, genera una mayor susceptibilidad a las infecciones en los animales GF. La inmensa mayoría de estas alteraciones revierten tras la colonización microbiana del tracto gastrointestinal. La administración de antibióticos a animales microbiológicamente convencionales produce alteraciones en el sistema inmune gastrointestinal muy similares a las descritas para los GF estrictos. Esto supone una herramienta experimental alternativa, pero también da idea de que la exposición a altas dosis de antibióticos o a bajas de forma prolongada puede ser biológicamente significativa.

Toda la serie de alteraciones en la estructura y funcionalidad del sistema inmune gastrointestinal antes citadas tienen, como es lógico, un impacto relevante en el desarrollo de muchos de los modelos experimentales de inflamación intestinal, ya sea por la atrofia inmunológica o por la ausencia de los antígenos bacterianos que ejercen un papel relevante en la conducción del proceso fisiopatológico en estos modelos, o una combinación de ambos factores. Esta situación refleja una realidad ya constatada para la EII en humanos, en la cual se atribuye un papel muy relevante a la microbiota en la iniciación y el desarrollo de la patología en el tiempo.



En referencia a los modelos de colitis inducidos químicamente cabe destacar que en el caso del modelo de colitis inducida por DSS, la ausencia de bacterias implica una reducción muy significativa en la severidad del modelo si lo comparamos con un animal microbiológicamente estándar. Esta afirmación está basada en resultados (aún no publicados) obtenidos por mi grupo de investigación en animales GF y en otros presentados en esta tesis doctoral en animales tratados con antibióticos. No obstante, es importante destacar que aunque los parámetros de tipo inflamatorio aparecen escasamente alterados, el sangrado rectal mostrado por los animales GF fue muy superior. Sin embargo, hay varias publicaciones que afirman que la monoclonización con determinadas cepas bacterianas ejerce un papel protector, comparando con el animal GF [233, 234]. En los modelos de colitis inducida por TNBS u oxazolona, la información disponible es muy limitada, pero en general se piensa que como ocurre en el DSS, a nivel de marcadores inflamatorios los animales GF están menos afectados debido a la atrofia inmunológica, aunque en términos de supervivencia tienden a presentar una peor evolución. Esto es lógico porque estos modelos tienden a ser abrasivos con el epitelio intestinal, y la ausencia de bacterias reduce la restitución epitelial y la función de barrera, lo que justifica la elevada mortalidad que algunos trabajos presentan.

El impacto de la ausencia de microbiota intestinal es si cabe mayor en los modelos de colitis de naturaleza genética. La mayoría de estos modelos requieren de la presencia de los antígenos de la microbiota intestinal para desarrollarse, esencialmente porque suelen tener como factor desencadenante una pérdida de tolerancia inmunológica por parte de algún componente del sistema inmunitario gastrointestinal. Por tanto, sin antígenos ante los que responder exacerbadamente, no se desarrolla el modelo inflamatorio o lo hace de una forma muy atenuada. Algunos ejemplos destacados que encajan en el concepto anterior son, los modelos de colitis espontánea generados por delección en los genes codificantes para TCR $\alpha$ , IL2 o IL10 [235-237]. Otro ejemplo en este sentido, ha aparecido con el recientemente desarrollado modelo de colitis espontánea conducido por la inmunidad innata intestinal que se genera al eliminar simultáneamente los genes codificantes para T-Bet y Rag2. De un modo análogo a los anteriores modelos genéticos, esta colitis espontánea no se desarrolla si los ratones se mantienen en condiciones GF o se les retira la microbiota por exposición a antibióticos [238]. En definitiva, estos modelos son estrictamente dependientes de la presencia de antígenos luminales en términos cuantitativos, en la medida que se establece una relación directa entre esta y la severidad inflamatoria obtenida.

Para terminar, es interesante hacer una reflexión sobre el caso de los modelos de inflamación intestinal de carácter infeccioso. En el caso de la colitis inducida por la exposición a *Citrobacter rodentium*, se ha constatado que esta es mucho más agresiva y cursa con una mortalidad muy superior en los animales GF. La razón que justifica este fenómeno se relaciona con la casi total ausencia de células Th17 en estos animales, y con el hecho de que es este tipo de respuesta inmunológica la más relevante para la contención del agente infeccioso que dirige el proceso inflamatorio. De hecho, la monoclonización de los animales GF con *segmented filamentous bacteria* (SFB), estimula el desarrollo de células Th17 y una recuperación en la producción de sIgA en la mucosa, revirtiendo la mayor susceptibilidad a este modelo antes descrita [239].

### 3. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

#### 3.1. Generalidades

La expresión enfermedad inflamatoria intestinal (EII) define una condición inflamatoria crónica e idiopática, en la cual el paciente pasa de forma alternativa por períodos de actividad y remisión inflamatoria. EII es una denominación general que en realidad hace referencia principalmente a dos cuadros clínicos diferentes conocidos como Enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa. A nivel clínico ambas formas de manifestación son a menudo muy similares, factor que complica la realización de un diagnóstico diferencial fiable en muchos casos. No obstante, existen diferencias sustanciales a nivel anatomopatológico atendiendo a las capas de la pared intestinal que se encuentran afectadas y a nivel del tipo de respuesta inmunológica predominante en cada caso.

La Enfermedad de Crohn (EC) se caracteriza por una inflamación transmural del tracto gastrointestinal, pudiendo verse afectado cualquiera de los segmentos que lo componen, desde la boca hasta el ano. A pesar de dicho carácter transmural, la EC generalmente cursa con una evolución no penetrante, de forma que solo alrededor del 15% de los casos presentan lesiones tipo fístula o absceso. 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 frecuencia relativa con la que estadísticamente se ve afectado cada uno de los segmentos del tracto gastrointestinal en los pacientes con EC es del 47% para el íleon terminal, 28% para el colon, 21% en el caso de la región ileocecal y solo de un 3% si consideramos el tracto gastrointestinal superior. El hecho de que el área que con mayor frecuencia de afectación sea el íleon terminal hizo que allá por el año 1932 cuando se describió por primera vez la actual EC, se la denominara como "ileítis terminal". La sintomatología con la que se presenta la EC puede ser muy diferente en cada paciente, debido a que depende sobre todo de la región intestinal que esté afectada en cada caso. De este modo, si la afectación es meramente colónica la sintomatología suele ser de tipo diarreico, acompañada de presencia de sangre y moco en las heces. 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, el desarrollo de fiebre y una significativa pérdida de peso derivada de una menor ingesta de alimentos para evitar el típico dolor postprandial, son síntomas que se presentan en la mayoría de los casos independientemente del segmento intestinal afectado [240].

Desde un punto de vista patológico, las alteraciones macroscópicamente observables en una zona con afectación inflamatoria de un paciente con EC se pueden resumir en un fuerte engrosamiento y rigidez intestinal dando aspecto de órgano macizo a la palpación, reflejo de la fibrosis y el edema subyacentes. Las porciones afectadas se adhieren con frecuencia a otros segmentos intestinales, originando en ocasiones fístulas. Al abrir transversalmente el segmento afectado se observa una disminución de la luz intestinal y una llamativa fibrosis en la pared. La mucosa suele presentar un aspecto en forma de "empedrado", debido a la alternancia entre ulceraciones profundas y zonas edematosas. Cuando varias úlceras profundas se asocian entre sí, puede llegar a originarse una fístula, caso en que la afectación transmural alcanza la capa muscular [241, 242]. A nivel microscópico, destaca una infiltración difusa en la mucosa intestinal y particularmente en la lámina propia, dominada por linfocitos y células plasmáticas. Asimismo, es muy típico encontrar granulomas que se localizan preferentemente en submucosa, subserosa y

ganglios linfáticos. Actualmente hay un cuerpo de conocimiento muy consistente que sostiene el concepto según el cual hay una estrecha relación entre la inflamación crónica y la carcinogénesis, siendo esta patología un ejemplo de primer orden junto a la colitis ulcerosa, dado que sufrir una de estas afecciones inflamatorias crónicas aumenta de forma muy significativa el riesgo de padecer un proceso neoplásico intestinal en general y un adenocarcinoma colorrectal en particular [243, 244].

La Colitis Ulcerosa (CU) se caracteriza por una inflamación no transmural (superficial) que solo afecta a la mucosa, y anatómicamente restringida al colon. En función de la longitud del segmento colónico que se encuentre afectado, la CU recibe una denominación diferente. De este modo, se habla de proctitis si solo se ve afectado el recto, proctosigmoiditis cuando se ven afectados 25-30 cm en dirección proximal desde el recto, colitis izquierda cuando está afectado recto, sigma y colon ascendente, y finalmente pancolitis cuando se encuentra inflamada la totalidad del órgano. En algunas ocasiones estos pacientes sufren una inflamación que afecta a la zona distal del íleon, esto es conocido como "*backwash ileitis*", y su aparición dificulta la realización de un adecuado diagnóstico diferencial entre EC y CU. La sintomatología suele estar dominada por un fuerte 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 esta sintomatología es extremadamente exacerbada, se usa el término de CU fulminante. Esto es así cuando el paciente presenta fiebre, más de diez deposiciones diarias totalmente diarreicas y acompañadas de un profuso sangrado, esto lleva a una anemia e incluso termina haciendo necesaria la transfusión sanguínea. Evidentemente cuando esta sintomatología perdura en el tiempo sin ser controlada clínicamente, puede terminar desembocando en un megacolon tóxico. En esta situación clínica, el colon aparece muy dilatado, 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 ante el altísimo riesgo de perforación y la consecuente septicemia [245]. Es importante destacar que no es extraño que se produzcan alteraciones de tipo sistémico asociadas a la CU. En este sentido, con relativa frecuencia aparecen artropatías periféricas, espondilitis anquilopoyética, problemas cutáneos como el pioderma gangrenoso, lesiones oculares, alteraciones renales como la pielonefritis e incluso algunas hepatopatías.

Desde un punto de vista patológico, 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 muy típica la presencia de pseudopólipos o pólipos inflamatorios, que son focos puntuales de inflamación que pueden confundirse fácilmente con adenomas. Cuando el paciente entra en fase de remisión este aspecto se normaliza bastante, aunque quedan secuelas permanentes que se caracterizan por una mucosa muy lisa, brillante, granulosa y atrófica. En fases muy avanzadas de la enfermedad, el colon se torna muy fibrótico, estrecho y sensiblemente acortado con pérdida de las marcas haustrales [246-248]. Centrándonos en la observación microscópica, a nivel de la lámina propia se produce una fuerte infiltración de células plasmáticas, linfocitos y neutrófilos. Junto a este infiltrado, otra característica típica de la CU es la distorsión de la arquitectura normal de las criptas apareciendo disposiciones aberrantes, debido a la afectación inflamatoria que inicialmente se produce en su base. 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 [249, 250].

La realización de un 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 sobre todo en lo referente a la distribución anatómica de la afectación inflamatoria a lo largo del tubo digestivo, y sobre todo a la transmuralidad del proceso inflamatorio a nivel microscópico. Las técnicas de las que se hace uso para conocer estos detalles comprenden desde la endoscopia hasta la gammagrafía con leucocitos marcados, pasando por la ecografía y a radiografía. A pesar de la tecnología disponible y el creciente conocimiento sobre estas patologías, se dan casos de pacientes que presentan diagnóstico de EII pero que no pueden ser formalmente clasificados en ninguna de las dos presentaciones clínicas antes descritas. Se habla en estos casos de colitis indeterminada [251].

### 3.2. Epidemiología

De un modo comparativo entre EC y CU, es interesante destacar que la segunda presenta una incidencia bastante superior [252]. Además, estudios de seguimiento en el tiempo de este tipo de registros arrojan una evolución muy diferente entre ambas formas de presentación de la EII. Mientras que la incidencia de la CU se mantiene estable en las últimas décadas sin distinción geográfica, la de la EC se está viendo incrementada, sobre todo en aquellos países que presentaban menos casos inicialmente.

La localización geográfica, según demuestran múltiples estudios, es claramente desigual. Los mayores valores de incidencia de CU y EC se registran en los países más desarrollados del mundo, destacando norte de Europa, Reino Unido y Norteamérica, donde cada vez crecen en menor medida y parece se orientan hacia la estabilización. Sin embargo, en aquellos países que tradicionalmente habían presentado una tasa de incidencia baja, sur de Europa, Asia y África, esta está aumentando a un ritmo espectacular en las últimas décadas. En general, hay dos teorías alternativas pero no mutuamente excluyentes acerca de la influencia geográfica en la incidencia de EII. La primera justifica la existencia de un gradiente norte – sur [253] en función del nivel de desarrollo económico y su impacto sobre un plausible exceso de higiene [254]. Esta teoría relaciona por tanto el modo de vida de los países desarrollados, caracterizado por un ambiente antigénicamente muy limpio y controlado en las primeras etapas de la vida, con una mayor incidencia de afecciones de tipo alérgico, infeccioso e inflamatorio en la edad adulta [255], al producirse entonces un encuentro tardío con antígenos que disparan la instauración de estos desórdenes. Del mismo modo, existe otra teoría que defiende la existencia de un gradiente este – oeste [256, 257]. En este caso, la presión que dirige dicho gradiente se asume que debe ser los hábitos alimentarios, dado que en los países orientales que tradicionalmente han seguido una dieta mucho más sana principalmente por su mucho mayor contenido en fibra comparado con la occidental, la incidencia de EII ha sido clásicamente mucho menor. A pesar de ello, en las últimas décadas la tendencia está cambiando significativamente, dado que de un modo paralelo a la occidentalización de la dieta en países como Japón o Corea del Sur, se está produciendo un notable aumento de la incidencia de EII, lo cual no hace sino apoyar la idea expuesta por los defensores de la teorías del gradiente este – oeste.

En relación a la edad, es interesante destacar que parece ser un factor con un impacto significativo en el momento de la instauración la enfermedad. En este sentido, hoy en día se asume que mientras que la EC tiene un pico de máxima incidencia al comienzo de la madurez, entre los 20-40 años, la CU presenta un comportamiento radicalmente diferente, siendo el punto de máxima incidencia alrededor de los 60 años [258]. En la última década se está produciendo un repunte considerable en la incidencia de la EII en la edad pediátrica, principalmente EC [259], de forma independiente de la zona geográfica considerada [260-264]. Este fenómeno esta suscitando un gran interés, debido a que se trata de un desorden de naturaleza crónica y un inicio tan temprano de este supone un impacto importante sobre la calidad de vida del paciente afectado durante muchos años.

El sexo, hoy en día es un factor epidemiológico al que se le atribuye una influencia relativamente pequeña en la instauración y la severidad en el desarrollo fisiopatológico de la EII. No obstante, aunque las diferencias son sutiles en lo cuantitativo, la EC afecta preferentemente a la mujer, mientras que la CU se asocia de forma predominante al hombre [265, 266].

Por otro lado, la raza es otro factor que merece comentario, en la medida que se ha encontrado una incidencia para la EII mucho mayor entre los individuos de raza caucásica que en los de raza negra [267]. Esta afirmación que en términos meramente estadísticos es incontrovertible, presenta un sesgo enorme debido a que la inmensa mayoría de la población de raza negra a nivel mundial se encuentra localizada en África, donde el bajo nivel socioeconómico predominante y las cuestiones de índole cultural/social/ambiental, en virtud de lo comentado anteriormente en este sentido, deben ser los factores que justifican en la práctica estos datos. Esta reflexión se ve refrendada por algunos estudios que 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. En este caso, en el que factores como la dieta, los hábitos higiénico-sanitarios y por ende la exposición antigénica temprana y a lo largo de la vida de los pacientes objeto de estudio son comparables, dicha asociación desapareció completamente, lo que permite inferir un papel predominante de este tipo de factores sobre el fenómeno que aquí se discute [268]. Probablemente, la menor susceptibilidad a EII y gravedad en su presentación encontrada en la población de Haití y Cabo Verde [269] se pueda explicar simplemente por factores meramente ambientales como en el caso anterior. Independientemente de lo expuesto en relación a la raza negra, un caso en el que la asociación entre la raza y una mayor susceptibilidad a la EII se encuentra plenamente aceptada es el de la raza judía. Diversos estudios, focalizando sobre la incidencia de EII en la población judía en diferentes localizaciones geográficas (Israel, EEUU o Europa), han arrojado datos que confirman ligeras variaciones en función de la localización geográfica, y en cualquier caso, una asociación significativa entre la condición judía y una mayor susceptibilidad a padecer la enfermedad en comparación con cualquier otra raza [270-272]. Dicha asociación es tan fuerte, que el alto nivel socioeconómico que históricamente ha poseído la población judía no puede llegar a justificar los datos epidemiológicos encontrados, por lo que los factores estrictamente genéticos parecen ser los responsables [273].

Debido a la constatada influencia de la microbiota intestinal en la modulación de la maduración y la inmunocompetencia del sistema inmunitario gastrointestinal, siempre se ha sospechado que determinados procesos de carácter infeccioso que afectasen a la mucosa intestinal podrían ejercer como factor desencadenante de la respuesta inflamatoria autoinmune propia de la EII. En línea con

este concepto, se han realizado estudios sobre la influencia que la colonización del tracto gastrointestinal por parte de bacterias del género *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Mycoplasma* o *Listeria monocytogenes*, pudiera tener como factor desencadenante de la EII [274-277]. Un resultado interesante es el que en ratones asocia la infección con *Mycobacterium avium* con una inflamación similar a la enterocolitis necrotizante [278]. Por otro lado, se han focalizado muchos esfuerzos en dilucidar si bacterias con especial capacidad de adhesión a la superficie del epitelio intestinal, como *E. coli* con capacidad adherente e invasiva, o especies del género *Fusobacterium* [279, 280] pudieran jugar un papel relevante en ese sentido. Sin embargo, hasta la fecha ninguno de ellos ha conseguido establecer una relación causa-efecto consistente, aunque aún hay investigadores que tienen grandes esperanzas en encontrar resultados concluyentes sobre todo con las cepas de *E. coli* enteroinvasivas, ya que tienen especial capacidad de invasión y replicación en el interior de macrófagos [281] y de adhesión a enterocitos, además de ser preferentemente aisladas de la mucosa de pacientes con EC en comparación con individuos sanos [282, 283]. Sorprendentemente, la presencia de *H. pylori* en el tracto gastrointestinal se asocia con un cierto papel protector ante el desarrollo de la EII [284], aunque hay resultados controvertidos en ese sentido [285]. Esto no hace más que reflejar el complejo equilibrio existente entre la microbiota y el sistema inmune gastrointestinales, y como la composición en términos cualitativos de la primera parece ejercer un papel funcionalmente relevante en la homeostasis intestinal, siendo este un concepto que será tratado de un modo más extenso en capítulos sucesivos.

### 3.3. Etiología

En la actualidad la EII sigue siendo considerada una afección de carácter idiopático en la medida que el conocimiento de su fisiopatología sigue basado en postulados meramente hipotéticos. No obstante, la teoría sobre su génesis que hoy por hoy cuenta con un mayor grado de aceptación postula que se produce una respuesta inmunológica exacerbada fundamentalmente localizada en la mucosa gastrointestinal y el GALT, ante antígenos procedentes de la microbiota entérica y en pacientes genéticamente predispuestos. Además esta respuesta inflamatoria que adquiere un carácter crónico, sufre una relevante modulación por parte de diversos factores ambientales. De este modo, se puede establecer que la evolución fisiopatológica de la EII está basada en una compleja interacción de factores genéticos e inmunológicos, los cuales son detalladamente descritos a continuación.

#### 3.3.1. Factores genéticos

La conciencia de una base genética en la EII comienza a desarrollarse en la década de los años 30, escasos años después de que el Dr. Crohn describiese detalladamente esta patología. La relevancia de la genética como un elemento subyacente importante en el desarrollo de la EII resulta evidente atendiendo, por un lado, a la elevada tasa de agregación familiar observada, y por el otro, a la mayor susceptibilidad mostrada en la población judía.

El fenómeno de la agregación familiar en la EII es tal que presentar un historial familiar positivo para la enfermedad es hoy en día el factor de riesgo independiente a considerar más relevante. En el caso de la EC, esta asociación es mayor que para la CU, siendo el riesgo de desarrollar EC ante un caso positivo en un familiar de primer grado, de hasta el 35% [286, 287]. Además, los datos epidemiológicos que se han obtenido realizando estudios de tipo familiar, demuestran una relación de susceptibilidad no solo de forma directa para EC y CU, sino también

cruzada entre ellas, de forma que existe un mayor riesgo de padecer ambas presentaciones clínicas en la familia predispuesta con un miembro ya diagnosticado, independientemente de qué presentación clínica presente este último [288-291]. Sin embargo, 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 [292, 293]. No obstante, incluso en este caso caracterizado por una total analogía genética, no se obtiene un 100% de concordancia respecto al desarrollo de la patología en ambos 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 [294-296].

Actualmente está plenamente aceptado que el modelo de herencia genética que mejor se ajusta a las características fisiopatológicas de la EII, a la estrecha relación existente entre los dos cuadros clínicos en los que se puede presentar y principalmente a la ingente cantidad de datos epidemiológicos recogidos hasta al fecha, es uno de tipo multi-*locus* u oligogénico. En este sentido, desde hace ya unos años se está realizando un importante esfuerzo investigador orientado a la descripción de las variantes genéticas que se asocian con una modificación significativa de la susceptibilidad a la enfermedad. Idealmente, estas investigaciones podrían ser relevantes en el campo de la clínica mediante el uso de la terapia génica, pero hasta ahora esta es una aproximación que no está dando más que sus primeros pasos. Estudios recientes, basados en la realización de *genome-wide association study* (GWAS) han elevado el número de *loci* asociados con la EII hasta unos guarismos que ya superan los 160, estando muchos de ellos a su vez relacionados con otros desórdenes de carácter autoinmune como la espondilitis anquilosante y la psoriasis, así como con una mayor susceptibilidad a infecciones por micobacterias [297]. Al tratarse de una patología con una influencia genética de tipo oligogénico, no se ha podido describir ningún *locus* cuya existencia sea suficiente para inducir el desarrollo de la EII como es lógico, aunque con el tiempo se ha conseguido identificar qué genes dentro de un determinado *locus* son los responsables al verse alterados, de los cambios de tipo funcional en el organismo del individuo en cuestión que justifican su mayor susceptibilidad a la patología.

Teniendo en cuenta la etiología mayoritariamente aceptada en referencia a la EII, según la cual se origina como consecuencia de una respuesta inflamatoria exacerbada ante antígenos de la microbiota intestinal, siendo posteriormente dirigido dicho proceso inflamatorio esencialmente por células T CD4. No es extraño que muchos de los genes para los que los estudios por GWAS han demostrado asociación para algunas de sus variantes con la EII, estén relacionados con la regulación de fenómenos cruciales en las respuestas inmunes en condiciones basales y en inflamación en el tracto gastrointestinal, destacando por un lado la percepción microbiana a través de PRR, la eliminación de bacterias y sus antígenos por fagocitosis, su posterior presentación en el contexto de MHC y por último el desarrollo de las respuesta inmunes adaptativas.

El gen NOD2/CARD15 es probablemente el que hasta el momento ha sido más detalladamente estudiado en este sentido, principalmente por la gran fuerza de asociación que ha mostrado respecto a la EC [298]. Este gen se localiza en el cromosoma 16 y codifica una proteína esencial en uno de los NLR más relevantes, por lo que una alteración en su secuencia que implique una alteración significativa en la funcionalidad de la proteína final, va a generar un cambio sustancial en la percepción del MDP de naturaleza bacteriana como PAMP, siendo esto relevante en células como las APC y principalmente las células de Paneth, como ya se ha descrito anteriormente. A día

de hoy han sido descritas tres mutaciones en este gen (Arg702Trp, Gly908Arg y Leu1007insC), las cuales en términos patológicos se relacionan con inflamación localizada en íleon y en ningún caso en colon, lo que justifica que dicha asociación quede restringida a la EC [299, 300].

Por otro lado, otro gen cuya mutación se ha mostrado fuertemente asociada con la EII, en sus dos presentaciones clínicas en este caso, es el codificante para la subunidad específica del receptor de la IL23 (IL23R). Este gen está localizado en el cromosoma 1, presenta varias mutaciones que determinan cambios sustanciales en la susceptibilidad a la EC y la CU, aunque en menor medida para la segunda [297]. La comprensión de la relevancia biológica de la señalización de la IL23 en la homeostasis del sistema inmune gastrointestinal es importante para entender el modo en que estas mutaciones modifican la susceptibilidad a la enfermedad. La IL23 es producida fundamentalmente por macrófagos y DC, mientras que el receptor lo expresan estas mismas células sobre las cuales aumenta su actividad como APC y su producción de citoquinas como la IL27, cuyo gen codificante situado en el cromosoma 16, también es de susceptibilidad para EC y CU, así como otras células innatas como las células NK y las ILC. El IL23R también regula estrechamente la producción de IL17 e IL22, dado que lo expresan las células Th17 que a su vez juegan un papel muy relevante en la fisiopatología de la EC, justificándose así como aquellas variantes genéticas que generan un receptor menos sensible a la IL23, tienden a implicar cierta protección ante la EC [301, 302], mientras que las de mayor sensibilidad como la rs1004819 se encuentran fuertemente asociadas con la esta patología [303]. Este hallazgo se vio posteriormente refrendado por algunos estudios con animales de experimentación, haciendo uso del modelo de colitis inducida por DSS, aunque con una doble vertiente en función de que consideremos la inmunidad innata en exclusiva o el animal inmunológicamente completo [81] y mediante el uso del modelo de colitis espontánea en animales IL10 KO que es dependiente de la presencia de macrófagos para su desarrollo en la medida que estos producen IL12 e IL23 [304]. Otro gen que presenta variantes con fuerte asociación a la EII en general es el CD40 (cromosoma 20), derivado de una alteración en la homeostasis en la sinapsis inmunológica [305].

Por último, hay múltiples genes de susceptibilidad a la EII que tienen dicho estatus precisamente porque codifican proteínas decisivas en el desarrollo de las respuestas adaptativas a nivel sistémico, y en la mucosa intestinal en particular. En línea con este concepto, en los genes STAT3 (cromosoma 17), IL2RA (cromosoma 10), IL12B (cromosoma 5) e IL18R1 (cromosoma 2) se han encontrado variantes asociadas a la EC y/o CU [306]. Incluso el gen codificante de la propia IL10 (cromosoma 1) tiene variantes con asociación a EC y CU al verse afectado el papel inmunoregulador de dicha citoquina [307]. Independientemente de los genes con variantes asociadas a la EII funcionalmente relacionados con el sistema inmunológico, existe un grupo de ellos con fuerte asociación también y que intervienen en la regulación de la autofagia, destacando entre ellos el polimorfismo (rs2241880) del gen ATG16L1 (cromosoma 2), que se encuentra muy asociado con la localización ileal de la EC [308]. En concreto, la mutación *T300A* se asocia con una menor capacidad fagocítica y para la destrucción de antígenos bacterianos por parte de los fagocitos, y con una menor producción de péptidos antibacterianos por parte de las células de Paneth [309]. Precisamente fue el hallazgo de estos genes implicados en la autofagia, el factor iniciador de corrientes de investigación focalizadas en dichos procesos, que con posterioridad han resultado muy fructíferas en el campo de la gastroenterología básica [310].



### 3.3.2. Factores ambientales

#### Composición cualitativa de la microbiota intestinal

La convivencia que se establece en el tracto gastrointestinal en su tercio distal entre la mucosa intestinal y una enorme cantidad de agentes microbianos, desde un principio hizo sospechar sobre la relevancia de una distorsión en el equilibrio que se establece entre ambos interlocutores como una causa subyacente relevante en el desencadenamiento de la inflamación intestinal crónica. Como ya se ha comentado anteriormente, el principal factor desequilibrante sobre el diálogo bidireccional que se establece entre la mucosa intestinal y la microbiota es la pérdida de tolerancia inmunológica por parte de agentes celulares comprendidos en el sistema inmune innato. No obstante, en los últimos años ha aumentado exponencialmente el interés que suscita la composición cualitativa de la microbiota intestinal como un factor influyente al menos en parte en dicho desequilibrio, aunque tal y como se describe en el capítulo de epidemiología, no se ha podido establecer aún una asociación directa entre la infección del tracto gastrointestinal con un determinado agente bacteriano y la instauración de la EII.

Los hallazgos que inducen a pensar en un papel destacado de la composición de la microbiota en la inflamación intestinal crónica son, por un lado, la estricta dependencia de la presencia de esta para el normal desarrollo del proceso inflamatorio en varios modelos de colitis espontánea como se describe en capítulos anteriores, la descripción de cierta disbiosis intestinal típicamente asociada a los pacientes con EII, y finalmente, el profundo conocimiento que se posee actualmente acerca de la eficacia de diversos enfoques terapéuticos que se basan en la modificación de la microbiota intestinal, destacando el uso de prebióticos, probióticos y los trasplantes de microbiota fecal [311].

La disbiosis intestinal que se asocia con la EII se puso de manifiesto gracias al desarrollo del programa del “microbioma humano”, que nos permitió conocer la existencia de cierta microbiota típicamente asociada a la inflamación intestinal crónica [312]. Esa disbiosis se caracteriza por una significativa reducción en la diversidad bacteriana, siendo infrecuente encontrar bacterias de los géneros *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, así como *Clostridium coccooides* y *Clostridium leptum*, con buena representación en condiciones normales [313, 314]. Del mismo modo, se ha estudiado la microbiota en la mucosa de pacientes con EII de forma comparativa entre una fase inflamatoria y otra no activa de la enfermedad, pero no se han encontrado resultados concluyentes en una dirección concreta, aunque parece que esas diferencias se dan con mayor asociación con la EC en comparación con la CU [315, 316]. Independientemente de la ya citada reducción en la diversidad bacteriana, no se ha podido establecer un patrón cualitativo en la microbiota intestinal que se asocie con la EII, principalmente porque cada individuo tiene el suyo propio inherente a su biología, entorno en que habita y hábitos higiénico – sanitarios. Sin duda alguna, la gran cuestión que permanece sin recibir respuesta por parte de la comunidad científica, es si dicha disbiosis es causa o simplemente una consecuencia de la inflamación crónica intestinal. Las evidencias con las que se cuenta actualmente invitan a pensar preferentemente en la segunda posibilidad, de forma que sería la susceptibilidad genética del hospedador unida a diferentes factores ambientales la que determina un desequilibrio en el modo en que interpreta y responde el sistema inmunológico intestinal ante los antígenos provenientes de una microbiota en principio normal. En este contexto inflamatorio, se produce una alteración importante en la producción de muchos mediadores solubles producidos por el hospedador y que contribuyen al equilibrio en el diálogo bidireccional

que la mucosa intestinal establece con la microbiota, justificándose de esta manera una disbiosis sobrevenida de forma secundaria a una inflamación pre-existente. Sin embargo, el hecho de que la mayor parte de las variantes genéticas con mayor fuerza de asociación con la EII se encuentren en genes que codifican proteínas que de un modo más o menos directo están 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 [317-320].

El uso de prebióticos y probióticos para tratar de alargar los períodos de remisión en los pacientes de EII viene de largo tiempo atrás, dado que esta aproximación terapéutica ha sido explorada extensamente en modelos preclínicos en décadas pasadas y su implementación en la clínica obtuvo resultados razonablemente buenos. El mecanismo de acción de estos consiste fundamentalmente en promover el crecimiento selectivo de bacterias beneficiosas, o bien en aportarlas directamente, de forma que estas se conviertan en una población mayoritaria dentro de la mucosa intestinal. Algunos de los prebióticos de mayor uso y que hoy en día forman parte de productos tan diversos como fórmulas de nutrición infantil o piensos animales, son la inulina y otros fructo-oligosacáridos de cadena más corta, los cuales han mostrado un efecto beneficioso en la colitis experimental y sobre pacientes con EII, al parecer mediante un aumento selectivo de la presencia de bacterias del género *Bifidobacterium* en la microbiota, pero al parecer también mediante efectos directos sobre las células epiteliales intestinales de un modo independiente de su efecto prebiótico, tal y como hemos puesto de manifiesto en mi grupo de investigación [321]. Las investigaciones realizadas haciendo uso de probióticos son muy extensas, lo que hace que el interés investigador en este campo esté decreciendo en los últimos años. Uno de los muchos ejemplos que se puede destacar en este sentido es el efecto beneficioso de *E. coli* Nissle 1917 en el mantenimiento de remisión en pacientes con CU [322], pero la lista de bacterias usadas como probióticos hoy en día es realmente extensa, incluyendo especies de géneros como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* o *Saccharomyces*.

Un trasplante de microbiota fecal se define como la transferencia de materia fecal de un donante sano a un receptor enfermo, con intención de restaurar la normalidad en la composición cualitativa y cuantitativa de la microbiota del segundo para conseguir un beneficio clínico [323]. Desde la segunda mitad del siglo pasado este procedimiento ha sido utilizado con éxito en el tratamiento de la infección intestinal por *Clostridium difficile* o la colitis pseudomembranosa pero en los últimos años está tomando relevancia como opción a considerar en el tratamiento de la EII, cuando esta se muestra refractaria a los tratamientos convencionales. Esta opción terapéutica ha mostrado resultados prometedores tanto en EC como en CU [324, 325], aunque el número de pacientes incluidos en estos estudios es aún muy bajo hay varios ensayos clínicos actualmente en curso que ayudarán a clarificar su posible utilidad en el manejo clínico de la EII.

### **Estrés**

Con el conocimiento detallado del sistema nervioso entérico y las funciones fisiológicas de cuyo control se encarga en el contexto del tracto gastrointestinal, como la motilidad, el transporte hidroelectrolítico y la microcirculación [326], comenzó a considerarse que la EII podía tener un componente psicosomático relevante [327-329]. 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 la descargas de naturaleza colinérgica en dicho sistema nervioso entérico que se traduce en un aumento de la motilidad intestinal [330, 331] y de la secreción hidroelectrolítica [332], y por el otro en un aumento de los niveles de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y por ende de cortisol. Los efectos inmunomoduladores de elevados niveles de CRH y cortisol sistémicos que puedan alterar la homeostasis intestinal se tratarán más extensamente en próximos apartados de esta tesis doctoral. No obstante, resulta interesante destacar que la CRH actuando sobre mastocitos produce la liberación de múltiples mediadores solubles que comprometen la función de barrera intestinal al aumentar significativamente la permeabilidad transcelular [333]. Además la administración de un bloqueante inespecífico de los dos subtipos receptoriales para la CRH presenta un efecto antiinflamatorio consistente en un modelo de colitis inducida por la administración de la toxina A de *Clostridium difficile* [334]. 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 [335-337]. 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 [338-340].

### Dieta

El epitelio intestinal se encuentra en íntimo contacto con los componentes de la dieta, los cuales constituyen, tras la microbiota intestinal, la fuente principal de antígenos lumenales, por lo que la importancia de la tolerancia inmunológica del sistema inmune gastrointestinal respecto a estos es tan importante.

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 [341, 342]. 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 [343, 344], en la medida que existen estudios que aportan evidencias científicas que apuntan a un efecto beneficioso de los ácidos grasos  $\omega$ -3 en la inflamación intestinal [345-349].

La lactancia materna reduce significativamente en el lactante el riesgo de padecer tanto EC como CU [350, 351]. Diversos mecanismos pueden explicar al menos en parte esta asociación, destacando por un lado la composición rica en proteínas y oligosacáridos con capacidad inmuno-estimulante [352], su riqueza en TGF- $\beta$  que promueve la polarización de células T CD4 hacia el subtipo Treg que promueve la tolerancia antigénica [353], su alto contenido en sIgA y en CD14 soluble que contribuye a la defensa inespecífica de la mucosa intestinal del lactante [354-356], la microbiota que aporta de forma directa y que colabora en la conformación de una adecuada

diversidad bacteriana en el intestino del neonato [356], e incluso el refuerzo directo de la función de barrera intestinal debido al efecto de algunos péptidos contenidos en ella que aumentan la expresión de CLD-4 o la ocludina [357, 358]. 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 [359, 360].

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.

### **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 [361, 362], siendo el porcentaje de fumadores entre los pacientes de CU solo del 10-15% [363]. 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 esta ya se ha diagnosticado [364-367]. 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 $\beta$  [368], entre otros [369, 370].

### **Apendicectomía**

En la actualidad está descrita una disminución de la incidencia de la CU, una aparición más tardía de esta 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 [371-376].

## **3.4. Inmunología de la EII**

### **3.4.1. Fundamentos sobre la instauración y desarrollo de la EII**

La característica probablemente más singular del sistema inmunológico intestinal es la de haber desarrollado tolerancia inmunológica ante los elementos bacterianos de naturaleza comensal presentes en la luz intestinal, lo que nos permite albergar esa ingente microbiota intestinal sin convivir con un estado inflamatorio crónico, al tiempo que conserva la capacidad de desarrollar una respuesta inmune eficaz en la contención de los agentes microbianos de naturaleza patógena. En capítulos anteriores se han descrito pormenorizadamente los mecanismos que se encargan de la regulación del balance entre la inmunotolerancia y la competencia en la función de barrera en sus vertientes física e inmunológica en cada uno de los elementos que componen el sistema inmune gastrointestinal, desde los diferentes tipos celulares presentes en el epitelio de la mucosa, hasta aquellos que componen el GALT.

Más allá de la consideración de la EII como un desorden de naturaleza idiopática, hoy en día se acepta como teoría más plausible que esta surge como consecuencia de una respuesta exacerbada del sistema inmunológico residente en la mucosa intestinal y su entorno hacia la microbiota entérica y otros agentes presentes en la luz intestinal. Las evidencias científicas obtenidas invitan a pensar que existen, por un lado, unos fenómenos primarios que son decisivos en el desencadenamiento de la inflamación intestinal, y por el otro, unos secundarios que sobrevienen ante la perpetuación del desorden inflamatorio ya iniciado, siendo estos el hilo conductor de las consecuencias patológicas asociadas a la EII.

Los fenómenos primarios, como ya se ha comentado, son aquellos que encontrándose presentes en el individuo previamente a la aparición de la inflamación intestinal, en muchos casos durante mucho tiempo, actúan como factor iniciador necesario, prendiendo la mecha de una inflamación crónica sobrevenida con posterioridad. Este grupo, está formado mayoritariamente por las alteraciones en la homeostasis intestinal en general, o inmunológica en particular, dependientes de las modificaciones genéticas que generan predisposición a la EII. Estos fenómenos pueden estar presentes en el individuo durante años, y solo cuando a estos se les une probablemente algún factor de índole ambiental, se dispara el proceso inflamatorio.

Uno de los eventos primarios mejor descritos es el incremento en la permeabilidad intestinal. Esta está sustancialmente elevada en la mucosa intestinal de pacientes con EC y CU activas [377, 378]. Pero lo que es más interesante aún es que este fenómeno se verifica en familiares de primer grado de pacientes de EII, de forma previa al desarrollo de cualquier signo inflamatorio [379, 380]. Estas evidencias forman la base sobre la que se sustenta la hipótesis, actualmente predominante, de que los defectos en la función de barrera intestinal en su vertiente meramente física (monitorizada por la permeabilidad a moléculas de pequeño tamaño) son causa más que consecuencia de la inflamación en la EII.

Quedan encuadradas en este grupo también aquellas alteraciones en el sistema inmune innato que generan un desequilibrio en la respuesta normal de los elementos celulares que lo componen a los PAMP de la luz intestinal. En este sentido, cabe destacar que, por un lado, se ha descrito la alteración de la expresión de diversos TLR y NLR en pacientes con EII, tal y como ya se comentó en capítulos anteriores, siendo en este caso muy difícil dilucidar si este evento es causa o mera consecuencia de la inflamación. En cambio, sí que se han descrito diversas variantes genéticas que afectan a genes como TLR1, TLR2, TLR4, TLR6 y TLR9, con significativa asociación estadística con la EII [381-383], así como la ya descrita de NOD2. El reconocimiento inadecuado de los PAMP puede generar un defecto relevante en la homeostasis inmune en la mucosa intestinal y/o la microbiota intestinal de forma secundaria, derivado de una menor capacidad para la contención inespecífica de los agentes microbianos lumbinales.

Además de las alteraciones en el reconocimiento antigénico, hay evidencias de que las APC de pacientes con EII presentan diferencias sustanciales en las funciones de procesamiento y presentación antigénica. Dado que el entorno en el que se realiza la sinapsis inmunológica determina la polarización de la respuesta adaptativa, este hecho puede tener consecuencias muy relevantes. En este sentido, está descrito un aumento de APC con fenotipo activado en los focos inflamatorios en la EII, así como un descenso en la presencia de APC inmaduras, que son las que presentan un potencial mayor en la inducción de tolerancia [384, 385].

En línea con lo anterior, las células epiteliales intestinales son también funcionalmente relevantes en el inicio del proceso inflamatorio, dado que tienen cierta capacidad de presentación antigénica directa sobre células T CD4+, pero principalmente debido a su influencia directa sobre el contexto en el que se va a producir la sinapsis inmunológica entre las APC profesionales y las células T en la mucosa intestinal. Existen evidencias sobre la adquisición de un fenotipo activado por parte de las células epiteliales intestinales de pacientes con EII, ya sea por un fenómeno de tipo específico celular o derivado de la acción de IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  sobre las mismas [386]. Dicho fenotipo se caracteriza por una mayor expresión de MHC-II y CD1d, ambos determinantes en su capacidad autónoma de presentación sobre células T CD4 [387], y por una menor producción de algunos de los mediadores solubles inductores de tolerancia antigénica, citados en capítulos anteriores [386].

Por otro lado, en la EII existe un defecto en los mecanismos de eliminación de las células T autorreactivas. De un modo asociado a un fallo en la tolerancia central y principalmente periférica, las células T activadas perduran sin entrar en apoptosis de forma controlada, como ocurre en condiciones homeostáticas. Esta situación es bien conocida en los pacientes con EC y de hecho ya existen estrategias terapéuticas que al menos parcialmente, están orientadas a regular este fenómeno [388, 389].

Finalmente, es importante describir brevemente algunas corrientes de opinión que en los últimos años van tomando fuerza en el campo de la gastroenterología, en un principio de forma exclusiva en la vertiente experimental, pero cada vez más aceptadas en clínica. A día de hoy existen evidencias que invitan a pensar en una inmunidad innata intestinal defectuosa como causa subyacente en el inicio de la EC, mientras que esa posibilidad no se contempla para la CU, cuyo comienzo se ajusta mejor a eventos como los anteriores que implican una exacerbada respuesta inmunológica de un modo más sencillo. Centrándonos en la EC, parece sorprendente la afirmación según la cual siendo una enfermedad que cursa con una respuesta inmunológica de perfil alto, esté relacionada en su origen con una inmunodeficiencia. Diversos trabajos han demostrado cómo los pacientes con EC muestran una reducida capacidad de reclutamiento neutrofílico, y sus macrófagos, aun sin presentar alteraciones en la expresión génica, liberan cantidades anormalmente bajas de muchas citoquinas pro-inflamatorias debido a una prematura migración de estas proteínas hacia los lisosomas. Ambos factores pueden estar relacionados con la menor capacidad para la contención bacteriana inespecífica que se ha observado en estos pacientes [390-392]. La redefinición de la EC como una enfermedad con cierta cercanía a la inmunodeficiencia deriva no solo de lo ya comentado, sino también a la eficacia que han mostrado en ella algunos tratamientos fundamentados inmuno-estimulantes como el GM-CSF u otros basados en el uso de células hematopoyéticas que reconstituyen el sistema inmune hipofuncional del paciente, que al menos de forma preliminar parecen estar arrojando resultados sugerentes [393, 394]. Asimismo, existen múltiples evidencias acerca de la aparición de enteropatías relevantes como eventos asociados a diversas inmunodeficiencias congénitas y en especial a la infección por VIH por una menor actividad Th17 [151]. Sorprendentemente, en pacientes con VIH y EC, la presencia del VIH y la consecuente reducción del número de células T CD4+ en el paciente se correlacionó con una menor tasa de recidivas, lo que da idea de una fase tardía en la EC que se comporta de un modo sustancialmente diferente respecto a su inicio, teniendo en cuenta que la génesis inicial parece relacionarse con una inmunodeficiencia parcial [395]. Para terminar, quisiera recordar que durante anteriores capítulos de esta introducción se han descrito múltiples animales transgénicos con

deficiencias concretas en diferentes niveles de la inmunidad innata, y cómo esto los condiciona hacia una mayor susceptibilidad a modelos de colitis experimental como el DSS, o incluso les hace desarrollar una enteropatía de forma espontánea.

Los fenómenos secundarios, que se relacionan fundamentalmente con la perpetuación de la inflamación crónica y sus consecuencias en el individuo, convergen en una serie de eventos finales comunes. En primer lugar, en la EII se produce una migración de células inmunocompetentes desde el torrente sanguíneo hacia la mucosa intestinal. Esto ocurre gracias a la liberación por parte de las células epiteliales intestinales y APC presentes en la mucosa de quimioquinas como la IL8 y *macrophage inflammatory protein* (MIP1- $\alpha$  y  $\beta$ ), *regulated on activation normal T cells as secreted* (RANTES), *monocyte chemoattractant proteins* (MCP-1, 2 y 3), entre otras, que actúan generando un gradiente quimiotáctico y aumentando la expresión de moléculas de adhesión en la superficie de granulocitos y linfocitos. Al mismo tiempo, citoquinas pro-inflamatorias como TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$  inducen la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio de la microvasculatura intestinal (E-selectinas, P-selectinas, ICAM-1, VCAM-1), promoviendo de este modo la extravasación leucocitaria hacia el tejido [396, 397].

Por otro lado, existe un amplio abanico de mediadores solubles que durante el desarrollo y cronificación del proceso inflamatorio intestinal se acumulan en la mucosa, generando un efecto perjudicial para su integridad, como las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, prostaglandinas, leucotrienos, histamina o metaloproteasas [398-400].

Independientemente de los fenómenos estrictamente intestinales, la EII se acompaña de otros que se traducen en alteraciones a nivel sistémico. La mayoría de estos aparecen como consecuencia de la distribución general en cantidades biológicamente significativas, de citoquinas inflamatorias que tienen su origen en el foco inflamatorio activo localizado en el entorno mesentérico [401]. Entre ellos destaca la pérdida de peso, asociada a una alteración de los hábitos alimentarios que se caracteriza por la anorexia [402, 403] o la fiebre [404]. A nivel hematológico, es muy típico que aparezca anemia asociada a la pérdida de sangre vía rectal [401, 405], alteraciones en la coagulación, aumento de la agregación plaquetaria y leucocitosis [406].

Finalmente, la EII se asocia con un mayor riesgo de padecer cáncer colorrectal, siendo este el primer caso en el que se puso científicamente de manifiesto la relación, hoy firmemente establecida, entre el mantenimiento de un proceso inflamatorio crónico y un mayor de riesgo de padecer un proceso neoplásico en el tejido afectado. Dicha asociación es tal, que se ha descrito cómo el riesgo de padecer cáncer colorrectal se ve incrementado de un modo directamente proporcional a la extensión y gravedad de la afectación inflamatoria [407, 408]. Sin embargo, los mecanismos que justifican esta asociación están aún por definir, si bien hay sospechas de que la actividad incrementada del factor de transcripción NF- $\kappa$ B pudiera estar implicada, debido a sus acciones favorecedoras de la proliferación celular e inhibitoras de la apoptosis [409]. Entre los mediadores solubles que parecen estar asimismo implicados en esta relación, destacan algunas citoquinas típicamente elevadas en la EII como la IL23, la IL27 y la IL6 producidas mayoritariamente por células T CD4 polarizadas a un fenotipo inflamatorio, aunque otras citoquinas como el TNF $\alpha$  o el TGF $\beta$  juegan un papel protector en este sentido y también se encuentran elevadas en la EII [410-412].

### 3.4.2. Vías de señalización relevantes en la fisiopatología de la EII

Existe una muy amplia variedad en lo que respecta a las vías de señalización que terminan activando a diversos factores de transcripción, de lo cual depende la modificación de la expresión de genes funcionalmente relevantes en la medida que estos cuentan con segmentos génicos de respuesta adecuados en su promotor. Para que este proceso se pueda llevar a cabo, es necesaria la intervención de un conjunto de proteínas adaptadoras, las cuales ya sea por su actividad enzimática intrínseca o por su capacidad para inducir la liberación de segundos o terceros mensajeros en el citoplasma celular, van a terminar por conectar la señal que se genera en la membrana celular con el efecto final, que dependerá en última instancia de una modificación en la actividad o en la expresión de una determinada proteína.

#### Vía de señalización de NF- $\kappa$ B

El factor de transcripción NF- $\kappa$ B está directamente implicado en múltiples funciones biológicas, pero destaca su relevancia en la regulación de la proliferación y diferenciación celular, mientras que a nivel inmunológico interviene decisivamente en el desarrollo de las respuestas inmunes principalmente innatas, aunque también en las adaptativas [413, 414]. Esta familia de factores de transcripción consta de cinco miembros; cRel, RelA (p65), RelB, NF- $\kappa$ B1 (p105, precursor de p50) y NF- $\kappa$ B2 (p100, precursor de p52) [415]. Estas proteínas, en virtud de su capacidad de asociación mutua, forman homo o heterodímeros que constituyen las formas activas como factores de transcripción, en la medida que presentan afinidad por los denominados elementos de respuesta a NF- $\kappa$ B presentes en las regiones promotoras de los genes sensibles. En ausencia de estímulo, NF- $\kappa$ B se encuentra inactivo, típicamente secuestrado en el citoplasma al estar asociado a una proteína inhibidora I $\kappa$ B, como I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\gamma$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , Bcl-3, I $\kappa$ B $\zeta$  e I $\kappa$ BNS (vía canónica, ver más adelante). Las cuatro primeras son capaces de unirse de forma directa a NF- $\kappa$ B e impedir su translocación al núcleo. Por el contrario, Bcl-3, I $\kappa$ B $\zeta$  y I $\kappa$ BNS se encuentran en el núcleo e interaccionan con NF- $\kappa$ B regulando el modo en que este modifica el patrón de expresión génica celular en la proximidad con el material genético nuclear.

La cascada de señalización que concluye con la translocación de estos factores de transcripción puede darse esencialmente siguiendo dos rutas o vías de transducción de señal diferentes, la ruta clásica y la ruta alternativa. La opción que tiene lugar con una mayor frecuencia es la ruta clásica o canónica que termina produciendo la translocación del heterodímero formado por p50 / p65, aunque existen otras posibilidades de asociación entre los diferentes monómeros citados arriba. Este heterodímero se encuentra en estado quiescente en el citoplasma como se acaba de describir, interaccionando con I $\kappa$ B. La llegada del estímulo adecuado implica la fosforilación del complejo I $\kappa$ B *kinase* (IKK), en su subunidad reguladora IKK $\gamma$  o NEMO. Cuando esto ocurre, las subunidades efectoras de dicho complejo se activan y a su vez fosforilan a las proteínas I $\kappa$ B, que en ese estado son sensibles a la degradación proteasómica, lo que a su vez implica la liberación del heterodímero en cuestión que aparece libre para traslocar hacia el núcleo celular.

La ruta alternativa es menos frecuente. Tanto p105 como p100 contienen repeticiones en el extremo C-terminal que a nivel funcional son análogos de las proteínas I $\kappa$ B, de forma que impiden su propia translocación al núcleo. La degradación por ubiquitinación del extremo C-terminal de p105 y p100 da lugar a sus respectivas formas maduras, p50 y p52. Mientras que el proceso que determina la maduración que conduce la producción de p50 se da de forma constitutiva, la que



hace lo propio con p52 es inducida por la fosforilación del extremo C-terminal. La forma madura de p52 forma un heterodímero con RelB, el cual se desplaza al núcleo y allí interviene en la regulación de genes específicos. A diferencia de la vía clásica, la fosforilación de p100 es mediada por el homodímero IKK $\alpha$ -IKK $\alpha$ , con lo que no se requiere IKK $\beta$  o NEMO. Esta vía alternativa de activación es desencadenada por la señalización de los ligandos activadores de proteínas de membrana como CD40, el receptor  $\beta$  de linfotoxina y el receptor *B-cell-activating factor belonging to the TNF family* (BAFF).

La ruta de señalización celular gobernada por el factor de transcripción NF- $\kappa$ B es utilizada por múltiples receptores anclados en las membranas celulares o de localización citosólica para completar la modificación funcional celular asociada a la llegada del ligando estimulador específico en cada caso. En capítulos previos de este texto se ha descrito el papel que desempeña la ruta clásica de NF- $\kappa$ B en la señalización de los receptores TLR y NLR. En este sentido, resulta interesante describir en detalle las diferencias que se establecen a nivel del complejo de proteínas adaptadoras que inician dicha cascada de señalización en los receptores TLR, los del TNF (TNFR1 y TNFR2) y el de la IL1 (IL1R).

En primer lugar describiré el funcionamiento general en el caso de los TLR, para posteriormente especificar en qué puntos de la señalización se desmarcan las cascadas inducidas por la activación de los otros receptores citados. Los TLR activados reclutan varias proteínas adaptadoras en virtud de su contenido en dominios TIR, entre las que destacan MyD88, *TIR-containing adaptor protein/ MyD88-adaptor-like* (TIRAP/MAL), *TIR-containing adaptor inducing interferon- $\beta$  /TIR-domain-containing adaptor molecule 1* (TRIF/TICAM1) y *TIR-domain-containing adaptor molecule/TRIF-related adaptor molecule 2* (TRAM/TICAM2). De forma general, la señalización por TLR puede dividirse en dos vías, una dependiente de MyD88 y otra dependiente de TRIF. Aunque ambas activan la vía clásica de NF- $\kappa$ B, también activan de una forma paralela otras vías adicionales, usando para ello proteínas adaptadoras específicas (Imagen 3).

En la vía dependiente de MyD88 tras la activación del TLR la proteína adaptadora interacciona con los denominados *death domains* (DD) de la quinasa IRAK4, que forma parte del grupo proteico *IL-1 receptor-associated kinase* (IRAK), permitiendo su fosforilación. Ésta a su vez fosforila y activa la quinasa IRAK1. Tras la fosforilación secuencial de IRAK4 e IRAK1, éstas se disocian de MyD88 e interaccionan con la proteína TRAF6 que pertenece al grupo de las *TNF receptor associated factors* y con el componente regulador NEMO, induciendo su ubiquitinación. Una vez activadas, reclutan un complejo de proteínas quinasas formado por TAK1 y *TAK1 binding proteins* (TABs), que a su vez activan dos vías distintas que implican al complejo IKK y a la vía de las MAPK, que posteriormente será descrita en detalle. Como consecuencia de este último paso se produce la fosforilación específica de la subunidad IKK $\beta$  [173, 416].

Por otra parte se encuentra la vía dependiente de TRIF, utilizada por diversos TLR, entre ellos el TLR4 y otros de localización endosómica. En ella la proteína TRIF es capaz de interaccionar con dos proteínas adaptadoras al mismo tiempo, por un lado con TRAF6 y por el otro con *receptor interacting protein-1* (RIP1). A continuación se forma un complejo entre estas dos últimas proteínas citadas, que tiene capacidad para fosforilar y activar a TAK1, de modo que la señalización ya

continúa de un modo análogo al descrito anteriormente para la ruta estrictamente dependiente de MyD88 (Imagen 3) [417].

Además, es interesante destacar el papel de la proteína TBK1, que resulta decisiva en la inducción de la síntesis de interferones de tipo I (IFN $\alpha$  e IFN $\beta$ ) derivada de la activación de TLR3 o TLR4, mediante la activación de las proteínas IRF en su función como factores de transcripción, destacando entre ellas IRF3 y IRF7. En las células en reposo, IRF3 se encuentra en el citoplasma de forma inactiva; sin embargo, tras la estimulación de TLR3 o TLR4 se produce una fosforilación en la región C-terminal de IRF3 mediada por TBK1 y de forma independiente de MyD88, lo que permite a este formar un homodímero que ya puede traslocar a núcleo para ejercer su acción sobre sus genes diana específicos [418]. Curiosamente, tras la estimulación de TLR7 o TLR9, cuya señalización es estrictamente dependiente de MyD88, se activa la producción de interferones de tipo I de forma dependiente de IRF7. Esto es posible gracias a que en la señalización de estos receptores se produce la fosforilación de IRF7 de forma directa por parte de IRAK1 [419].

Una de las conclusiones que se pueden extraer de los párrafos anteriores es que la activación de la ruta canónica de NF- $\kappa$ B tras la unión de LPS a TLR4 es estrictamente dependiente de MyD88. Sin embargo, estudios *in vitro* han constatado que, aunque las células deficientes en dicha proteína adaptadora presentan una respuesta celular de producción de citoquinas pro-inflamatorias deprimida a corto plazo, esta se recupera sustancialmente con el tiempo. Este fenómeno se ha tratado de explicar en función de la ligera producción de TNF $\alpha$  derivada de la estimulación inicial [420].

A la hora de comparar las vías de transducción de señal dependientes de receptores TLR y del IL1R, cabe destacar que siendo extremadamente similares al compartir el mismo dominio intracelular TIR, presentan algunas diferencias. En primer lugar, mientras que la proteína decisiva para el reclutamiento de MyD88 en el caso de los TLR es TIRAP/MAL, en el del IL1R es Tollip [421, 422]. En segundo lugar, en la señalización del IL1R existe una alternativa a la ruta canónica de NF- $\kappa$ B pero que igualmente termina generando la translocación del heterodímero p50/p65, siendo esta dependiente de las proteínas *mitogen activated protein kinase kinase kinase 3* (MEKK3), *protein kinase C* (PKC) y *evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathways* (ECSIT) [423-425]. Para terminar, la señalización del IL1R carece de una vertiente que señalice hacia IRF3 o IRF7 y permita la inducción de la síntesis de interferones de tipo I (Imagen 5).

En lo referente a los receptores para el TNF (TNFR1 y TNFR2), cabe destacar que pertenecen a una superfamilia receptorial con gran relevancia en la homeostasis inmunológica a muchos niveles en el organismo, debido a sus múltiples implicaciones y dianas. Todos ellos comparten un mismo tipo de dominio extracelular, pero pueden presentar tres tipos diferentes de dominios intracelulares, que en última instancia determinan los tres subtipos receptoriales hoy en día descritos; TNFR1, que siendo el más ampliamente distribuido entre las células con función inmunitaria contiene un dominio intracelular tipo DD que recluta a la proteína *TNFR1 associated death domain* (TRADD) como adaptadora, y además se expresa mucho en células epiteliales, TNFR2 que contiene motivos que permiten el reclutamiento de TRAF y se expresa preferentemente en células T, y un tercer grupo de receptores que no contienen ningún motivo de señalización conocido y por tanto no serán tomados en consideración [426, 427].

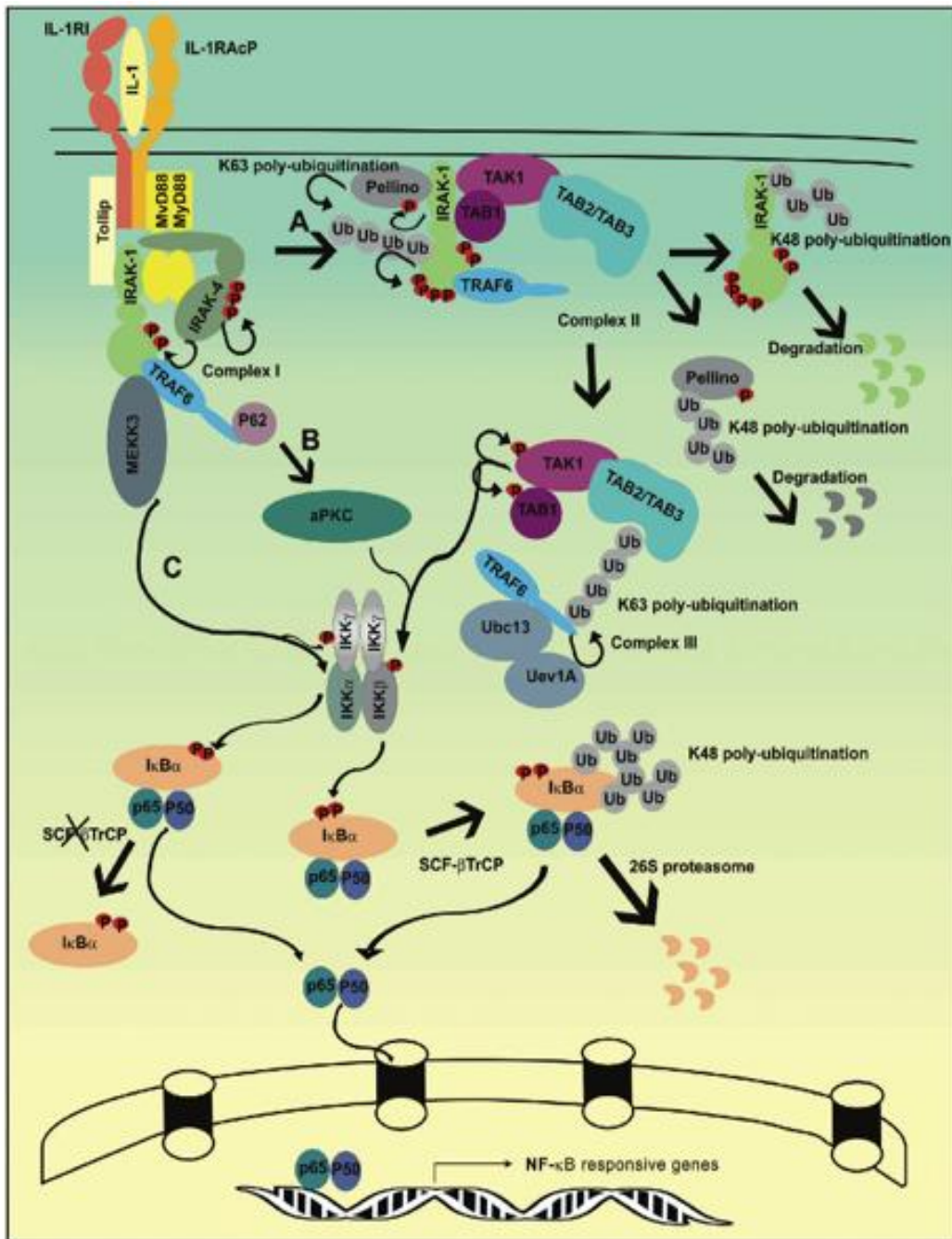


Imagen 5: Ruta de señalización del receptor de la IL1 hacia NF-κB

La cascada de señalización propia de los receptores del TNF es sustancialmente diferente a las dos anteriormente descritas. En este caso me centraré en la descripción de las vías de señalización que determinan las respuesta mediadas por el TNFR1, también conocido por CD120. Cuando este se une al TNF a través de su dominio extracelular, se activa y su dominio intracelular sufre un cambio conformacional que determina la unión con la proteína adaptadora TRADD, en virtud de la homología mutua en su contenido en DD. A continuación, TRADD se acopla a las proteínas adaptadoras TRAF2 y TRAF5, así como a la quinasa RIP1 [428, 429]. Tras la ubiquitinación de RIP1, esta proteína adquiere la capacidad de unirse con las proteínas TABs [430-432]. Curiosamente, tal y como ya se ha comentado para la señalización del IL1R, el TNFR1 es capaz de activar la ruta canónica de NF- $\kappa$ B de forma independiente de TAK1, haciendo uso de las proteínas MEKK3 o PKC (Imagen 6).

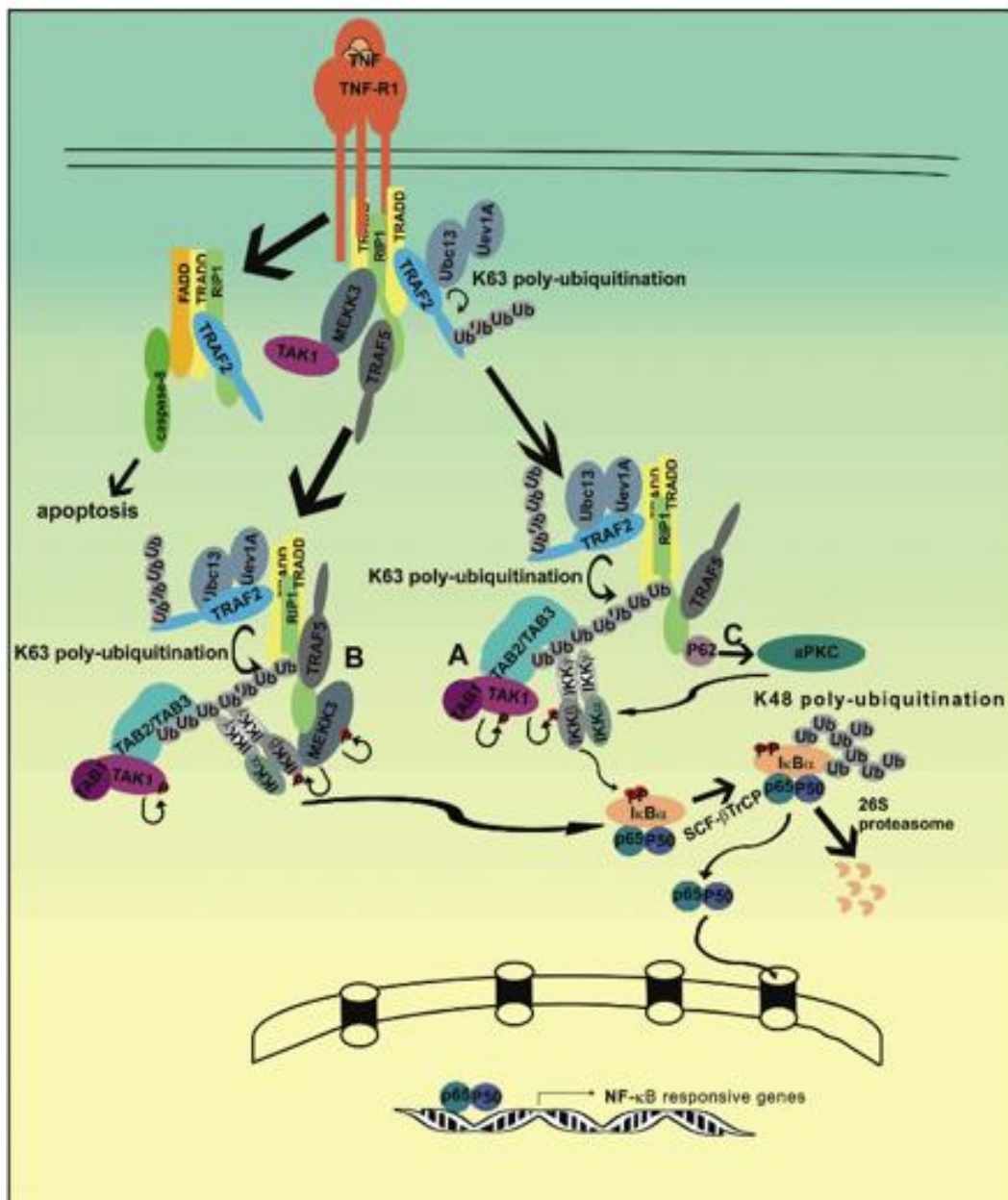


Imagen 6: Señalización del TNFR1 hacia NF- $\kappa$ B

### Vía de señalización de las MAPKs

Las cascadas de quinasas *mitogen-activated protein kinase* (MAPKs) están integradas por tres elementos que operan de un modo concatenado. La MAPKKK (quinasa de la quinasa de la MAP quinasa), la MAPKK (quinasa de la MAP quinasa) y la MAPK (MAP quinasa). Estas se van activando sucesivamente mediante reacciones de fosforilación, formando cascadas de señalización. Las MAPKKKs no se encuentran asociadas directamente con el receptor insertado en la membrana, sino que necesitan activarse por componentes intermediarios, cuya actividad va a depender directamente de la señalización controlada por dichos receptores al unirse a su ligando en cuestión. Los mediadores más comunes de esta conexión son la PKC y las proteínas de unión a GTP (proteínas G) monoméricas y heterotriméricas [433]. Estos intermediarios activan a las MAPKKKs fosforilando residuos Ser/Thr. A su vez, las MAPKKKs fosforilan residuos Ser/Thr de dominios catalíticos de las MAPKKs, y finalmente estas con las MAPK. Además de la región catalítica, las MAPKs poseen un dominio cuya secuencia les permite mantenerse unidas a sus MAPKKs activadoras, con fosfatasas que las inactivan y con los sustratos a los que fosforila, tratándose de interacciones excluyentes entre sí.

Las MAPKKs son unas proteínas que presentan una dualidad funcional biológicamente muy interesante, pues además de ser activadas por una MAPKKK corriente arriba, activan a otras MAPK en el corriente, por lo que se consideran puntos de convergencia que integran diferentes señales en una misma ruta. Por otro lado, las proteínas integradas en esta ruta de señalización intracelular tienen capacidad para migrar entre los diferentes compartimentos celulares ante determinados estímulos. En esta línea, se ha demostrado que pueden migrar hacia el núcleo, donde tienen capacidad modular la actividad de diferentes factores de transcripción, o a distintas zonas del citoplasma, donde fosforilan enzimas específicas como quinasas de proteínas, fosfatasas, lipasas o incluso componentes reguladores del citoesqueleto celular, entre los que destaca la proteína MLC, citada en capítulos anteriores [434].

Existen tres diferentes vías de señalización de MAPK bien caracterizadas en mamíferos. La de ERK1/2, la de p38 y por último la de JNK. En el caso de la vía de ERK, las MAPKKK más importantes son las proteínas Raf (A-Raf, B-Raf y c-Raf), claves en la respuesta a múltiples factores de crecimiento. Tras activarse, activan a su vez a MAPKK como MKK1 y MKK2 que son activadores específicos de las MAPK, ERK1 y ERK2. Las vías p38 y JNK comparten la mayoría de sus mediadores a nivel de MAPKKK (MEKK1, MEKK2, ASK1, TAK1, MLK3, TAOK1, entre otros). Algunas MAPKK pueden activar tanto p38 como JNK, como es el caso de MKK4, pero otras son específicas de JNK, como MKK7, o de p38, como MKK3 y MKK6. Atendiendo a las múltiples interferencias que se establecen de forma bidireccional entre las tres cascadas de señalización anteriormente descritas, la estimulación selectiva de una de ellas sin generar afectación alguna sobre las otras, resulta una tarea muy compleja [435].

### Vía de señalización JAK-STAT

La superfamilia de receptores de citoquinas tipo I y tipo II comprende receptores que se unen a una amplísima variedad de mediadores inmunológicos, destacando algunos como los interferones, interleuquinas con funciones muy diversas, factores estimuladores de colonias, así como factores de crecimiento. La mayoría de estos receptores utilizan la ruta de transducción de señal regulada por el binomio proteico *janus kinase (JAK)-signal transducer and activator of transcription (STAT)* [436].

Cuatro proteínas del grupo JAK han sido descritas a fecha de hoy, JAK1, JAK2, JAK3 y la *tirosín quinasa 2 (TYK2)*, teniendo todas en común su capacidad para asociarse específicamente a los dominios intra-citoplasmáticos de la variedad de receptores antes citada. Mientras que JAK3 y TYK2 están implicadas preferentemente en la regulación de la homeostasis durante las respuestas inmunológicas, JAK1 y JAK2 se caracterizan por una mayor heterogeneidad funcional, teniendo funciones relevantes a nivel inmunológico como los anteriores, pero también en la señalización de mediadores que controlan el equilibrio entre la proliferación y diferenciación celulares en diferentes tejidos, siendo muy ilustrativa su influencia en la hematopoyesis.

A nivel mecánico, cuando el ligando se une al receptor en cuestión, este sufre un cambio conformacional que determina la activación de la proteína JAK, lo que a su vez determina la fosforilación cruzada de estos mismos receptores. A estas proteínas se les unen las de la familia STAT, que cuenta con siete miembros descritos; STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b y STAT6. Al producirse la asociación entre la proteína JAK y la STAT en cuestión, esta última se ve fosforilada en un resto de tirosina, lo que les permite dimerizarse y posteriormente traslocar al núcleo celular. El papel decisivo que desempeñan todas estas proteínas en la transducción de señal de mediadores que a su vez desempeñan un papel insustituible en el desarrollo y la homeostasis del organismo queda patente en la medida que hay diversos ejemplos de ratones con delección genética para algunos de ellos que son directamente inviábiles por defectos severos en la embriogénesis, como ocurre para STAT3, STAT5a, STAT5b, JAK1 o JAK2 [436, 437].

Por la especial aplicación que tiene de cara a esta tesis doctoral, vale la pena detallar con algo más de profundidad los diversos procesos biológicos que, siendo controlados por STAT3, tienen relevancia en la homeostasis inmunológica intestinal, y que por tanto pueden relacionar esta proteína con la fisiopatología de la EII. En referencia al papel que juega en la regulación funcional de las células T, cabe destacar que STAT3 interviene en la transducción de señal de la que dependen las acciones de citoquinas como la IL6, la IL21 o la IL23, de las que a su vez depende la polarización de células T CD4 vírgenes hacia el subtipo Th17 [438-441] y la regulación funcional de otros tipos celulares como las DC o las ILC. Existen múltiples evidencias sobre el papel decisivo de STAT3 en el mantenimiento de un comportamiento tolerogénico en las APC en general, y las DC en particular, dado que está descrito que la deficiencia en esta proteína en DC determina que estas induzcan una activación mayor en las células T (mayor producción de IFN $\gamma$ ) con las que contactan en sinapsis inmunológica [442]. En general, está aceptado que esto último está relacionado con la ausencia de la inmunomodulación mediada por IL10 sobre estas células, lo cual queda de manifiesto al desarrollarse una colitis espontánea al eliminar experimentalmente la expresión de STAT3 de ciertas poblaciones celulares con función presentadora de antígenos como los

macrófagos principalmente [443, 444]. De esta forma, dado que STAT3 ejerce un papel determinante en la señalización de citoquinas con papeles radicalmente opuestos en la regulación funcional de las células T, resulta difícil desentrañar el papel que pudiera jugar en el contexto de la inflamación crónica asociada a la EII, al menos en lo referente a las células T CD4. Por otro lado, STAT3 sí que tiene un papel mucho más definido en células epiteliales intestinales. La IL22 es una citoquina que requiere de este factor de transcripción para su señalización, y que presenta una serie de efectos sobre las células epiteliales intestinales que contribuyen a la regulación y el mantenimiento de una buena estructura y función de barrera epiteliales. El STAT3 activado induce en las células epiteliales intestinales un aumento de la proliferación celular, la producción de múltiples péptidos antibacterianos y de mucinas, lo que justifica la relevancia que hoy se le da a este factor de transcripción en la homeostasis de la mucosa intestinal en condiciones basales y en inflamación [445, 446]. En este mismo sentido la IL27, que presenta un efecto favorecedor de la proliferación celular en las células epiteliales intestinales, y que también tiene efectos sobre células T [447], depende asimismo de STAT3, al igual que la IL11 o la IL6, que actúan como factores de crecimiento para las células madre intestinales, lo que las convierte en relevantes en la homeostasis de la mucosa intestinal [448, 449]. Tanto es así que los ratones con delección específica de STAT3 en células epiteliales intestinales son más susceptibles a la colitis inducida por DSS, debido a una menor capacidad de restitución epitelial y de contención de los antígenos lumenales [450]. Finalmente, en concordancia con los conceptos antes expuestos, hay evidencias científicas sobre la existencia de polimorfismos que afectan al gen codificante para STAT3 que se asocian con un riesgo incrementado de padecer EII [451]. Otros mediadores solubles potencialmente relevantes en la fisiopatología de la EII y que en su cascada de transducción de señal usan a STAT3 son GMCSF, IL35, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), la leptina o la hormona del crecimiento (GH) [452].

### **Vía de señalización de Wnt/ $\beta$ -Catenina**

Las proteínas pertenecientes al conjunto de las señales Wnt reciben dicha denominación por el primer componente del grupo que pudo ser descrito, la proteína Wingless, que demostró ser decisiva en el desarrollo de la larva de *Drosophila* [453]. Posteriormente se encontró un homólogo de esta proteína en ratón y humano, denominada Wnt-1 [454], hace ya más de 30 años. En la actualidad se encuentran descritos 19 genes codificantes humanos independientes para proteínas que se integran en este grupo, teniendo todas ellas en común que se encuentran muy conservadas de forma transversal en el reino animal, desde organismos muy sencillos hasta los más complejos, debido a su relevancia en la embriogénesis y la maduración tisular. En los últimos años se han obtenido múltiples evidencias sobre el modo en que estas proteínas están implicadas en la homeostasis de tejidos tan dispares como el óseo [455], el intestinal e incluso el neuronal regulando su plasticidad, lo que justifica la diversidad de desórdenes que se encuentran asociados a mutaciones en los genes codificantes o implicados en su regulación [456]. Asimismo, debido a su influencia en la proliferación celular, existen diversos tipos de cáncer, entre los que destacan los de localización intestinal y los de mama, cuyas células madre encuentran en las señales Wnt unos importantes aliados de cara a su persistencia y proliferación [457-461]. Todas las proteínas del grupo de las señales Wnt son sintetizadas en una forma inactiva que lleva una etiqueta hidrofílica en el extremo N-terminal, que hace que se dirija al retículo endoplásmico para ser procesada tras su síntesis. Allí, mediante la acción de proteasas residentes, se le retira dicha etiqueta y se le adicionan restos glucídicos y lipídicos (ácido palmitoleico) que mejoran su distribución y eficacia

en las células diana, haciendo uso de un complejo sistema enzimático para dicho procesamiento post-transcripcional [462]. Entre las señales Wnt descritas quizá dos de las más relevantes por estar presentes en ratón y el humano, y por su importancia funcional, son Wnt3A, Wnt8A y, con un creciente interés en los últimos años, las proteínas R-spondin (RSPO) y Norrin, las cuales también presentan actividad como ligandos activadores de la cascada que se describe en este apartado [463, 464]. Todas ellas cuentan con otra característica en común, la de actuar de un modo generalmente paracrino teniendo siempre su célula diana a una distancia relativamente corta respecto de la fuente productora.

Las señales Wnt, RSPO y Norrin, al unirse al receptor específico en la célula diana, desencadenarán la activación de una de las siguientes tres cascadas de señalización. La canónica, asociada a *T-cell factor* (TCF)/ $\beta$ -catenina; la no canónica (*planar cell polarity*, PCP o independiente de  $\beta$ -catenina); o la denominada ruta Wnt/Ca<sup>2+</sup> [465, 466]. La más importante de ellas es la primera, por ser preponderante en el control de la homeostasis de las células inmunológicas en general y epiteliales en particular, debido a su estrecha relación con el control de la proliferación y diferenciación celulares. Además, es también la mejor caracterizada hasta la fecha. Existen tres tipos principales de receptores para estas moléculas que conectan con las cascadas canónica de Wnt/ $\beta$ -catenina, los *Frizzled* (FZD), los *LDL-receptor related protein* (LRP) y los *leucin reach repeat containing G protein-coupled receptor* (LGR) siendo el más destacado de estos el LGR5 [467, 468]. La señalización de las señales Wnt clásicas como la Wnt3A, así como las proteínas Norrin, utiliza como diana y mediadores de su transducción de señal la asociación de receptores FZD y LRP [469-471], mientras que las RSPO parecen usar una asociación entre receptores LGR y LRP [472, 473]. Asimismo, antes de proceder a la descripción de la vía de señalización propiamente dicha, cabe destacar que existen moléculas que actúan en sentido opuesto por varios mecanismos, y cuya síntesis y secreción como mediadores solubles depende en gran medida de la transactivación asociada a  $\beta$ -catenina. Por esta razón se le considera un mecanismo de autorregulación en el propio tejido diana, aunque su expresión y por ende su abundancia relativa se ve modulada por diferentes agentes farmacológicos u otros en todo caso ajenos a la propia cascada de señalización en sí misma. Entre ellos destacan, por un lado, los *secreted Frizzled related protein* (sFRP) y el *Wnt inhibitory factor-1* (WIF-1), que actúan bloqueando la señal Wnt en cuestión y, por el otro, los miembros de la familia *Dickkopf* (DKK), entre los que destaca DKK1, que actúan bloqueando directamente los receptores LRP ejerciendo una acción antagonista [474].

Para entender cómo funciona la ruta canónica de Wnt/TCF/ $\beta$ -catenina, es necesario comprender cómo se encuentra esta cascada de señalización en estado quiescente, es decir, en ausencia de ligando activador. Esta ruta tiene como fin último el control de la translocación hacia el núcleo de la  $\beta$ -catenina como factor de transcripción. En ausencia de señal Wnt la  $\beta$ -catenina se encuentra secuestrada unida a un “complejo de destrucción” formado por las proteínas *adenomatous polyposis coli* (APC), *casein kinase 1* (CK-1) y *glycogen synthase kinase 3* (GSK-3). Mientras que APC ancla directamente la  $\beta$ -catenina al complejo proteico, las otras dos proteínas se encargan de fosforilar al factor de transcripción en su extremo N-terminal, lo que genera una región susceptible de ubiquitinación [475]. Por tanto, en estas condiciones la fosfo- $\beta$ -catenina es degradada por el proteasoma en el citoplasma celular, sin que pueda ejercer su acción como factor de transcripción. Esto implica que en el núcleo la proteína TCF se encuentre formando un complejo formado por proteínas denominadas Groucho, ocupando los promotores de los genes diana de la  $\beta$ -catenina, de



forma que se impide su activación transcripcional. Cuando una señal Wnt se une a sus receptores FZD y LRP (especialmente LRP5 y LRP6), se genera un cambio conformacional en la estructura de estos que permite que se asocien mutuamente estableciéndose muy próximos en la membrana celular. Este hecho permite la fosforilación del dominio intracelular de LRP6 por parte de CK-1, al que seguidamente se unirá la totalidad del “complejo de destrucción”, lo que a su vez implica la inhibición de la degradación proteasómica de  $\beta$ -catenina [476, 477]. Como consecuencia, esta se acumula en el citoplasma celular y puede trasladarse hacia el núcleo, a través de mecanismos mal caracterizados [478]. Allí interactúa con las proteínas de la familia TCF (TCF1, TCF3, TCF4 y Lef1), desplazando a las proteínas Groucho y dando lugar a un complejo TCF- $\beta$ -catenina que presenta una potente actividad promotora de la transcripción de los genes diana de esta última [479, 480]. La  $\beta$ -catenina se ayuda de algunas proteínas auxiliares, entre las que destaca la *acetylase CREB-binding protein* (CBP), la *Brahma-related gene-1* (BRG-1), Hyrax y Pygopus. En general, se establece una relación de potenciación mutua sobre la activación de esta cascada de señalización por parte de las señales Wnt y RSPO, en la medida que ambas moléculas activan complejos receptoriales distintos, pero que confluyen funcionalmente en la activación de la ruta de transducción de señal descrita arriba [481].

En la actualidad hay descritos unos 400 genes diana para este complejo transcripcional, pero el patrón de activación varía en función del tejido considerado. Profundizando en el caso intestinal, dicho patrón de activación determina acciones biológicas como la promoción de proliferación y auto-renovación de las células madre intestinales [482, 483], así como la maduración terminal de los diferentes tipos celulares que componen dicho epitelio, siendo especialmente destacable el caso de las células de Paneth [484]. Esto justifica su papel fundamental en la regulación del equilibrio dinámico que determina la homeostasis intestinal en condiciones basales, pero sobre todo ante una inflamación sobrevenida por una agresión epitelial como ocurre en el modelo de colitis inducida por DSS [485].

## 4. MODELOS EXPERIMENTALES EN LA EII

Los modelos experimentales permiten llevar a cabo estudios controlando las condiciones ambientales, genéticas y las referentes al protocolo experimental a aplicar, de forma que constituyen una herramienta insustituible de cara al estudio de los mecanismos fisiopatológicos que subyacen en los distintos desórdenes que afectan al ser humano.

En el caso de la EII no existe hoy en día un modelo capaz de reproducir con exactitud la complejidad de la patología que se desarrolla en humanos. Sin embargo, los modelos desarrollados hasta la fecha, su mayoría en roedores, son capaces de reproducir diferentes características inherentes a la EII. Estos se clasifican en función del mecanismo mediante el cual son inducidos, diferenciándose en inducidos químicamente, inducidos por modificación genética, inducidos por transferencia celular y espontáneos.

### 4.1. Modelos experimentales de colitis inducidos químicamente

#### Colitis inducida por ácido acético

Este es un modelo de colitis aguda que fue descrito en 1978 por MacPherson y Pfeiffer [486]. Tras la administración intrarrectal de ácido acético disuelto en agua en una concentración de 4-50% (v/v), se desarrolla inflamación limitada a la mucosa o transmural, dependiendo de la concentración y el volumen de ácido acético utilizado, que determina la profundidad y agresividad de la misma.

#### Colitis inducida por iodoacetamida

La administración intrarrectal de iodoacetamida produce un daño en la mucosa intestinal que genera una colitis caracterizada por diarrea y pérdida de peso, asociada a dilatación colónica y adhesiones significativas con otros segmentos intestinales [487, 488]. Se produce una respuesta inflamatoria exacerbada gobernada por citoquinas del sello Th1 como  $TNF\alpha$ ,  $IL1\beta$  e  $IL6$ , así como una disminución de los mecanismos de defensa antioxidante y la producción de mucinas [489].

#### Colitis inducida por sulfato de dextrano sódico (DSS)

Este modelo fue descrito por primera vez por Okayasu en 1990 [490]. La administración de DSS en agua de bebida induce una colitis que se caracteriza esencialmente por la aparición de una diarrea sanguinolenta, ulceraciones y una potente infiltración leucocitaria. El DSS resulta tóxico para las células epiteliales intestinales en general por afectación de la estabilidad de la membrana celular, lo cual tiene consecuencias especialmente significativas cuando se ven afectadas las células madre en la base de las criptas. Esto afecta a la reposición celular normal en este epitelio, lo que compromete de forma importante la función de barrera epitelial, dando lugar al acceso de antígenos de la microbiota a capas subyacentes de la mucosa intestinal, donde van a ser detectados por células inmunes de carácter innato. Estas células van a iniciar una respuesta inmunológica protectora que tratará de contener a las bacterias en la luz intestinal, produciendo además quimioquinas que provocarán el reclutamiento de granulocitos (principalmente neutrófilos), y a su vez la iniciación de una respuesta inmune adaptativa que será más tardía (desde el día 4-5 en adelante) y que será conducida por células T CD4 polarizadas mayoritariamente a los subtipos Th1 y Th17. Este modelo es especialmente útil para estudiar la contribución del sistema inmune innato

en la inflamación intestinal, dado que se desarrolla con normalidad en ausencia de inmunidad adaptativa en ratones RAG1 KO [491]. Actualmente es probablemente el modelo más utilizado para el estudio de mecanismos patogénicos y para el ensayo de terapias experimentales, posiblemente por su simplicidad y facilidad de aplicación. Existe una variante que se presume más crónica, consistente en la alternancia de varios ciclos de exposición a DSS y de descanso, así como una tercera opción en la que la exposición es continuada pero utilizando dosis relativamente bajas, que no producen una respuesta aguda marcada. Asimismo, mediante la combinación de DSS y el carcinógeno azoximetano (AOM) se dispone de un modelo de carcinogénesis intestinal asociada a inflamación [492].

### **Colitis inducida por ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS)**

El modelo de colitis por ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) fue descrito en un principio por Morris en el año 1989, en rata [493]. Dado que el TNBS no es tóxico de forma directa para el epitelio, se administra por vía intrarrectal en una solución de etanol al 50%, la cual daña el epitelio y permite el acceso del TNBS a la mucosa. En dicho contexto, este se comporta como un hapteno, desencadenando una respuesta de hipersensibilidad retardada previa reacción con las proteínas tisulares. En ausencia de TNBS la respuesta inflamatoria al etanol es aguda y se resuelve completamente en unos 3-4 días. Por el contrario, la combinación TNBS/etanol produce una respuesta que se prolonga durante algunas semanas. El modelo fue adaptado posteriormente al ratón, en el cual se ha descrito una respuesta inmunológica que viene determinada esencialmente por citoquinas del sello Th1, además de una menor sensibilidad al etanol, lo que parece hacer necesaria la presensibilización de los animales al TNBS vía tópica, antes de su administración vía intrarrectal [494, 495].

La afectación colónica se caracteriza por ser de tipo transmural, con anorexia, potente pérdida de peso y diarrea. Se produce una necrosis epitelial, seguida de una inflamación de la mucosa, con formación de granulomas y fibrosis marcada, además de alteraciones funcionales como trastornos en el transporte hidroelectrolítico y en la motilidad.

## **4.2. Modelos de inflamación intestinal generados por modificación genética**

El desarrollo de la ingeniería genética aplicada al embrión de las diferentes cepas de ratones de laboratorio ha dotado a los investigadores de una libertad absoluta para estudiar en profundidad el papel que juega el producto de la expresión de cualquier gen, en la biología general del animal y particular en determinados tejidos específicos. En este sentido, el campo de la gastroenterología experimental no ha supuesto una excepción, y por tanto, entre la gran cantidad de animales generados por transgénesis o por delección genética total o específica de tejido, han aparecido algunos que al sufrir *per se* una inflamación intestinal se han convertido en modelos experimentales de EII. Los más representativos entre los descritos a día de hoy, aparecen clasificados a continuación en virtud de la alteración funcional que gobierna el inicio de la inflamación en cada uno de ellos e identificados por la modificación genética que los caracteriza.

*Defecto en la función de barrera intestinal:* ABCB1 KO [496], GNAI2 KO [497], MyD88<sup>ΔIEC</sup> [75], NEMO<sup>ΔIEC</sup> [76], TAK1<sup>ΔIEC</sup> [77], N-cadherin KO [498], MUC2 KO [54], MDR1 KO [499], TNFAIP3<sup>ΔIEC</sup> [500].

*Disfunción en el equilibrio entre células T activadas y células T reguladoras:* IL10 KO [501], IL10Rb KO [501], RelA (NF-κB1) KO [502], IL2 KO [503], IL2Ra KO [503], TGFβ1 KO, TGFβR2 KO [504], TNFα<sup>ΔARE</sup> [505], TCRα KO [506], WASP KO [507], transgénico para CD40L [508], SMAD3 KO [509, 510], IL7 KO [511], transgénico en STAT4 [512].

*Pérdida de tolerancia antigénica en el sistema inmune innato:* Deleción específica de STAT3 en macrófagos y células polimorfonucleares, deleción de STAT3 en células de series mieloide y linfoide [443].

### 4.3. Modelos espontáneos de inflamación intestinal

Se ha demostrado que algunos animales de experimentación desarrollan colitis espontáneamente. Es el caso de las cepas de ratón C3H/HeJBir o SAMP1/Yit. Los ratones C3H/HeJBir son una subcepa de los ratones C3H/HeJ que fue generada mediante cruces selectivos entre aquellos individuos que desarrollaban colitis de un modo espontáneo. Esta cepa presenta un fenotipo muy susceptible a desarrollar colitis que aporta nuevos conocimientos en las interacciones entre sistema inmunológico, el ambiente y los factores genéticos que dan lugar a la EII [513]. Los ratones SAMP1/Yit desarrollan una ileítis similar a la que se produce en la EC, por lo que resulta un modelo específicamente indicado para la investigación de la fisiopatología específica de la EC. Además, los monos de la especie "*cotton-top tamarin*" también desarrollan una inflamación intestinal espontánea a la cual se le atribuye una gran similitud con las características propias de la EII en humanos, o al menos se acercan mucho más a su fisiopatología que los modelos inducidos químicamente que presentan un curso generalmente autolimitado [514].

### 4.4. Modelos de colitis inducida mediante transferencia celular

Fiona Powrie puso de manifiesto a finales del siglo pasado que la inyección de células T CD4<sup>+</sup> CD45RB<sup>hi</sup> a ratones sin timo daba lugar a un proceso inflamatorio intestinal que no se producía si se utilizaban células T CD4<sup>+</sup> no fraccionadas (mezcla de células CD45RB<sup>hi</sup> y CD45RB<sup>lo</sup>), lo que sugiere que la respuesta inflamatoria se origina en un desequilibrio inmunoregulador inicial [515, 516]. Más tarde, otros investigadores obtuvieron hallazgos en esa misma línea tras la inyección de dichas poblaciones celulares en ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID) [517]. Aunque se han descrito diversas variantes del modelo, sobre todo en función del criterio en términos de marcadores de superficie en virtud del cual se purifican las células T vírgenes que se transfieren (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> o CD4<sup>+</sup> CD45RB<sup>hi</sup>) [518], el proceso inflamatorio en todos los casos es muy similar, quedando esencialmente confinado en el colon, presumiblemente debido a su mayor carga bacteriana luminal. El colon presenta un marcado engrosamiento debido tanto a la hiperplasia del epitelio como a la infiltración de linfocitos y macrófagos en la lámina propia y la mucosa. El intestino delgado sufre una afectación meramente tangencial, ya que únicamente se observa una infiltración difusa de células mononucleares en la lámina propia.

Transcurridas unas semanas tras la transferencia celular, los ratones comienzan a perder peso y a presentar diarrea con sangre oculta en heces. De forma independiente del proceso inflamatorio intestinal, estos animales tienen una afectación cutánea bastante notable, aunque no existen evidencias científicas consistentes que describan dicho fenómeno paralelo, el cual a buen seguro debe presentar similar etiología al intestinal. El proceso inflamatorio que se desencadena está dominado por citoquinas de tipo Th1 (IL12, IL18, IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ ) [519] y las del eje IL17/IL23 [520]. El desarrollo de este modelo de colitis queda atenuado ante la co-transferencia de DC con fenotipo tolerogénico o de células Treg [521, 522]. Este modelo se ha utilizado casi exclusivamente para estudios de modulación inmunológica, pero puede constituir de hecho el modelo más adecuado para hacer estudios farmacológicos con un enfoque traslacional hoy en día, ya que es uno de los que refleja más fielmente las características de la EII, especialmente de la EC.

## 5. TRATAMIENTO DE LA EII

El desconocimiento de la causa que subyace en la fisiopatología de la EII impide el establecimiento de una estrategia terapéutica específicamente dirigida ante una diana farmacológica concreta. Por tanto, en el manejo clínico de la EII se hace uso de diversos fármacos que no desarrollan más que una acción de carácter inespecífico orientado al control sintomático de la patología. Las alternativas farmacológicas disponibles en este sentido han aumentado mucho en los últimos años, pero el hecho de que no sean capaces de controlar la causa etiológica primera del desorden, unido al perfil de efectos adversos que caracteriza a la mayoría, justifica el gran esfuerzo investigador que en las últimas décadas se está haciendo para tratar de diseñar estrategias terapéuticas más seguras y eficaces. A continuación se describen brevemente las principales herramientas farmacológicas que hoy en día se usan en la práctica clínica relacionada con la EII, a excepción de los glucocorticoides que, por su relevancia en este tesis doctoral, recibirán atención especial en el siguiente capítulo.

### 5.1. Aminosalicilatos

El ácido 5-aminosalicílico (5-ASA), que también recibe la denominación de mesalazina, es un fármaco que se emplea en el tratamiento de la CU desde hace ya bastante tiempo [523, 524]. Esta molécula se ha administrado clásicamente como profármaco formando parte de la sulfasalazina (5-ASA unido a sulfapiridina), la cual por la acción de azoreductasas de la microbiota colónica es degradada liberando la forma farmacológicamente activa específicamente en el colon, lo que justifica que esta opción sea significativamente más eficaz en el tratamiento de la CU, aunque este extremo aún hoy en día sigue siendo objeto de intenso debate [525, 526]. Posteriormente se describió cómo la eficacia del 5-ASA es directamente dependiente de la concentración y el tiempo de contacto con el segmento intestinal afectado [527, 528]. A partir de ahí se diseñaron formas farmacéuticas orales de liberación controlada para conseguir su liberación en distintas zonas del intestino. Otra alternativa bastante utilizada es la aplicación de mesalazina de forma tópica-directa mediante el uso de formas farmacéuticas como supositorios o enemas. La combinación de esta última posibilidad con el uso de la mesalazina vía oral ha mostrado una eficacia muy apreciable en el control agudo de recidivas de CU.

El mecanismo de acción de la mesalazina/sulfasalazina no se conoce con exactitud. Se considera que no está relacionado con la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, como ocurre en el caso de los salicilatos [529, 530]. Actualmente hay evidencias que apoyan la teoría de una modulación de tipo inhibitorio de la ruta de señalización canónica de NF- $\kappa$ B, reduciendo la degradación y por tanto aumentando la presencia en el citoplasma de la proteína I $\kappa$ B $\alpha$  [531-533].

Estos fármacos en general son muy bien tolerados, presentando un perfil de efectos adversos bastante discreto. Con escasa frecuencia provoca, mareos, fiebre, dolor de cabeza, dolor abdominal, náuseas o erupciones cutáneas [534]. Otros efectos adversos relativamente frecuentes son la oligospermia y la deficiencia en folato, los cuales aparecen exclusivamente asociados a las presentaciones que incluyen la mesalazina en forma de profármaco, es decir, la sulfasalazina, ya que es la sulfapiridina la responsable directa de estos [535, 536].

## 5.2. Azatioprina y 6-mercaptopurina

La 6-mercaptopurina y su profármaco azatioprina son antimetabolitos púricos utilizados fundamentalmente en el tratamiento del cáncer y que presentan paralelamente propiedades inmunosupresoras. Su metabolito activo, la 6-tioguanina, se acumula intracelularmente impidiendo la síntesis de purinas y ácidos nucleicos y la reparación del DNA, lo que conlleva una inhibición de la división y proliferación celular, siendo éste el mecanismo probable de su acción inmunosupresora, la cual justifica su aplicación en el control de la inflamación intestinal crónica que caracteriza a la EII [537].

Los principales efectos adversos descritos para estos fármacos pueden clasificarse en dos categorías; alergias, que se manifiestan con pancreatitis, fiebre, erupciones, náuseas, diarrea o hepatitis; o toxicidad por una dosificación excesiva, que puede dar lugar a depresión a nivel de médula ósea y leucopenia, anemia o trombocitopenia, con un mayor riesgo de infecciones oportunistas. Existen polimorfismos genéticos asociados a la eficacia y toxicidad de estos fármacos.

## 5.3. Metotrexato

El metotrexato es un análogo estructural del ácido fólico que inhibe la dihidrofolato reductasa y otras enzimas. Este fármaco ha sido muy usado para el tratamiento del cáncer, precisamente por su efecto antiproliferativo, pero su aplicación en el tratamiento de desórdenes de naturaleza inflamatoria como la artritis reumatoide o la EII no depende tanto de dicho efecto sino de su capacidad para inducir apoptosis y reducir la activación de los linfocitos T. Estos efectos de carácter inmunomodulador se manifiestan a dosis mucho más bajas que las necesarias para alcanzar eficacia terapéutica en el control de procesos neoplásicos [538].

Los efectos adversos del metotrexato son relativamente frecuentes y muchos de ellos bastante significativos. Esto no es sorprendente si uno considera que la dihidrofolato reductasa ejerce un papel esencial en la síntesis de ácidos nucleicos y por tanto de forma indirecta en la homeostasis de múltiples tejidos del organismo que requieren de una intensa proliferación celular incluso en condiciones basales. Estos efectos adversos pueden ser clasificados en tres grupos bien definidos; efectos antiproliferativos en médula ósea, epitelio intestinal y folículos pilosos, los cuales aparecen exclusivamente ante la aplicación de dosis altas; reacciones idiosincrásicas de hipersensibilidad; y fibrosis hepática o pulmonar asociada a la exposición a largo plazo. A pesar de la espectacularidad

y gravedad de algunos de ellos, en su mayoría remiten al reducir la dosis o con la retirada total del tratamiento.

Se han descrito algunos casos de resistencia al metotrexato, los cuales suelen asociarse a una respuesta compensadora caracterizada por el aumento de la expresión de la enzima diana por parte del paciente [539].

### 5.4. Ciclosporina y tacrolimus

Estos dos fármacos, siendo molecularmente diferentes, presentan una analogía total en lo referente a su farmacodinamia. Ambos presentan un potente efecto inmunosupresor, derivado de su capacidad para formar ciertos complejos proteicos en el citoplasma celular que son capaces de inhibir la fosfatasa de la calcineurina. Esto implica la inhibición de la activación del NFAT, el cual dirige la expresión génica de citoquinas que tienen un especial impacto en la proliferación y funcionalidad de las células T, como el IFN $\gamma$  o la IL2, entre otras acciones [540].

La ciclosporina genera el efecto inmunosupresor de una forma muy rápida. Esto hace que esté especialmente indicada en el control agudo de las recidivas intensas de CU, ya que al asociar su administración a la terapia de choque convencional a base principalmente de aminosalicilatos, se consigue una mejoría clínica significativa en el 70% de los casos durante los siguientes 10-15 días, y lo que es más importante, se evita la colectomía de urgencia.

Los efectos adversos más comunes para estos fármacos son parestesias y cierta hipertricosis. Además, aunque la experiencia clínica en su uso ya es bastante amplia y sus niveles plasmáticos son siempre en todo caso estrechamente monitorizados, debido a lo estrecho de su ventana terapéutica, dichos efectos adversos se presentan con una frecuencia que llega a alcanzar el 50% de los casos.

### 5.5. Terapia biológica

Los grandes avances que se han producido en las últimas décadas en el campo de la biotecnología han permitido que hayan sido desarrolladas varias alternativas terapéuticas de naturaleza biológica/biotecnológica para el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas como la artritis reumatoide o la propia EII. El principio farmacodinámico por el que se rigen estos tratamientos es radicalmente diferente al de las opciones anteriormente descritas. En este caso, la diana farmacológica es un mediador o receptor concreto al que se atribuye un papel decisivo en la fisiopatología de la EII, el cual será bloqueado mediante la administración de un anticuerpo monoclonal, una proteína de fusión o una proteína recombinante, en función de cada caso concreto. De forma general podemos hablar de dos estrategias en el uso de las terapias biológicas, por un lado la neutralización de citoquinas pro-inflamatorias, y por el otro la administración de citoquinas inmunomoduladoras.

En referencia a la primera posibilidad, las citoquinas inflamatorias que suponen una diana interesante en la terapia biológica son, hasta la fecha, el TNF $\alpha$ , la IL1 $\beta$  [541], el eje IL12/IL23/IFN $\gamma$  para el que se ha desarrollado el ustekinumab [542], la IL6 para la que se ha desarrollado un anticuerpo específico (tocilizumab) [543] e incluso quimioquinas como ocurre con el vercirnon que es una proteína de fusión que bloquea el receptor de quimioquinas 9 (CCR9) [544]. Entre ellas, la

que más atención ha recibido y por tanto, en torno a la que se ha desarrollado un mayor número de fármacos de extensa aplicación en la clínica de la EII, es el TNF $\alpha$ . Las moléculas sintéticas que se van a unir a dicha citoquina en su forma soluble o unida a la membrana impiden la unión a su receptor, y por tanto la ejecución de sus actividades biológicas [545]. Los ejemplos más representativos por su perfil de eficacia y seguridad son el infliximab y el adalimumab. El infliximab es un anticuerpo monoclonal quimérico humano-murino que se administra únicamente vía intravenosa, mientras que el adalimumab un anticuerpo monoclonal humanizado que es administrado vía subcutánea. En un principio, el lugar que ocupaban dentro del algoritmo de decisión en el manejo clínico de la EII estaba reservado a casos de ausencia de respuesta o dependencia de las terapias de primera línea ya descritas, pero en la actualidad los gastroenterólogos optan por esta opción con una frecuencia creciente. El infliximab es con diferencia el que presenta un uso más extendido en la actualidad, teniendo un rol central en el tratamiento de la EC. Concretamente ha resultado ser muy eficaz en la inducción de remisión en pacientes con EC moderada y que son resistentes a terapias convencionales, siendo especialmente útil favoreciendo el cierre de fístulas intestinales. Aunque el mecanismo de acción primario es el bloqueo del TNF $\alpha$ , existen varios mecanismos adicionales, que dependen de la interacción con el TNF $\alpha$  de membrana, que están bien caracterizados pero cuya contribución última al efecto clínico global se desconoce en la actualidad. La controversia en este sentido se alimenta considerablemente por la desigual eficacia de los fármacos anti-TNF $\alpha$  en la EII, que puede estar relacionada con aspectos mecánicos, pero también farmacocinéticos o derivados del régimen de dosificación. Entre los efectos adversos del infliximab, destacan por un lado las reacciones de hipersensibilidad, y por otro el aumento del riesgo de padecer infecciones oportunistas, entre las que destaca la reactivación de la tuberculosis. También aumenta la incidencia de ciertos tipos de cáncer. La eficacia mostrada por el infliximab ha hecho crecer el interés en la modulación del efecto del TNF $\alpha$  como citoquina gobernadora de la respuesta inmune Th1 propia de la EC. Por tanto, están siendo tomadas en consideración otras alternativas no biológicas como la talidomida [546-548] o los inhibidores de la enzima conversora del TNF $\alpha$  [549], que presentan una farmacodinamia orientada sobre dicho mediador soluble inflamatorio.

La administración de citoquinas con actividad antiinflamatoria ha recibido una atención por parte de la comunidad médica mucho menor a la que se le ha rendido a las terapias anti-TNF $\alpha$ . Este hecho se debe probablemente al fracaso del ensayo terapéutico de la IL10, que por ser una citoquina netamente antiinflamatoria se consideraba muy prometedora [550, 551]. En el extremo opuesto, se ha ensayado el GM-CSF (sargramostim) en el tratamiento de la EC con cierto éxito.

Además, en los últimos años se han desarrollado diversos fármacos biológicos para el tratamiento de la EII cuya diana farmacológica son las moléculas de adhesión que permiten el reclutamiento leucocitario a los focos inflamatorios. Aunque en la actualidad siguen sin haber sido introducidos en la práctica clínica, los ensayos clínicos de los que están formando parte están arrojando resultados bastante prometedores. Los más relevantes son, el natalizumab que es un anticuerpo monoclonal humanizado contra la integrina  $\alpha4\beta7$  [552], el vedolizumab dirigido a MadCam1 [553] y el etrolizumab que se une a la subunidad  $\beta7$  [554].

Por último, la cascada de señalización de JAK-STAT previamente descrita ha recibido atención en este sentido debido a su relevancia en la transducción de señal de múltiples citoquinas directoras de la inflamación intestinal. Atendiendo a esta evidencia, se ha desarrollado el



tofacitinib que inhibe a las proteínas transductoras JAK1, JAK2 y JAK3, habiendo mostrado una eficacia notable en diversos ensayos clínicos con pacientes de CU, aunque su seguridad aún es una materia de discusión [555, 556].

### 5.6. Terapia génica

La terapia génica consiste en la introducción de un gen activo y funcional, o bien de un RNA pequeño de interferencia (siRNA), en células somáticas con el fin de aumentar o reducir el perfil de expresión de una determinada proteína de cuya modulación pueda derivarse un beneficio clínico, mediante el empleo de un vector vírico [557-560]. La investigación clínica que se está realizando acerca de estos procedimientos es ingente, ya que campos como la oncología también tienen muchas expectativas puestas en este enfoque terapéutico para mejorar la escasa selectividad de las herramientas de las que disponen en la actualidad. Sin embargo, hoy en día no existe ningún gen cuya modulación por terapia génica en humanos esté siendo aplicada en la práctica clínica de la EII, aunque hay esperanzas depositadas en la modulación mediante esta tecnología de genes como los codificantes para la ciclooxigenasa-2 (COX2) [561] o la proteína de adhesión ICAM-1 [562].

### 5.7. Terapia con células madre

Las células madre hematopoiéticas (HSC) y las células madre mesenquimales (MSC) están apareciendo en los últimos años como alternativas reales para el manejo clínico de la EII (sobre todo la CU) en pacientes que muestran una insatisfactoria respuesta a todas las alternativas terapéuticas ya establecidas en la clínica habitual y que ya han sido citadas con anterioridad en este apartado. Esto ha sido así debido a los prometedores resultados que su uso ha mostrado en diversos modelos de colitis experimental en roedores [563-565] e incluso en algunos casos en los que han sido aplicadas a pacientes no respondedores a inmunosupresores clásicos y biológicos anti-TNF [566, 567].

Los indicios de eficacia mostrados por el trasplante alogénico de HSC derivan de un efecto remodelador sobre el sistema inmunológico del paciente, por lo que resulta imprescindible producir una extensa citotoxicidad en dicho sistema antes de aplicar las células madre para que la restauración celular y funcional de este sea adecuada. Por su parte las MSC, que pueden ser obtenidas de tejido adiposo o de médula ósea, se cree que deben su eficacia a una combinación de efecto antiinflamatorio e inmunomodulador, así como a un favorecimiento de la restitución epitelial en la mucosa intestinal que suele ver comprometida su función de barrera ante la inflamación crónica inherente a la EII, independientemente de que este sea un fenómeno que en muchos casos precede a la inflamación en sí misma. En cualquiera de los dos casos, estas terapias están aún lejos de su uso en la práctica clínica habitual, principalmente porque se desconoce si tras su administración mediante infusión intravenosa [568] podrían producir un incremento en el riesgo de desarrollo de procesos neoplásicos intestinales, fenómeno para el cual los pacientes con EII ya se encuentran especialmente predispuestos [569].

## 5.8. Algoritmo de decisión clínica en el manejo de brotes moderados de CU y EC

### Algoritmo para la EC

Se debe iniciar el tratamiento con budesonida oral, excepto en los casos en que la afectación inflamatoria reside en el colon distal y está especialmente indicado el uso de prednisona, ya que la budesonida no es efectiva en dicho segmento. Si el paciente responde en 2-4 semanas, se disminuye la dosis de budesonida y se pasa a fase de vigilancia. Si durante dicha vigilancia se produce una recidiva, está indicado el uso de azatioprina.

Si no responde a budesonida, se recomienda usar prednisona (40 mg/día), tanto en los casos en que se produce una respuesta positiva o aparezca una corticodependencia, hay que ir reduciendo la dosis de este glucocorticoide e ir introduciendo la azatioprina o 6-mercaptopurina, que será el fármaco que usemos para el mantenimiento de la remisión.

Los biológicos (anti-TNF) se usarán en aquellos pacientes que no respondan a azatioprina y que también muestren un comportamiento refractario a la prednisona. El mantenimiento de la remisión se establecerá con el uso del fármaco biológico. En este grupo de pacientes escasamente respondedores a dichas opciones terapéuticas es relativamente común encontrar fístulas y estenosis, complicaciones que en caso de no remitir con el anti-TNF generalmente requieren tratamiento quirúrgico [570].

### Algoritmo para la CU

En el caso de una proctitis, se recomienda la administración en forma de supositorios de mesalazina 1 g/día. En una proctosigmoiditis, se recomienda el uso de mesalazina en enema 1 g/día en combinación con su uso también vía oral.

En el caso de que en cualquiera de las dos situaciones clínicas planteadas anteriormente no se produzca una respuesta satisfactoria, se recomienda subir la dosis de mesalazina a 2-3 g/día. Si esto tampoco generara una mejoría en el paciente, se recomienda mantener lo anterior y sumar la administración de prednisona 40 mg/día.

En este momento se pueden plantear varias posibilidades. Si el paciente responde satisfactoriamente, se recomienda retirar progresivamente la prednisona y mantener como tratamiento en la remisión la mesalazina. Si se produce una corticodependencia, se debe retirar el glucocorticoide paulatinamente e introducir como tratamiento de mantenimiento en la remisión la azatioprina. Si lo que nos encontramos es un fenómeno de corticorresistencia o una recaída muy precoz o severa tras la retirada del glucocorticoide ante una primera corticodependencia, se recomienda introducir un biológico anti-TNF asociado a azatioprina. Y por último, si el paciente no muestra respuesta satisfactoria ni siquiera al biológico, está indicada la opción quirúrgica con objeto de evitar que esta situación clínica pueda evolucionar a una CU fulminante con un megacolon tóxico que compromete seriamente la vida del paciente [570].

Los dos algoritmos arriba descritos se ajustan al enfoque terapéutico de la EII tipo “*step-up*”, en el que las herramientas terapéuticas en principio más poderosas se reservan para aquellos casos en los que el proceso inflamatorio no remite con los tratamientos antiinflamatorios preliminares tipo aminosalicilatos o glucocorticoides. Sin embargo, en los últimos años se está desarrollando una

corriente de pensamiento cada vez más extendida entre los gastroenterólogos, según la cual siguiendo una estrategia tipo “*top-down*” se obtiene una entrada en remisión más temprana y el paciente se mantiene en ese estado de quiescencia inflamatoria durante más tiempo que con la estrategia anteriormente mencionada. El enfoque terapéutico “*top-down*” se basa en comenzar el tratamiento de la recidiva directamente con inmunosupresores y/o fármacos biológicos, y dados los buenos resultados que está presentando no sería extraño que se impusiera a la estrategia “*step-up*” en los próximos años [571, 572], sobre todo porque las cuestiones de índole económico que han frenado bastante la instauración de esta alternativa en el manejo clínico de la EII pueden dejar de ser un problema con la aparición de los fármacos biosimilares en la medida que las patentes de los biológicos originales van expirando.

## 6. GLUCOCORTICOIDES

### 6.1. Historia

El Dr. Addison en el año 1879 fue el primero en describir la existencia de los corticosteroides como hormonas decisivas en la regulación de múltiples funciones en el ser humano, de tal forma que eran imprescindibles para la vida. Addison llegó a dicha conclusión tras la observación de la muerte de pacientes con destrucción en las glándulas suprarrenales. Poco más tarde, Brown-Séquard obtuvo resultados en el mismo sentido al observar la muerte de los animales de laboratorio que sufrían la extirpación de ambas glándulas suprarrenales, siendo para ello determinante la resección de la corteza suprarrenal. Algunos años después, se consiguió poner de manifiesto las funciones biológicas reguladas por estas moléculas, destacando por un lado el metabolismo de carbohidratos y grasas, que se estimó dependiente de un grupo de hormonas que fueron denominadas como glucocorticoides (GC), y por el otro la regulación del equilibrio hidroelectrolítico, que se atribuyó a otras que recibieron el nombre de mineralocorticoides.

### 6.2. Eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HHA)

De forma colateral al estudio de los corticosteroides, se consiguió definir el mecanismo que regula la biosíntesis y liberación de estas hormonas. Fue en el año 1912 cuando el Dr. Cushing describió un desorden caracterizado por unos niveles excesivos de estas hormonas a nivel sistémico, el cual en un principio recibió el nombre de hipercorticismismo y que hoy en día es conocido como "síndrome de Cushing". No obstante, resulta interesante que fue ese determinado hallazgo el que años más tarde permitió al Dr. Harris describir el enlace existente entre las funciones hipotalámica, hipofisaria y corticosuprarrenal.

La regulación de la síntesis de los corticosteroides (GC y mineralocorticoides), que resultan de extraordinario interés en esta tesis doctoral, pero también del precursor androgénico deshidroepiandrosterona (DHEA) que es convertido en los tejidos periféricos en andrógenos mucho más potentes, se encuentra estrechamente regulada por el denominado eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HHA).

El hipotálamo es rico en neuronas que contienen hormona CRH, que es liberada de forma controlada hacia el plexo hipofisario, por el cual llegará a la hipófisis donde encuentra a sus receptores específicos CRF1/CRF2. Estos son receptores fisiológicos acoplados a proteína G que, al recibir a su ligando específico, desencadenan una cascada de transducción de señal que utiliza el AMP cíclico (AMPC) como segundo mensajero, induciendo de este modo un aumento de la síntesis y posterior secreción de corticotropina (ACTH). La CRH en esta función aquí descrita recibe la colaboración de la denominada arginina vasopresina (AVP), la cual es sintetizada en el núcleo paraventricular, llega a la hipófisis e interacciona con sus receptores fisiológicos V1b, ejerciendo de este modo una función como co-adyuvante de la CRH en la medida que estimula la síntesis de ACTH en la hipófisis, aunque el control de la liberación de esta última es una competencia exclusiva de la CRH.

En la hipófisis se produce la síntesis y liberación de la ACTH, que en un principio es sintetizada como parte de una proteína precursora de mayor tamaño, la proopiomelanocortina (POMC). La enzima convertasa 1 prohormonal cataliza la degradación proteolítica de este precursor, liberando

la ACTH (y otras melanocortinas) al torrente sanguíneo en su forma activa, una cadena polipeptídica de 39 aminoácidos de longitud. Una vez esta hormona alcanza la corteza suprarrenal, ejerce su acción a través del receptor fisiológico *melanocortin receptor 2* (MC2R) que al ser activado desencadena una cascada de señalización dependiente de AMPc que determina la estimulación de la síntesis y liberación de GC, mineralocorticoides (aunque en este caso ejerce un papel más secundario) y el precursor androgénico antes citado, además de ejercer un papel decisivo en la homeostasis bioquímica y estructural de la corteza suprarrenal actuando como un factor trófico insustituible. La respuesta de este tejido a la ACTH evoluciona con el tiempo de estimulación, de forma que en cuestión de segundos-minutos se produce un fuerte aumento del aporte de colesterol como sustrato biosintético, el cual es dependiente de la *steroidogenic acute regulatory protein* (STAR). Paralelamente, aunque requiere de varias horas para manifestarse, se produce además un fuerte aumento de la expresión génica de las enzimas esteroidogénicas, en especial de CYP11A1 que por catalizar la primera reacción del proceso supone un factor limitante. Asimismo, resulta interesante destacar que la corteza suprarrenal no tiene capacidad para almacenar ninguno de los esteroides que sintetiza, por lo que la respuesta que se produce ante la recepción de ACTH por su parte, es directamente dependiente de la síntesis hormonal *de novo*.

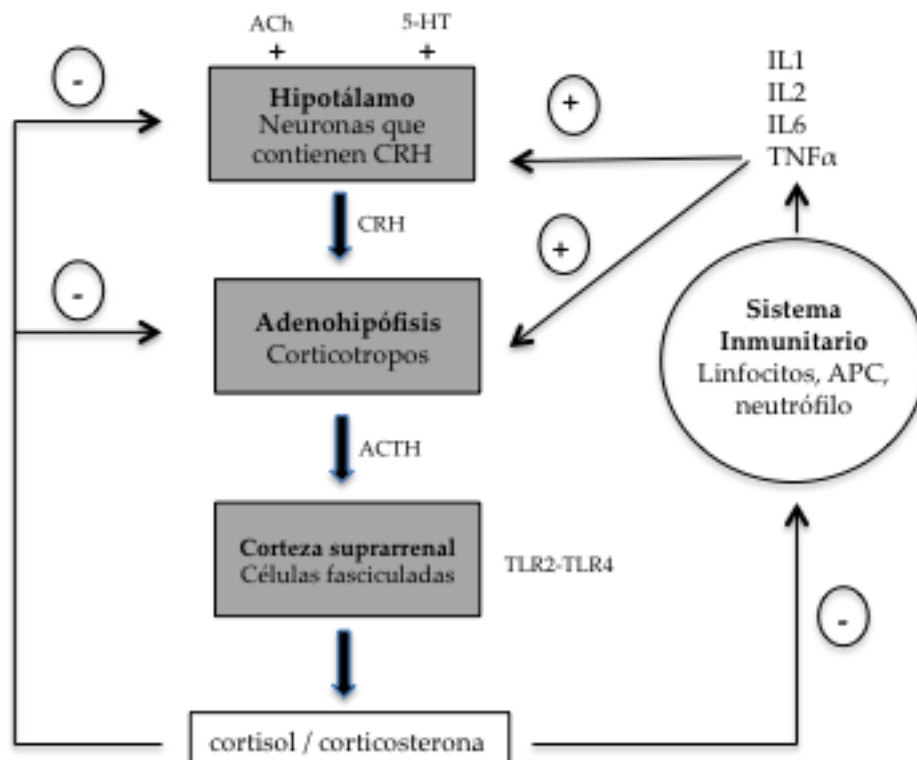
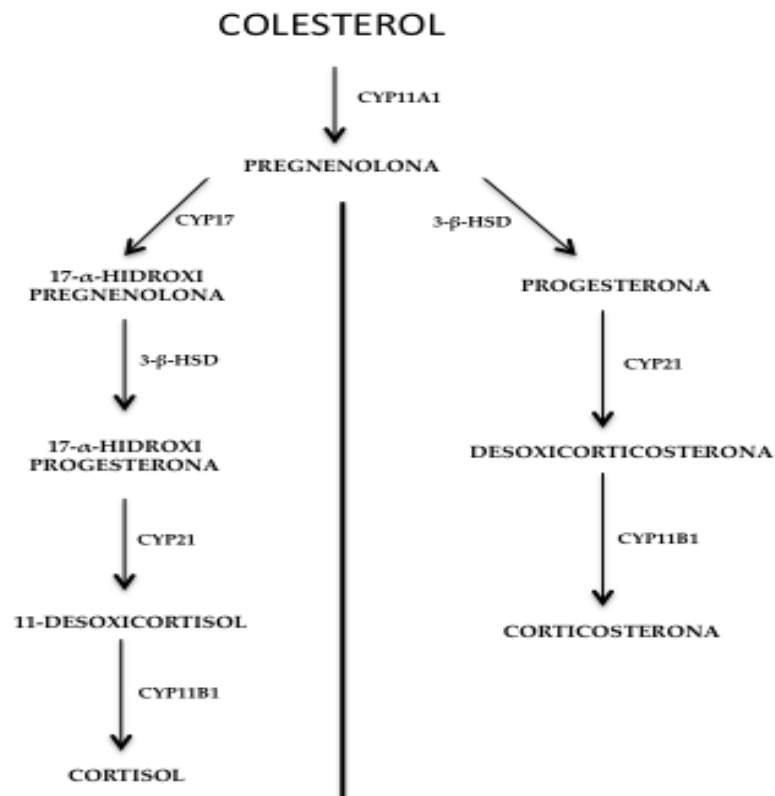


Imagen 7: Mecanismos de regulación del eje HHA

Los mecanismos de regulación del eje HHA antes descrito se centran en tres vertientes. Una regulación negativa mediada por el efecto de los propios GC sobre el hipotálamo y la hipófisis, una regulación positiva por parte de citoquinas de carácter inflamatorio, así como de productos bacterianos señalizando mediante TLR2 y TLR4 en la corteza suprarrenal, y una influencia positiva directa del estrés (Imagen 7). En condiciones fisiológicas, el ritmo de secreción diurno de GC endógenos es de unos 10 mg/día, siendo regulado esencialmente por los centros neurales superiores que reaccionan a los ciclos de sueño-vigilia. Estos determinan un aumento de la

producción de ACTH a las primeras horas de la mañana, lo que a su vez implica el clásico pico de GC que se produce alrededor de las 8:00 AM (16 µg de cortisol/100 ml de plasma).



*Imagen 8:* Esteroidogénesis humana y murina

En referencia al mecanismo de inhibición que realizan los GC sobre el eje HHA, cabe destacar que ocurre por un lado por un efecto esencialmente dependiente del receptor de glucocorticoides (GR) y en menor medida por el receptor mineralocorticoide (MR) sobre las neuronas generadoras de CRH en el hipotálamo, en las cuales producen un descenso de su expresión y liberación. A su vez, en la hipófisis y de un modo exclusivamente dependiente de GR, los GC producen una inhibición de la biosíntesis de POMC y la liberación de ACTH por parte de las neuronas corticotrópicas [573]. Este control de tipo *feedback* negativo que ejercen los GC sobre su propia síntesis a nivel hipotalámico e hipofisario es decisivo para limitar la exposición de los tejidos a estas hormonas, en términos de tiempo y cantidad. Por otra parte, existe un efecto activador del eje HHA dependiente de citoquinas de tipo inflamatorio del grupo gp130 como la IL6 y la IL11, y otras como la IL1, IL2 y TNF $\alpha$  sobre las neuronas que producen CRH y ACTH en hipotálamo e hipófisis, respectivamente [574]. Asimismo, se ha constatado la expresión de TLR2 y TLR4 en la corteza suprarrenal [575], donde son estimulados por los PAMP correspondientes, generando una estimulación de la esteroidogénesis que contribuirá a la atenuación de la inflamación sistémica asociada a la presencia de dichos antígenos en la circulación periférica. [576]. Este fenómeno está fisiológicamente justificado, atendiendo a los constatados efectos inmunomoduladores en general y preferentemente inmunosupresores que presentan los GC, los cuales contribuirán a impedir una exacerbación incontrolada del proceso inflamatorio generado por la translocación bacteriana y caracterizado por la elevación de los niveles de las citoquinas antes citadas. La relevancia del diálogo bidireccional que se establece entre el sistema inmunológico y el eje HHA queda

experimentalmente patente en humanos [577], 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 [578-581]. Por último, la esteroidogénesis en la corteza suprarrenal se ve dramáticamente estimulada por el estrés, lo que convierte al cortisol endógeno en la clásica hormona de respuesta ante una situación de amenaza que requiere evasión, a la cual contribuye principalmente con la necesaria respuesta hiperglucémica e hipertensora. La activación del eje HHA 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 [582]. 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 HHA, la CRH generada en el hipotálamo es capaz de actuar de un modo paracrino produciendo una activación de 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 [583, 584].

### **6.3. Esteroidogénesis y liberación de glucocorticoides**

Desde un punto de vista funcional e histológico, en la corteza suprarrenal pueden encontrarse tres zonas bien diferenciadas. La zona externa o glomerular que produce la aldosterona (mineralocorticoide), la zona media o fascicular que sintetiza cortisol (glucocorticoide) y la zona interna o reticular que secreta el DHEA (precursor androgénico). Dicha selectividad funcional en virtud de la zona a la que se haga referencia se debe al patrón de expresión enzimático y a los receptores que ejercen la regulación de la expresión génica y la funcionalidad de dichas enzimas. Así, mientras la zona fascicular presenta preferentemente receptores para la ACTH y la dotación enzimática necesaria para la síntesis de cortisol, la región glomerular cuenta mayoritariamente con receptores para la angiotensina II y el  $K^+$  extracelular, además de las enzimas necesarias para la síntesis de aldosterona a partir de colesterol. Por tener mayor aplicación de cara a esta tesis doctoral, a continuación se describen las enzimas y las reacciones que estas catalizan, dentro de la esteroidogénesis que tiene lugar en la zona fascicular de la corteza suprarrenal, permitiendo la síntesis de cortisol en humanos y corticosterona en roedores, a partir de colesterol (Imagen 8).

### **6.4. Acciones fisiológicas de los corticosteroides**

A pesar de que el objeto de interés principal de este trabajo son los GC, en este apartado se describen los efectos de los corticosteroides suprarrenales en general debido a que es bastante común que los GC presenten cierto efecto mineralocorticoide secundario caracterizado por la retención de  $Na^+$ , siendo este mayor o menor en función de cada molécula y su afinidad relativa por el MR. En la Tabla 4 aparece una relación de varios de los GC más relevantes, desde el cortisol endógeno hasta varios de los GC de síntesis más usados en la práctica clínica. Además, para cada uno de ellos se aporta el valor numérico de su potencia antiinflamatoria y mineralocorticoide, relativas a la propia del cortisol que se toma como referencia, así como de la duración de su efecto.

A continuación se realiza una valoración resumida de los efectos de los GC a múltiples niveles, excepto aquellos de carácter inmunomodulador y antiinflamatorio que recibirán atención especial en un capítulo independiente de esta sección, por ser los más interesantes teniendo en cuenta el campo de aplicación de este trabajo.

### **Efectos sobre el metabolismo de los hidratos de carbono y las proteínas**

Actualmente sigue sin estar totalmente descrito el mecanismo por el cual los GC generan una inducción de la gluconeogénesis, y al mismo tiempo favorecen la proteólisis para obtener aminoácidos susceptibles de ser degradados y sus esqueletos hidrocarbonados incorporados en la reacción anabólica de la gluconeogénesis en el hígado. Lo único que está descrito de forma fiable es cómo los GC estimulan la expresión de enzimas gluconeogénicas como la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) y la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa) en el hígado. Como consecuencia, se produce una elevación de la liberación de glucosa al torrente sanguíneo a costa de una tendencia hacia la pérdida de masa muscular [585]. Por otra parte, se produce un efecto hipoinsulinémico sobre los islotes pancreáticos, acompañado de resistencia a la insulina, lo que en conjunto se traduce en un aumento de la glucemia, quedando esa glucosa disponible para aquellos tejidos especialmente dependientes de ella como son cerebro y corazón [586].

### **Efectos sobre el metabolismo lipídico**

En la actualidad, se encuentran descritos de forma incontrovertible dos efectos de los GC sobre el metabolismo lipídico debido precisamente al análisis exhaustivo de la sintomatología mostrada por los pacientes con hipercortisolismo primario o yatrogénico, comúnmente conocido como “síndrome de Cushing”. Se produce una marcada redistribución de la grasa que tiende a acumularse en la parte posterior del cuello y la cara (“joroba de búfalo y cara de luna llena”) y en la zona abdominal (obesidad central), acompañada de una pérdida de esta en las extremidades. En la actualidad, los mecanismos moleculares que justifican dicho depósito selectivo de grasa dependiente de GC siguen siendo esencialmente desconocidos. Además, se favorece la lipólisis en adipocitos mediante un mecanismo indirecto, según el cual facilitan el efecto lipolítico directo sobre estas células inducido por la *growth hormone* (GH) y agonistas  $\beta$ -adrenérgicos [587, 588]. Esto desemboca en una dislipemia que contribuye al mayor riesgo cardiovascular que presentan estos pacientes.

### **Efectos sobre el balance hidroelectrolítico**

La aldosterona como mineralocorticoide de referencia, y también los GC aunque en relativa menor medida, de forma neta producen un aumento en la reabsorción de  $\text{Na}^+$  desde el líquido intratubular, en los túbulos contorneado distal y colector. Además generan un aumento de la excreción renal de  $\text{K}^+$  y  $\text{H}^+$ . Estas acciones parecen indicar que el efecto de los GC podría ser nulo desde el punto de vista osmótico, al producirse un intercambio entre cationes monovalentes, pero esto no es así. El estudio de la sintomatología de pacientes con hiper e hipoaldosteronismo ha revelado que la consecuencia neta de un efecto de naturaleza mineralocorticoide es un aumento de la presión osmótica intravascular y el consecuente aumento de la volemia, lo que se traduce en un incremento de la presión arterial. Además, los GC tienden a reducir los depósitos de calcio del individuo, porque reducen su absorción intestinal y aumenta su excreción renal, lo que contribuye junto a otros factores que serán descritos en el capítulo de efectos adversos, con la reducción de la masa ósea y el incremento del riesgo de fracturas.



**Tabla 4:** Duración del efecto y potencias relativas de algunos GC destacados. \* Corta (semivida 8-12 horas), intermedia (semivida 12-36 horas) y larga (semivida 36-72h)

| GLUCOCORTICOIDE               | POTENCIA<br>ANTIINFLAMATORIA | POTENCIA<br>RETENCIÓN DE Na <sup>+</sup> | DURACIÓN DE<br>ACCIÓN* |
|-------------------------------|------------------------------|--|------------------------|
| CORTISOL                      | 1                            | 1  | CORTA                  |
| CORTISONA                     | 0.8                          | 0.8                                      | CORTA                  |
| FLUDROCORTISONA               | 10                           | 125                                      | INTERMEDIA             |
| PREDNISONA                    | 4                            | 0.8                                      | INTERMEDIA             |
| PREDNISOLONA                  | 4                            | 0.8                                      | INTERMEDIA             |
| 6 $\alpha$ -METILPREDNISOLONA | 5                            | 0.5                                      | INTERMEDIA             |
| TRIAMCINOLONA                 | 5                            | 0  | INTERMEDIA             |
| BETAMETASONA                  | 25                           | 0  | LARGA                  |
| DEXAMETASONA                  | 25-40                        | 0  | LARGA                  |
| PARAMETASONA                  | 10                           | 0  | INTERMEDIA             |

#### **Efectos sobre el sistema cardiovascular**

Los efectos de los GC en el sistema cardiovascular son por un lado consecuencia de la hipertensión sobrevenida como consecuencia de los efectos de estas moléculas a otros niveles y por algunos efectos directos sobre los cardiomiocitos [589, 590]. En referencia a la hipertensión, contribuye el efecto mineralocorticoide secundario que pueda presentar el GC y el aumento de la volemia dependiente de los efectos propios de los GC sobre el transporte electrolítico, según el mecanismo descrito en el párrafo anterior. Pero de forma independiente de esto último, los GC a diferencia de los mineralocorticoides presentan otro mecanismo adicional que contribuye a la hipertensión y la disfunción cardiovascular asociada a este fenómeno. Los GC generan una sensibilización de la musculatura lisa del árbol vascular periférico a otros agentes vasoconstrictores como la angiotensina II o la noradrenalina, mediante un mecanismo directamente dependiente de la interacción con el GR. Como consecuencia de la hipertensión inducida por GC arriba justificada, los pacientes con síndrome de Cushing primario o yatrogénico, presentan un riesgo elevado de desarrollar aterosclerosis y eventos de tipo anginoso asociados, una insuficiencia cardíaca congestiva, una miocardiopatía hipertensiva o una hipertrofia ventricular [591].

Por otro lado, los GC ejercen efectos directos sobre los cardiomiocitos. La exposición de estos a GC sintéticos en múltiples estudios *in vitro* ha generado resultados que indican que estos presentan un efecto paradójicamente antiapoptótico, antiinflamatorio y lo que resulta aún más curioso, favorecedor de un aumento en el tamaño celular, lo que hace pensar que estos contribuyan directamente a la hipertrofia muscular cardíaca, junto con la hipertensión aórtica ya mencionada [592].

### **Efectos sobre el músculo estriado**

El conocimiento que se tiene sobre la relevancia de los GC en la homeostasis del músculo estriado, como ocurre con las funciones fisiológicas descritas con anterioridad, ha derivado esencialmente del estudio de la sintomatología de aquellos pacientes con hipocortisolismo (síndrome de Addison) e hipercortisolismo (síndrome de Cushing). Los GC son esenciales en la homeostasis muscular, ya que en ambos desórdenes los pacientes muestran una severa fatiga muscular aunque sea por causas radicalmente opuestas. En el caso de Addison, por una insuficiente perfusión periférica probablemente derivada de la hipotensión, amén de otros posibles mecanismos no caracterizados, mientras que en Cushing se produce la denominada “miopatía por esteroides” fundamentalmente asociada a un catabolismo proteico masivo, una notoria resistencia a la insulina y una inhibición de los procesos de regeneración muscular al reducir la proliferación y la diferenciación de los miocitos [593, 594]. Esto último también puede llegar a acontecer en individuos que reciben altas dosis de GC exógenos, contingencia que debe hacer plantear la retirada del tratamiento. En general, se cree que los efectos de los GC desequilibrando la homeostasis en el músculo esquelético tal y como se ha descrito, derivan de la inhibición de la señalización dependiente de la ruta formada por *insulin growth factor-1* (IGF1)-Akt, la ruta de la miostatina y la de NF- $\kappa$ B [594-596].

### **Efectos sobre el sistema nervioso central**

Los GC son, en función de lo ya observado, decisivos de un modo indirecto para el funcionamiento adecuado del sistema nervioso central, destacando sobre todo su contribución a la regulación del aporte de glucosa y de la presión arterial. Sin embargo, aunque hoy en día se desconocen los efectos directos de los GC a nivel neurológico, hay evidencias clínicas y derivadas de la experimentación básica, que sugieren que son importantes en la homeostasis en este tejido dado que los pacientes con hipocortisolismo muestran un comportamiento apático, irritable y tendente a la depresión, mientras que los pacientes que sufren de Cushing presentan un mucho mejor estado de ánimo, que en ocasiones desemboca en una excesiva actividad motora e incluso comportamientos psicóticos o pseudoesquizoides [597]. Además, en pacientes con adicción a cocaína y alcohol se ha descrito una señalización aberrante del GR [598, 599]. Además, la sobreexpresión del GR a nivel cerebral produce un fenotipo caracterizado por un marcado comportamiento ansioso [600], mientras que su delección en regiones concretas del mismo se traduce en la aparición de signos de apatía [601]. El hecho de que se haya puesto de manifiesto la expresión de enzimas esteroideogénicas y la producción *de facto* de GC a nivel encefálico [602], unido a otros trabajos que hablan de un papel relevante de estos en la regulación de la plasticidad neuronal [603], hace que este sea un campo interesante para futuras investigaciones por la aplicación que podrían tener esos hallazgos en la comprensión de trastornos como el deterioro senil de la memoria, entre otros.

### **Efectos sobre el sistema reproductor**

Dado que las gónadas y la corteza suprarrenal sufren una regulación de su biología con muchos aspectos compartidos a nivel del eje HHA, no es sorprendente que los GC ejerzan un efecto significativo sobre su regulación funcional. Este extremo queda evidenciado por las alteraciones a nivel reproductor que aparecen asociadas al síndrome de Cushing ya sea primario o iatrógeno [604].

### **Efectos sobre el desarrollo embrionario**

La señalización de los GC sobre el GR es decisiva para un correcto desarrollo embrionario, en la medida que es determinante para la maduración tisular a múltiples niveles [605]. Esta dependencia fue puesta de manifiesto en primer lugar con el desarrollo de los ratones GR KO, que mueren poco tiempo después de nacer a consecuencia de un fallo respiratorio derivado de una defectuosa maduración en el epitelio pulmonar [606, 607]. En la actualidad, se están llevando a cabo múltiples estudios en los que mediante la delección específica del GR en determinados tejidos, se está poniendo de manifiesto el papel que juega dicha señalización en el desarrollo y maduración de dicho tejido durante el desarrollo embrionario. En este sentido, destacan los hallazgos acerca de la relevancia de la señalización de los GC sobre la maduración epidérmica, dado que los ratones con delección específica del GR en dicho tejido presentan severas alteraciones en la función de barrera en esta mucosa, debido a una defectuosa maduración del mismo durante el desarrollo fetal [608].

## **6.5. Mecanismo de acción molecular de los glucocorticoides**

El mecanismo de acción de los GC es casi exclusivamente dependiente de su acción sobre el GR. No obstante, antes de que se dé la interacción del GC con su receptor específico, hay dos mecanismos que regulan la biodisponibilidad del GC en su forma activa y libre, lista para unirse a su receptor. Los GC que se usan más frecuentemente en el manejo clínico de los trastornos inflamatorios crónicos presentan un perfil de acción antiinflamatoria potente, acompañado a una actividad mineralocorticoide mínima, tal y como queda reflejado en la Tabla 4.

En referencia a los mecanismos que controlan el acceso del GC a su receptor, destaca por un lado la *corticosteroid-binding globulin* (CBG) en suero y un mecanismo mediado por las enzimas *11-β-hidroxiesteroide dehidrogenasa 1* (11-β-HSD1) y *11-β-hidroxiesteroide dehidrogenasa 2* (11-β-HSD2), que de un modo independiente del receptor regula la especificidad de los GC sobre el GR y MR en determinados tejidos diana. El primero de los dos mecanismos será descrito más detalladamente en el capítulo que hace referencia al transporte de los GC, pero brevemente, la CBG es una proteína plasmática por cuyos lugares de unión compiten tanto el cortisol como los GC sintéticos. La unión de los GC con la CBG establece un equilibrio entre forma libre y forma unida a esta proteína transportadora, siendo la versión libre la que tiene capacidad para interactuar con el GR.

Mientras que al anterior mecanismo regulatorio están igualmente expuestos el cortisol y los GC sintéticos, al que se describe a continuación lo está únicamente el GC endógeno, encargándose expresamente de limitar el efecto de este sobre el MR de forma general, pero en especial en aquellos tejidos que son diana preferente para la aldosterona. El cortisol tiene afinidad por el GR y por el MR, mientras que la aldosterona la tiene solo por el MR. Teniendo en cuenta que los niveles de cortisol circulante son mucho mayores que los de aldosterona, de no existir mecanismos compensadores se produciría una hiperestimulación del MR por parte del primero, quedando la aldosterona relegada a un efecto marginal en sus tejidos diana, entre los que destacan colon, riñones y glándulas secretoras en general. Este problema es solucionado por la acción de la enzima 11-β-HSD2, que se expresa en dichos tejidos, en los que cataliza la conversión de cortisol hacia cortisona, que se comporta como una molécula inerte en relación con el MR, permitiendo el efecto específico de la aldosterona al no quedar el MR colapsado por el cortisol en lugares donde su función es decisiva, entre los que destaca el túbulo contorneado distal [609, 610]. Por su parte, en

los tejidos que son diana clásica para los GC como el hígado, se expresa de forma consistente la 11- $\beta$ -HSD1 que cataliza la conversión de la cortisona en cortisol. De esta forma, cada tejido en función de su preferencia por un efecto de naturaleza gluco o mineralocorticoide presenta un mecanismo enzimático local que le permite, hasta cierto punto, modificar el ligando corticoesteroideo endógeno para adaptarlo a sus necesidades.

### 6.5.1. Estructura del GR

El GR es una proteína de localización citoplasmática que es codificada por el gen NR3C1, concretamente por la región conformada por los exones que van desde el 2 al 9. Mediante mecanismos de *splicing* alternativo se generan tanto en humanos como en ratón, dos isoformas principales del GR,  $\alpha$  y  $\beta$ , que difieren en el extremo carboxilo terminal. Asimismo, se generan otras como la  $\gamma$ , A y P, que son funcionalmente poco relevantes y solo se les ha atribuido cierta relevancia en algunos casos de insensibilidad a GC [611]. Entre todas estas isoformas, la  $\alpha$  es la decisiva en la mediación de los efectos clásicos de los GC a través del GR debido a su localización citoplasmática, mientras que la  $\beta$  se encuentra constitutivamente en el núcleo, donde suele ejercer un efecto inhibitorio sobre la función de la isoforma  $\alpha$  como factor de transcripción predominante, aunque también se ha descrito cierta actividad en la regulación de la transcripción al unirse a la mifepristona [612]. En cualquier caso, GR $\alpha$  es la isoforma esencial en la farmacodinamia de los GC tanto endógenos como sintéticos, y será a la que me referiré de ahora en adelante cuando use la denominación genérica de GR, aunque cabe destacar que esta 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 la iniciación de la traducción dentro del exón 2, siendo todas ellas funcionalmente comparables entre sí [613].

La estructura proteica del GR es de tipo modular y está determinada por cuatro regiones claramente diferenciadas. En el extremo N-terminal se encuentra el dominio de transactivación (NTD) que modifica el patrón de expresión génica del gen diana y que por tanto es decisivo en la función como factor de transcripción de esta proteína. Además, presenta un dominio central en el que reside la capacidad de unión a DNA (DBD) que interacciona directamente con el elemento de respuesta a GC (GRE) presente en la región promotora del gen diana, de forma estrictamente dependiente de un segmento de 5 aminoácidos que recibe el nombre de D-loop [614]. Asimismo, en el extremo carboxilo terminal el dominio de unión a ligando (LBD), que tiene capacidad para reconocer al GC agonista, así como a cofactores que contribuyen a la regulación de la expresión génica generada por esta proteína. Por último, existe una región bisagra que se dispone entre el DBD y el LBD, la cual presenta una señal de localización nuclear funcionalmente decisiva para la translocación del GR por un mecanismo dependiente de importina- $\alpha$  e importina-7 [611, 615].

### 6.5.2. Interacción GC-GR y efectos sobre la transcripción

Los GC son moléculas de pequeño tamaño y carácter lipófilo, lo que les permite difundir fácilmente a través de la bicapa lipídica de la membrana celular de la célula diana en cuestión, aunque hay evidencias acerca de la existencia de algunos mecanismos de transporte poco relevantes en términos funcionales [616].

En ausencia de ligando, el GR se encuentra en estado quiescente en el citoplasma celular formando parte de un complejo multiproteico formado por ella misma, *heat shock-protein 90*

(HSP90), *heat shock protein 70* (HSP70) e *immunophilin* (IP) [617]. Cuando el GC alcanza al GR, se une provocando un cambio conformacional en este último que hace que se libere del complejo multiproteico y deje expuesto sus señales de localización nuclear, necesarias para su consecuente transporte hacia el núcleo por un mecanismo dependiente de la importina- $\alpha$  y la importina 7. El equilibrio en la presencia relativa de GR en núcleo y citoplasma está determinado por la funcionalidad de dichos mecanismos importadores y de la *calreticulin* y *exportin-1* que median el proceso opuesto. Una vez el GR en forma monomérica se encuentra en el núcleo, se une a los denominados GRE "simples" presentes en la región reguladora de los genes diana y que se caracterizan por contener la siguiente secuencia palindrómica compuesta por un doble hexámero que contiene en el centro una separación con tres pares de bases (AGAACAnnnTGGTCT) [618]. Allí unidos se asocian formando homodímeros que serán la estructura que ejercerá la función como factor de transcripción propiamente dicho. Cuando el efecto neto del GR en dicha situación es un aumento de la expresión del gen diana, tal y como ocurre con genes como los codificantes para *glucocorticoid induced leucine zipper* (GILZ), *serum/glucocorticoid regulated kinase 1* (SGK1), *tristetraproline* (TTP), MKP1, osteocalcina, PEPCK o el propio NR3C1, entre otros [619], hablamos de un fenómeno de *transactivación*. Aunque esta es la situación que se da con mayor frecuencia, el GR unido directamente a un GRE "simple" del promotor de su gen diana también puede reducir la expresión de este último, como ocurre en el caso del gen de la IL6, IL11, IL8 o la *matrix metalloproteinase 3* (MMP3), fenómeno conocido como *represión clásica* [620].

Además de los GRE "simples", existen otros que reciben el nombre de GRE "composite" y GRE "overlapping", que se caracterizan por contener secuencias que permiten la unión del homodímero 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, AP1 y al propio GR [621]. La consecuencia final de este tipo de interacción suele ser una reducción de la expresión del gen en cuestión, al impedir el GR el efecto de los otros factores de transcripción que cohabitan en ese tipo de GRE. Aunque esa es la consecuencia más común, el modo en que el GR y alguno de esos factores de transcripción modifican de forma mutua la actividad del contiguo es bastante más compleja, ya que en determinados genes diana AP1 y GR pueden incrementar la actividad del otro dentro del "composite", fenómeno que se relaciona con una cierta capacidad del GR para estimular la competencia inmune en condiciones basales [622]. En los GRE "overlapping", existe un único elemento de respuesta que es compartido por el GR y el otro factor de transcripción en cuestión, el cual ve impedida su acción como tal. Este es el mecanismo que justifica la reducción inducida por GC de la expresión de proteínas como la osteocalcina.

Para terminar, existe otra forma alternativa por la cual el GR liberado de su estado quiescente por el GC regula la expresión génica, denominado *transrepresión* o *tethering* (atadura). En este caso, el GR en forma exclusivamente monomérica no interacciona con el DNA, sino que se une por atadura haciendo uso de su dominio LBD, sobre otro factor de transcripción que se encuentra fijado sobre su elemento de respuesta génica específico. Algunos de los casos más conocidos de este tipo de interacción que es particularmente importante de cara a la consecución de los efectos inmunomoduladores y antiinflamatorios de los GC (aunque no en exclusiva), son el fenómeno de atadura del GR sobre los factores de transcripción NF- $\kappa$ B [623, 624], STAT5 [625], STAT3 [626], AP1 [627, 628], CREB, [629], IRF3 [630], T-Bet [631] y GATA3 [632]. Incluso se ha descrito cómo el "tethering" del GR sobre algunos factores de transcripción genera la inhibición de la actividad de

este último, no de forma directa, sino provocando la incorporación sobre ambos de elementos co-represores como la *hystone deacetylase* (HDCA3), *silencing mediator of retinoic acid receptor* (SMRT) o *nuclear receptor repressor complex* (NCoR). Estas dos últimas opciones mecánicas son las más relevantes a nivel inmunomodulador no solo por la importancia de dichos factores de transcripción en las respuesta inmunitarias innata y adaptativa, sino porque requiere de mucha menor concentración de GC en el entorno de la célula diana para desarrollarse si se compara con la *transactivación o represión clásica*, lo que implica que sea funcionalmente relevante no solo ante dosis farmacológicas de GC sino también en condiciones fisiológicas.

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, que muestran capacidad para el reconocimiento de los GC. Las consecuencias de este tipo de interacción suelen ser independientes de la modificación del patrón de expresión génica celular, por lo que aparecen a mucho más corto plazo. Uno de los ejemplos prototípicos de esta opción farmacodinámica secundaria para los GC, es la cierta activación directa de la ruta de señalización de las MAPK [633, 634]. 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 solo se homodimeriza al encontrarse ya unido a 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 [635]. Por otro lado, se ha descrito también que tras la unión del GC al GR, este último no solo 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 [636, 637].

## 6.6. Farmacocinética

### 6.6.1. Absorción

La absorción de los GC, ya sea el cortisol (hidrocortisona) o algunos de los diversos análogos sintéticos existentes, es muy eficiente. Esto se debe fundamentalmente a que son moléculas de tamaño relativamente pequeño y muy lipófilas, lo que determina un patrón de absorción muy favorable cuando son administrados vía oral buscando un efecto sistémico o de forma local en espacios sinoviales, piel, saco conjuntival y vías respiratorias. De hecho, dicha absorción es tan eficaz que, si la dosis es suficiente, se pueden presentar efectos sistémicos cuando son administrados de forma local en zonas como la piel.

Sin embargo, en ocasiones interesa obtener una distribución sistémica del GC de una forma más prolongada en el tiempo. Para satisfacer dicha necesidad, se suelen preparar suspensiones de los GC que además pueden disponerse en forma de éster para su administración vía intramuscular, generando un reservorio desde donde el GC va pasando al torrente sanguíneo progresivamente.

### 6.6.2. Transporte

Una vez se ha producido la absorción del GC que ha sido administrado exógenamente, este se asocia de forma reversible a la proteína transportadora CBG antes citada [638], y a la albúmina. Mientras que la hidrocortisona y la prednisona son transportadas esencialmente por la CBG, el resto de GC sintéticos usan de forma preferencial la albúmina. En condiciones normales, alrededor del 90% de los GC endógenos se encuentran unidos a proteína transportadora, pero cuando se administra una dosis elevada de GC exógeno dicha capacidad de transporte se ve superada y necesariamente aumenta la fracción de GC que aparece libre en plasma. La CBG es una glucoproteína monomérica de 55 KDa que actúa como proteína transportadora en plasma para los GC fundamentalmente y en menor medida para los mineralocorticoides por los que tiene menos afinidad, y que se caracteriza por presentar un alto grado de homología con las de la superfamilia de las inhibidoras de la serin proteasa (serpinas). Los tejidos que actúan como fuentes productoras de esta proteína son fundamentalmente el hígado y en menor medida los riñones, pulmones y testículos [639]. Del mismo modo que ocurre con otras serpinas, es susceptible de ser degradada por la acción de proteasas, lo que implica un cambio en su estructura terciaria y la inhabilita para unirse a esteroides [640]. Los GC debido a su lipofilia son moléculas muy poco solubles en el medio acuoso que dispone el organismo de los mamíferos, por tanto la primera función de la CBG es servir de proteína transportadora para estas en plasma. De esta forma, la CBG permite la formación de un reservorio de corticosteroides en sangre y por tanto tiene un papel decisivo en el control del equilibrio que en ella se establece entre la forma libre y la unida a proteína transportadora, lo que evidentemente determina la fracción de este que queda libre y por tanto susceptible de ejercer sus acciones biológicas en los tejidos diana y ser metabólicamente degradada [641]. En este sentido, se ha descrito como algunos agentes y/o procesos estresantes producen un descenso en la expresión de CBG en hígado, con objeto de aumentar la fracción libre de GC [640, 642, 643].

Independientemente de la relevancia de la CBG en el transporte sérico de los GC, más recientemente se ha puesto de manifiesto su importancia en la regulación de la llegada y liberación local de GC en los tejidos diana. En este sentido, se ha descrito cómo la elastasa secretada por los neutrófilos infiltrados en los focos inflamatorios modifica por proteólisis a la CBG, determinando así la liberación de los GC que transporta en el foco inflamatorio y contribuyendo al control restrictivo de dicha respuesta inmune [639, 640]. Por otro lado, la identificación de lugares de unión para la CBG en la membrana de células presentes en tejidos diana para los GC en humanos y roedores, hace que actualmente se considere un hecho la existencia de 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 [644, 645]. Estas consideraciones han tomado si cabe más consistencia dadas las conclusiones extraídas del ratón CBG KO. Como es lógico, estos animales al carecer de CBG presentan unos valores de corticosterona libre en suero 10 veces superiores a los de un ratón normal. Curiosamente, al contrario de lo que dicta la lógica esto no se traduce en la aparición de signo alguno de hipercortisolismo, es más, estos ratones presentan una normal actividad del eje HHA, una gluconeogénesis básicamente inalterada, y lo más sorprendente, una susceptibilidad incrementada a los modelos de *shock* séptico, evento que resulta congruente con una situación de resistencia periférica en los tejidos diana ante los valores anormalmente elevados de GC libre que muestran estos animales en suero. Estos hallazgos implican que la CBG, independientemente de su papel

meramente transportador, ejerce funciones determinantes en la liberación local de GC en el tejido diana [646]. Este concepto se ve apoyado por el hecho de que en el hipercortisolismo que fisiológicamente aparece durante la gestación, no solo se produzca una elevación de los niveles de cortisol, sino también de CBG, probablemente para contribuir a la liberación local y señalización de dicho cortisol en los tejidos diana.

### **6.6.3. Metabolismo y excreción**

Los GC biológicamente activos, ya sea el cortisol o de origen sintético, poseen un doble enlace en la posición 4,5 y un grupo cetónico en el carbono 3, siendo ambas características decisivas para su actividad. Por tanto, la metabolización de estos compuestos se basa en la adición secuencial de átomos de oxígeno e hidrógeno y la posterior conjugación del compuesto obtenido con sulfato o un grupo glucurónido para generar un compuesto final con buena solubilidad, contrarrestando la liposolubilidad de la molécula de partida. 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.

## **6.7. Dianas celulares para GC relevantes en la inmunología intestinal**

El GR se expresa en la práctica totalidad de los diferentes tipos celulares que componen los organismos complejos, por lo que todas las células en principio son dianas potenciales susceptibles de sufrir modulación por parte de los GC. Por aplicación a la temática de esta tesis doctoral, en este apartado se hace una descripción resumida de los efectos de los GC en aquellos tipos celulares que participan de una manera directa o indirecta, y más o menos relevante, en las respuestas inmunitarias propias del tracto gastrointestinal.

Clásicamente se ha establecido una dicotomía funcional para los GC según la cual se consideraban, por un lado, unos “efectos fisiológicos” que aparecían ante las concentraciones fisiológicas de hidrocortisona propias de una situación basal/homeostática, y por el otro, unos “efectos farmacológicos” fundamentalmente asociados a sus acciones antiinflamatorias e inmunomoduladoras que justifican gran parte su uso terapéutico, los cuales surgían ante un aporte externo de GC. En la actualidad este concepto ha sido profundamente revisado, dado que hoy en día hay múltiples evidencias científicas que dejan claro que las acciones inmunomoduladoras de los GC sintetizados en la corteza suprarrenal, así como los producidos de forma local en tejidos como la mucosa intestinal, cerebro, epidermis o timo (posteriormente descritos en detalle), juegan un papel insustituible en la regulación de la homeostasis inmunológica general, y localmente en diversos tejidos del individuo. Este concepto se ve apoyado además por dos factores: el hecho de que la producción de hidrocortisona endógena suprarrenal aumente hasta 10 veces ante situaciones de estrés intenso o infección grave, y que las acciones teóricamente fisiológicas y farmacológicas de estos sean mediadas por el mismo receptor.

### **6.7.1. 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. Está perfectamente descrito el papel que



desempeñan, favoreciendo la maduración de los epitelios pulmonar, epidérmico e intestinal, no solo durante el desarrollo embrionario, sino también durante las primeras semanas de vida, coincidiendo con un aumento drástico del cortisol en los neonatos durante la tercera semana de vida [647-649], ya que son decisivos en la regulación del adecuado equilibrio entre proliferación, diferenciación y apoptosis, que determina el alcance de una adecuada función de barrera en las mucosas. Precisamente, de estos efectos derivan algunas de las aplicaciones clínicas que presentan los GC y que más tarde serán descritas. Sin embargo, hay múltiples evidencias que apuntan a un papel perjudicial de los GC sobre la homeostasis del epitelio de mucosas como la intestinal o la dérmica plenamente diferenciadas en condiciones basales y sobre todo en inflamación, siendo este último supuesto en el contexto intestinal el objeto de estudio principal de la presente tesis doctoral. Dado que los efectos de los GC sobre el epitelio intestinal serán considerados en un apartado específico posterior, ahora realizaré un breve resumen de las evidencias existentes sobre su papel en el epitelio epidérmico debido a las evidentes analogías existentes con el intestinal y la relevancia de los estudios realizados.

Las células epiteliales epidérmicas requieren de la señalización de los GC para su adecuado desarrollo madurativo, en especial durante la gestación y las primeras semanas de vida, dado que existen diversos estudios que han puesto de manifiesto que la administración de GC exógeno durante el desarrollo favorece la formación de la barrera epidérmica, relacionándolo con una inducción madurativa [650, 651]. Además, estudios más recientes han corroborado este extremo mediante el uso de ratones GR KO, *knock in* GR<sup>dim/dim</sup> y con delección específica del GR en la epidermis, que muestran cómo la epidermis de los ratones que no reciben GC durante su desarrollo muestran tras su nacimiento defectos graves en la función de barrera epitelial, mostrando un estado inflamatorio basal acompañado de un estado 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<sup>dim/dim</sup>, en los que no se da la homodimerización del GR ya unido a su GRE específico en cada caso, no muestran alteración alguna si se les compara con un ratón no modificado genéticamente [608, 652]. Sorprendentemente, y de forma similar a como parece ocurrir en el epitelio intestinal, 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 [653].

### **6.7.2. Efectos sobre las células endoteliales**

Las células endoteliales son elementos muy relevantes en la inmunología intestinal, en la medida que determinan la integridad de la red microvascular que irriga la mucosa intestinal, controlando al menos en parte la extravasación leucocitaria hacia el foco inflamatorio. A continuación se describen algunas de las proteínas que son funcionalmente importantes en este sentido y cuya expresión es modificada por los GC. Aunque no es imprescindible para la formación de unas uniones estrechas bien desarrolladas a nivel estructural [654], la ocludina colabora en el adecuado ensamblaje de estas y en el control de la generación de poros [655, 656]. El promotor del gen correspondiente contiene un GRE simple, de modo que cuando el GR activado por GC se une al mismo se desencadena un fenómeno de transactivación [657].

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 CLD-5 la más importante en nuestro caso porque ejerce un papel positivo de cara a la función de barrera endotelial, reduciendo la permeabilidad paracelular, y su expresión se ve sustancialmente modificada por los GC [658, 659]. El promotor del gen ha sido clonado y en él se han identificado varios GRE [660], que justifican que los GC aumenten la expresión de dicha proteína.

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  $Ca^{2+}$  [661]. Los ratones que carecen de esta proteína mueren poco después de nacer por un fallo vascular masivo, y su delección en ratones adultos genera un estado de hiperpermeabilidad vascular generalizado, lo que da idea de la relevancia funcional que tiene en la función de barrera endotelial [662]. 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 [663]. Por tanto, globalmente los GC ejercen un papel beneficioso reduciendo la permeabilidad vascular [664].

Un capítulo independiente a considerar en relación con el efecto de los GC sobre el endotelio vascular es su influencia en la expresión de las moléculas de adhesión que median los procesos de extravasación celular. En este sentido, hace tiempo que está firmemente descrito un efecto inhibitorio de la expresión de dichas moléculas por parte de los GC. Independientemente de que los procesos de extravasación de células inmunocompetentes se vean afectados por los gradientes quimiotácticos que los dirigen hacia los focos inflamatorios, factor también modulado por los GC como ya se ha comentado, la expresión de las moléculas de adhesión en el endotelio vascular es decisiva. 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 [665-667].

Además de los efectos de los GC sobre el endotelio, hay evidencias consistentes que demuestran cómo estos inducen atrofia y una mayor fragilidad en la microvasculatura del tejido óseo, piel y músculo esquelético [668-670]. Además, hay estudios *in vitro* que evidencian un efecto inhibitorio de la angiogénesis por parte de la corticosterona a concentraciones relativamente bajas que reflejan las condiciones fisiológicas, los cuales parecen estar asociados a una reducción en la expresión de *vascular endothelial growth factor* (VEGF), mayor expresión de *matrix metalloproteinases* (MMPs) e inhibición del desarrollo de la estructura tubular vascular, siendo todos estos efectos mediados por el GR [671, 672]. En general, está demostrado que los GC presentan un efecto angiostático en aquellos tejidos con alta tasa de reposición vascular como el óseo, el intestino o la piel, mientras que en otros como la microvasculatura ocular con menor tasa de renovación, la toxicidad de los GC fue menor y molecularmente diferente al no afectarse la proliferación celular y sí aparecer activación de vías de muerte celular independientes de las caspasas [673]. Por tanto, dada la relevancia que tiene la mucosa intestinal en el trabajo que se presenta en esta tesis doctoral es importante aclarar que en dicho contexto los GC tienen un efecto angiostático, mediado esencialmente por una reducción en la expresión y la señalización intracelular de VEGF (señaliza por STAT3 que sufre *tethering* por GR), siendo este el mayor promotor de la proliferación y migración celular en un endotelio en formación/regeneración [674-676]. Además, dicho efecto sobre

la migración celular temprana se encuentra parcialmente relacionado con una reordenación defectuosa del citoesqueleto celular, al parecer relacionada con una menor actividad de las RhoAGTPasas y un incremento de la expresión de factores antiangiogénicos como *thrombospondin-1* [677-679].

### **6.7.3. Efectos de los GC sobre células presentadoras de antígenos**

#### Células Dendríticas

Los GC inducen apoptosis en las DC que se encuentran en estado inmaduro, de un modo no dependiente de caspasas [680]. 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 [681]. Los efectos sobre las DC activadas se caracterizan por una reducción en su recirculación hacia MLN [682], menor expresión de marcadores de activación como CD40, MHCII, CD80/86 y un perfil de producción de citoquinas atenuado [683, 684]. Todos estos efectos contribuyen a inducir un fenotipo tolerogénico en las DC, caracterizado por una relevante producción de IL10 y la inducción de anergia en aquellas células T con las que establecen sinapsis inmunológica, lo que a su vez deriva en una inmunidad adaptativa atenuada [685, 686]. Por tanto, no es extraño que existan estudios que revelan cómo la dexametasona contribuye decisivamente en la inducción de este fenotipo tolerogénico, de tal forma que la co-transferencia de DC que recibieron este GC además de vitamina D3 suprime el desarrollo del modelo de colitis por transferencia linfocitaria [687].

#### Macrófagos

Las respuestas celulares de los macrófagos, como es normal entre los componentes del sistema inmune innato, son mayoritariamente dependientes de la unión PAMP a sus receptores PRR. Dado que la señalización intracelular de estos últimos es muy dependiente del eje NF- $\kappa$ B/IRF3, el efecto inhibitorio de los GC se ha achacado a la modulación por "tethering" de estos factores de transcripción [630]. De hecho, se asume que los macrófagos expuestos a GC tienen un comportamiento inmunosupresor (similar al subtipo descrito como macrófago regulador en secciones anteriores) 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 CX3CR1, que es un receptor de quimioquinas propio de monocitos inmunológicamente activados [688].

### **6.7.4. Efectos de los GC sobre los leucocitos polimorfonucleares**

Los efectos directos de los GC sobre los neutrófilos en un contexto inflamatorio son principalmente dependientes de una reducción de su extravasación y posterior infiltración 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 [665]. 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) [689].

### 6.7.5. Efectos de los GC sobre las células B

A pesar de que los GC han sido usados durante mucho tiempo, incluso en patologías dependientes de una disfunción en las células B, existe escasa base experimental que indique cuáles son los efectos que presentan sobre este tipo celular, principalmente debido a la ausencia de un ratón con delección del GR específicamente en células B. En general, las evidencias existentes apuntan a una reducción del número de células B en los MLN y bazo, acompañados de una menor tasa proliferativa de sus progenitores [690, 691]. Uno de las funciones que se piensa deben estar más afectadas es la producción de sIgA, debido la hipoplasia que inducen los GC sobre las células B del GALT.

### 6.7.6. Efectos sobre las células T

El conocimiento acerca de los efectos de los GC sobre las células T es muy amplio. En primer lugar, existe una teoría alrededor de la cual actualmente sigue habiendo intenso debate, según la cual el epitelio del timo es una fuente de GC local siendo estos GC decisivos en la modulación del proceso de selección de timocitos en dicho órgano. La capacidad del epitelio tímico para producir cortisol está fuera de toda duda, dado que está demostrado su potente expresión de enzimas propias de la esteroidogénesis [692, 693]. La teoría en cuestión recibe el nombre de "antagonismo recíproco" en la medida que las señalizaciones propias del TCR y la de los GC (ambas inductoras de apoptosis en este caso) se antagonizan mutuamente a nivel molecular en su señalización intracelular. Por tanto, en los timocitos que expresan un TCR con mucha apetencia por antígenos propios, la señalización de este no puede ser compensada por la de los GC locales del timo y por tanto entran necesariamente en apoptosis inducida por el TCR. En cambio, si el timocito presenta un TCR con escasa avidéz por antígenos propios, este entrará igualmente en apoptosis pero en este caso inducida por los GC. De esta forma, solo en aquellos timocitos que expresen un TCR con afinidad moderada por los antígenos propios, ambas señalizaciones se verán adecuadamente compensadas, no habrá inducción efectiva de apoptosis y dicha célula podrá sobrevivir evolucionando hacia la diferenciación. La controversia en relación con este sistema de selección tímica deriva de la aparición de varios estudios en los que la eliminación de la expresión del GR en las células T no generaba ninguna alteración a ese nivel [694, 695], lo que contradice los demás estudios [696, 697].

En las células T periféricas, por el contrario, sí se ha demostrado cómo 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 [698, 699]. 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 [700]. En definitiva, las células T periféricas son menos sensibles que los timocitos dobles positivos a la apoptosis inducida por GC, pero esto no es óbice para que estos sufran una dramática reducción en su actividad inmunitaria. 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 $\alpha$  e IFN $\gamma$ . 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 este es imprescindible

para la polarización hacia Th17 mediada por ROR $\gamma$ t, efecto que se acompaña de una inhibición en la producción de citoquinas como la IL17A o la IL22 en las células ya polarizadas [701]. 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 [702, 703].

### 6.8. Aplicaciones clínicas de los GC

La primera consideración que hay que tener a la hora de aplicar un tratamiento a base de GC es que estos son moléculas realmente potentes y con un perfil de efectos adversos muy significativo, siendo muchos de ellos lo suficientemente graves como para poder comprometer la vida del paciente si el tratamiento se mantiene el tiempo suficiente. Por tanto, a pesar de que los GC están incluidos en la práctica clínica habitual desde hace tiempo y hay pautas posológicas más o menos establecidas para cada caso específico, idealmente la dosis de GC que recibiera cada paciente debería ser ensayada individualmente para ajustarla a la mínima que posee la actividad terapéutica adecuada para controlar la sintomatología propia del desorden subyacente en el paciente. A lo largo de las décadas de los 60 y 70 aparecieron la mayor parte de los GC sintéticos más potentes, los cuales comenzaron a ser usados de forma casi indiscriminada en especialidades médicas como la dermatología. Como consecuencia de esas prácticas que posteriormente se revelaron inadecuadas aparecieron graves efectos adversos, lo que provocó que se generara una sensación de “esteroidofobia” [704]. No obstante, una dosis única de GC, por muy grande que sea, o un tratamiento de hasta una semana de duración con dosis relativamente altas no son peligrosos en general, siendo los tratamientos más prolongados los que generan los efectos adversos antes citados y que serán descritos en detalle en la siguiente sección de esta introducción. A pesar de la profusa utilización de los GC en la clínica actual, excepto en la terapia de reemplazo no poseen un efecto específico sobre la causa subyacente de la enfermedad y se limitan a ejercer efecto inmunosupresor/antiinflamatorio general derivado de un uso empírico.

Por último, hay que tener en consideración que los GC sintéticos usados en clínica, en la medida que sufran una distribución sistémica, van a provocar una inhibición del eje HHA. Este hecho desaconseja la retirada brusca de una terapia prolongada con GC, siendo necesario aplicar una reducción progresiva de la dosificación de estos con objeto de evitar que se manifieste una insuficiencia suprarrenal yatrogénica.

#### 6.8.1. Aplicaciones terapéuticas en enfermedades endocrinas

Teniendo en cuenta que los GC tienen una función hormonal en el organismo de los mamíferos, no es sorprendente que sean útiles en el control de patologías que cursan con un desorden de naturaleza endocrina.

##### Tratamiento de reemplazo

Una insuficiencia suprarrenal (IS) se considera primaria cuando deriva de una lesión estructural o funcional de la corteza suprarrenal que puede encontrar su causa en un trastorno autoinmune o de origen infeccioso, o secundaria, cuando dicha lesión se produce a nivel

hipotalámico o hipofisario, comprometiendo la regulación de la esteroidogénesis suprarrenal por parte del eje HHA. Por otro lado, se puede diferenciar entre una IS aguda o crónica en función de la intensidad de las manifestaciones, que en general incluyen náuseas, vómitos, deshidratación, hiponatremia e hiperpotasemia siendo el primero de los casos una amenaza real para la vida del paciente. El tratamiento se basa por una parte en el control sintomático de las manifestaciones ya descritas y en la administración un GC como terapia dirigida a la etiología del proceso. En el caso de la IS aguda se usa en primera instancia hidrocortisona 50-100 mg/8 horas hasta rescatar al paciente de la crisis, luego se mantiene con 25 mg/6-8 horas durante unos días hasta la total estabilización, para finalmente pasar a la terapia de mantenimiento hasta que la función suprarrenal vuelva a la normalidad. Dicha terapia de mantenimiento coincide con la que se usa para la IS crónica, hidrocortisona vía intramuscular 20-30 mg/día. La adecuación de esta terapia de mantenimiento se juzga atendiendo a criterios clínicos y bioquímicos. El estado subjetivo del paciente es un parámetro destacado, pero en general el factor más determinante en el seguimiento farmacoterapéutico de estos pacientes son los niveles plasmáticos de ACTH. En el caso de que el paciente muestre una insuficiencia funcional mineralocorticoide, se aplica una terapia de reposición con fludrocortisona 0.1 mg/día.

La hiperplasia suprarrenal congénita es otro trastorno que requiere de terapia de reemplazo con GC, aunque en este caso la etiología del desorden es diferente ya que se asocia a una actividad deficitaria en alguna de las enzimas propias de la esteroidogénesis, típicamente la CYP21. Como consecuencia se produce una menor producción de cortisol que implica una ausencia del fenómeno de retroinhibición que este realiza sobre el hipotálamo y la hipófisis, lo que deriva en una producción exagerada de CRH y ACTH que originan una potente hiperplasia en la corteza suprarrenal por la acción trófica de la segunda de ellas. Por tanto, la corteza suprarrenal produce enormes cantidades de esteroides biológicamente activos en sentido proximal respecto de la enzima afectada dentro de la ruta esteroidogénica. Existen diversas variantes de esta patología en función de la enzima esteroidogénica afectada y los esteroides acumulados, pero la terapia a base de GC y mineralocorticoide es común a todas ellas. Generalmente se usa, hidrocortisona (0.6 mg/kg/día) y fludrocortisona (0.1 mg/día) [705].

### **6.8.2. Aplicaciones terapéuticas en enfermedades no endocrinas**

Las aplicaciones de los GC en el tratamiento de patologías no relacionadas con el eje HHA son muchas y muy diversas. A continuación se esboza un breve resumen de todos estos usos, pero únicamente se describirán en detalle aquellas que de un modo más o menos directo presentan relación con la temática de esta tesis doctoral, como son los usos en desórdenes inflamatorios crónicos con especial atención a la EII, en el tratamiento del *shock* séptico asociado a procesos infecciosos graves y en neonatos nacidos pre-término por las disfunciones intestinales que aparecen asociadas a este último caso.

Sin entrar en detalle, la inmensa mayoría de los usos de los GC que a continuación se citan derivan de la búsqueda de un efecto antiinflamatorio y/o inmunomodulador. En este sentido, los GC se usan en diversas nefropatías primarias y en la asociada a lupus eritematoso sistémico, como tratamiento complementario en el control de procesos alérgicos agudos o crónicos, en el asma bronquial y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, en trastornos inflamatorios oculares principalmente de carácter no infecciosos porque el GC puede enmascarar los signos de progresión

de la infección que puede terminar produciendo pérdida de visión, en una amplia variedad de dermatosis con componente inflamatorio, en las fases activas de la hepatitis crónica autoinmunitaria, como parte de la quimioterapia orientada al control del leucemias y linfomas por su actividad antiproliferativa y pro-apoptótica sobre linfocitos, en el control del edema cerebral y en el manejo a corto plazo de una exacerbación sintomática en la sarcoidosis. Además, se usan con fines exclusivamente inmunosupresores en el manejo de pacientes sometidos a trasplante de órganos, administrándose en combinación con otros inmunosupresores.

### **Uso de los GC en neonatos pre-término**

Los GC han sido extensamente usados vía sistémica en neonatos nacidos pre-término, con objeto de solventar el déficit madurativo a nivel cardíaco y de los epitelios mucosales en general, pero del pulmonar en particular por su importancia en la supervivencia del paciente inmaduro. Básicamente las embarazadas que se sabe van a sufrir un parto prematuro reciben betametasona o dexametasona 12 mg/día vía intramuscular y el neonato seguirá recibiendo GC exógeno durante las primeras semanas de vida. Sin embargo, a pesar de que esta opción terapéutica sigue usándose con frecuencia para solventar los problemas arriba citados, esencialmente porque no se dispone de ninguna alternativa actualmente, existen estudios que revelan una significativa asociación entre la exposición de los neonatos prematuros de menos de 1000 g a GC durante la gestación y tras el parto, con alteraciones en el desarrollo neuronal [706], menor ritmo de crecimiento somático [707] y principalmente con una perforación focal en el intestino delgado (FSBP) que puede llegar a comprometer seriamente la vida del neonato [708, 709]. Curiosamente, esta última perturbación parece tener especial asociación con la administración de GC al paciente prematuro tras el nacimiento. Los análisis histológicos del intestino delgado (fundamentalmente íleon) realizados a neonatos con FSBP muestran una mucosa intestinal que presenta características similares a la de animales sometidos a un tratamiento con GC comenzando justo después del nacimiento [710]. Típicamente presentan una mucosa engrosada, más desarrollada y madura de lo normal, caracterizada por un mayor número de células enteroabsortivas y de células caliciformes. Por el contrario, la capa muscular subyacente tiene un grosor anormalmente pequeño y muestra claros signos de atrofia, siendo esta la razón fundamental por la cual se desestabiliza la pared intestinal y se produce la perforación. La causa última por la cual la exposición del intestino delgado de estos pacientes a dexametasona genera esa atrofia muscular parece estar relacionada con una alteración de la biodisponibilidad local de algunos factores de crecimiento, principalmente de IGF-1. Este factor de crecimiento produce un efecto mitogénico en las células del músculo liso de la pared intestinal, por lo que su menor expresión en dicha localización como consecuencia de la exposición a dexametasona parece ser decisiva en el defecto observado en la integridad de la pared intestinal [710, 711].

### **Uso de los GC en la sepsis**

Los GC presentan varias características que los convierten en herramientas eficaces en el tratamiento del *shock* séptico, lo que justifica que actualmente se encuentren incluidos en la práctica clínica habitual. Merece la pena destacar en primer lugar, que una proporción significativa de los pacientes con *shock* séptico muestran insuficiencia suprarrenal al menos en lo que atañe a los niveles de GC circulantes [712, 713], caracterizada por un insuficiente incremento en cortisol en respuesta a CRH exógena, fenómeno al parecer dependiente de la inhibición de la producción de

ACTH en la hipófisis ejercida la *macrophage migration inhibitory factor* (MIF), que forma parte de la tormenta de citoquinas asociada a esta patología. Por un lado, los GC ejercen un potente efecto inhibitorio de la producción de citoquinas proinflamatorias sobre múltiples dianas celulares componentes del sistema inmunológico o ajenas a él, así como de la extravasación de células activadas hacia focos de inflamación, tal y como ya se ha descrito en capítulos anteriores. Este extremo, en sí mismo implica un importante beneficio en el *shock séptico* en la medida en que el hilo conductor fisiopatológico de este es una respuesta inflamatoria sistémica descontrolada. Además, hay estudios que revelan cómo los GC aumentan en determinados contextos la producción de citoquinas antiinflamatorias como la IL10 o TGF $\beta$  [714], aunque estos últimos parecen ser bastante específicos de especie, tipo celular y condiciones experimentales, como revelan las discrepancias en algunos estudios *in vitro* [714, 715]. Otro factor que contribuye al beneficio aportado por los GC en esta patología es su inhibición de la producción de otros mediadores inflamatorios en diversas células inmunocompetentes, epiteliales, hepáticas o musculares. Existen evidencias acerca de una inhibición de la producción de eicosanoides [716] así como de un aumento del catabolismo de leucotrieno C4 (LTC4) [717], inhibición de la producción del factor de activación plaquetario (PAF) [718] y de especies reactivas de oxígeno [719] y nitrógeno [720, 721]. Asimismo, los GC son responsables de la inducción de apoptosis en células inmunológicas (timocitos, células T maduras y eosinófilos), lo que aporta un beneficio significativo en el *shock séptico* [722], aunque paradójicamente ocurre lo contrario en el caso de los neutrófilos.

Mención aparte merecen los efectos de los GC sobre la reactividad vascular periférica, ya que son los más decisivos en el papel beneficioso de estos en el *shock séptico*. Está plenamente demostrado que los diferentes modelos experimentales de este desorden se acompañan de una profunda hipotensión que contribuye decisivamente al desenlace fatal del proceso, generando una potente hipoperfusión periférica que conduce a un fallo multiorgánico. De hecho, en el *shock séptico* se ha descrito una disfunción vascular caracterizada por insensibilidad a agentes vasopresores, la cual es dependiente de la elevada presencia de especies reactivas de nitrógeno derivadas de una incrementada actividad de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) [723]. En este sentido, la exposición previa a bajas dosis de LPS que genera un potente incremento en la producción de corticosterona endógena, o la administración directa de dexametasona, minimizan en gran medida la disfunción vascular inducida por una posterior administración intravenosa de una dosis elevada de LPS en el roedor [724]. Por tanto, no es sorprendente que existan estudios clínicos que evidencian una reducción en la duración y necesidad de dosificación en el tratamiento vasopresor a base de catecolaminas asociado al *shock séptico*, para mantener una adecuada hemodinamia sistémica, así como una clara mejoría en la evolución de la enfermedad y en la supervivencia, funcionando generalmente mejor una dosificación moderada mantenida en el tiempo [725].

### **Uso de los GC en el tratamiento de la EII**

Los GC se usan en el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas desde hace décadas en virtud de sus múltiples efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores. En la terapia de la artritis reumatoide están incluidos desde hace más de 60 años, cuando la hidrocortisona fue testada exitosamente por primera vez mostrando una significativa eficacia en el control de la sintomatología inflamatoria articular de este desorden autoinmune. Con el transcurso del tiempo se han desarrollado diversos análogos sintéticos con mayor potencia antiinflamatoria, lo que ha



mejorado más si cabe los resultados de la esteroidoterapia en este tipo de desórdenes. Sin embargo, estos beneficios no son óbice para que su uso se vea limitado por el amplio perfil de severos efectos adversos que presentan, que incluyen pérdida de masa ósea y un incrementado riesgo de fracturas [726]. En la terapia de la EII los GC también juegan un papel central, pero del mismo modo que en el caso de la artritis reumatoide, su uso implica importantes riesgos que suponen un reto importante para el clínico. Lógicamente, por aplicación a la temática de esta tesis doctoral me centraré en este último caso.

Los GC desde hace décadas y aún hoy en día, 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 [727]. 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 alrededor de 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 de forma que requieren de una dosis de 10-20 mg/día para mantener el estado de remisión. 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 [728], siendo esta una proporción similar a la encontrada en otros trastornos inflamatorios de carácter autoinmune, lo que parece reflejar un proporción de ausencia de respuesta a GC constante en la población en general [729, 730]. No obstante, está descrita una significativa reducción de la sensibilidad a GC por parte de células inmunológicas de roedores sometidos a estrés psicológico continuado que presentan elevados valores de corticosterona endógena de forma más o menos constitutiva. Por tanto, dado que se conoce que 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. Por último, en torno a un 40% de los pacientes con EII son respondedores. En los últimos años, se ha trabajado bastante para tratar de encontrar algún parámetro predictivo sobre la capacidad de respuesta a GC de un determinado paciente, con objeto de adaptar las decisiones clínicas apropiadamente y evitar la toma de decisión basada en el principio de ensayo y error. Esto se ha intentado conseguir mediante aproximaciones experimentales entre las que destacan el control de la inhibición de la proliferación de células T dependiente de GC [731] y la inhibición dependiente de GC de la respuesta de elementos celulares del sistema inmune innato a antígenos bacterianos [306]. En línea con este último concepto, se ha publicado recientemente un trabajo que refleja cómo las células polimorfonucleares de sangre periférica de pacientes con EII que muestran respuesta clínica a GC son significativamente 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 tal vez por los clínicos para estimar la pertinencia del uso de los GC en un determinado paciente en virtud de su sensibilidad idiosincrásica [732].

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 [733]. 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 solo porque sus efectos adversos lo hacen inviable, sino porque son esencialmente ineficaces para dicho propósito según indican diversos estudios clínicos [734-741].

Entre todas las opciones terapéuticas orientadas a la inducción de remisión en pacientes con EII (principalmente EC) formuladas a base de GC, a continuación se describe exclusivamente el caso de la budesonida por ser uno de los GC cuyo uso se encuentra más extendido actualmente en la práctica clínica y ser el elegido para los ensayos *in vivo* de la presente tesis doctoral. La budesonida, ya sea formulada en una forma farmacéutica de liberación controlada entérica (EC ileocecal) o para el tratamiento tópico en forma de enema o supositorio (EC colon izquierdo), es el GC de primera elección hoy en día junto con la prednisona. La budesonida presenta una eficacia similar a la prednisona en la inducción de remisión en la EC ileocecal leve o moderada, dado que posee una potencia antiinflamatoria muy apreciable (200 veces superior a la hidrocortisona), que se acompaña de un perfil de efectos adversos mucho menor que el resto de GC por sufrir un extenso metabolismo de primer paso hepático que apenas permite una distribución sistémica del 10% cuando es administrada vía oral a la dosis generalmente recomendada de 9 mg/día. No obstante, en la EC severa, la prednisona administrada vía intravenosa es más eficaz que la budesonida administrada vía oral. Como ya se ha comentado anteriormente, los GC no son eficaces en el mantenimiento del estado de remisión clínicamente inducido en los pacientes con EII, y en este sentido la budesonida no es una excepción a pesar de presentar un perfil de efectos adversos sistémicos ciertamente reducido, que permitiría en principio plantear un patrón de tratamiento más prolongado [742].

## 6.9. Efectos adversos asociados a los GC

La aparición de efectos adversos asociados al uso terapéutico de los GC depende fundamentalmente de factores como la potencia del GC elegido, la dosis, el patrón posológico y la duración del tratamiento, así como la sensibilidad idiosincrásica del paciente a esta terapia. Los años de experiencia en el uso de estas moléculas indica que la concurrencia y severidad de los efectos adversos es principalmente dependiente de la duración del tratamiento, mientras que la dosis tiene una importancia relativamente secundaria. Evidentemente, la vía de administración seleccionada va a determinar la proporción de la dosis que va a alcanzar distribución sistémica y por tanto la aparición de efectos adversos, aunque estos también pueden aparecer cuando los GC se administran vía tópica o inhalatoria, aunque estas pretendan la distribución preferentemente local del fármaco.

### 6.9.1. Efectos adversos de los GC en la piel

La administración tópica o sistémica de GC genera importantes alteraciones en la homeostasis de la piel que tienen su origen en un atrofia cutánea severa, así como en un retardo de los procesos

de restitución o curación epidérmica. De forma resumida, estas alteraciones suelen incluir la aparición de estrías en las extremidades o el abdomen derivada de la atrofia cutánea, pérdida de agua incrementada, hipertrichosis, la inducción del acné dependiente de esteroides típicamente en pacientes jóvenes, dermatitis en la periferia de la cavidad bucal y eritema acompañado de rubefacción permanente en la cara.

La atrofia cutánea, caracterizada por un adelgazamiento y una mayor fragilidad de la epidermis, es el efecto adverso más común derivado de una exposición prolongada a GC tópicos, aunque está demostrado que una sola aplicación de clobetasol es capaz de generar un adelgazamiento cutáneo significativo durante más de tres días [743]. Además, estos aparecen incluso tras la administración del GC vía sistémica o incluso inhalatoria a dosis relativamente bajas [744]. Los efectos de los GC sobre la integridad de la piel parecen estar relacionados con una acción antiproliferativa sobre los queratinocitos y los fibroblastos, asociada con una menor producción de colágeno por parte de estos últimos que a su vez depende de una inactivación del factor de transcripción Smad3 y una menor expresión de TGFβ1 y 2 [745, 746], siendo el colágeno un componente fundamental de la matriz extracelular de la epidermis [747]. Otras proteínas relevantes en la estabilidad estructural de la epidermis que ven reducida su expresión por los GC son la tenascina-C, ácido hialurónico, glucosaminoglucanos sulfatados y la elastina.

La relación existente entre la administración de GC y alteraciones en la curación epidérmica están a día de hoy plenamente demostradas [748]. La razón que parece justificar este efecto adverso es la reducción de la infiltración de células inflamatorias en la zona epidérmica dañada, porque los factores de crecimiento, citoquinas inflamatorias y proteínas de la matriz extracelular que producen muchas de las células inmunocompetentes son decisivas en la dirección del proceso de curación. Además, los GC reducen la expresión del colágeno 7 que es fundamental en la asociación estable entre la membrana basal y la dermis subyacente [749].

### **6.9.2. Efectos adversos de los GC sobre el músculo esquelético**

Los grupos musculares que se ven preferentemente afectados por la “miopatía inducida por GC” son aquellos de la zona proximal de las extremidades, destacando deltoides, bíceps y cuádriceps, y clásicamente también los músculos intercostales encargados de los movimientos respiratorios, lo que supone un problema relevante en aquellos pacientes asmáticos que puedan presentar absorción sistémica significativa de GC. Este fenómeno se produce por un aumento del catabolismo proteico muscular, asociado a una menor captación de glucosa por parte del músculo esquelético que sufre resistencia a la insulina inducida por GC. En definitiva, los GC estimulan la degradación proteica muscular, así como inhiben su síntesis *de novo*, lo que parece estar relacionado con un aumento de la expresión por transactivación de la glutamina sintasa que interviene en dicho proceso catabólico [750].

### **6.9.3. Efectos adversos de los GC sobre el hueso**

La osteoporosis es un efecto adverso clásico de los GC, que aparece incluso ante la administración de dosis relativamente bajas de estos por vía oral e incluso por vía inhalatoria, siendo en cambio absolutamente imprescindible para su aparición el mantenimiento de la esteroidoterapia durante un tiempo de al menos un año [751, 752]. Esto afecta preferentemente a la masa ósea con estructura trabecular, lo que justifica que la mayor pérdida de masa ósea y por tanto

el mayor riesgo de fracturas derivadas de la exposición a GC ocurra en vértebras, costillas y cadera. Los efectos de los GC que afectan al equilibrio dinámico óseo y que justifican la pérdida de masa ósea que se asocia a su uso son los siguientes; 1) supresión de la actividad funcional y la proliferación de los osteoblastos, dependiente al menos en parte de la inhibición directa e indirecta de la cascada canónica de Wnt/ $\beta$ -catenina [474, 753-756]; 2) reducción de la absorción intestinal y aumento de la excreción renal de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que implica un aumento en la liberación de paratohormona (PTH) que a su vez aumenta la resorción ósea dependiente de osteoclastos; 3) reducción de los niveles de hormonas sexuales por inhibición del eje HHA; 4) inducción directa de apoptosis en osteoblastos y osteocitos; y 5) alteración en la biodisponibilidad local y el efecto de la GH e IGF-1 [757].

La osteonecrosis es otra complicación relativamente frecuente, asociada al uso sistémico de GC durante un tiempo prolongado. A ella contribuye la pérdida de masa ósea, pero principalmente la atrofia de la microvasculatura de zonas como cabeza del fémur y el húmero, así como la porción distal del primero.

#### **6.9.4. Efectos adversos de los GC sobre el ojo**

Tras la administración sistémica o tópica-local de GC, se encuentran descritos diversos efectos adversos caracterizados por desórdenes oculares que comprenden la inducción de cataratas y glaucoma de forma relativamente común, así como otros menos frecuentes como el desarrollo de maculopatías derivadas de defectos en la regeneración de la microvasculatura del fondo del ojo.

#### **6.9.5. Efectos adversos de los GC sobre el sistema nervioso central**

Atendiendo a los efectos euforizantes de los GC sobre el sistema nervioso central, los cuales fueron descritos detalladamente en apartados anteriores, no es sorprendente que una terapia a base de GC a altas dosis (> 40 mg prednisona/día) que no necesita de más de dos semanas de mantenimiento, sea capaz de agravar trastornos psiquiátricos preexistentes en el paciente e incluso desestabilizar a uno sano [758]. En referencia a este último caso, los pacientes de sexo femenino son más susceptibles al desarrollo de la denominada “psicosis esteroidea”, que puede cursar con cambios de humor, euforia, fases maníacas, alucinaciones e intentos de suicidio [759]. Entre los mecanismos moleculares que justifican estos efectos a nivel central, son diversos y de compleja relación recíproca, pero cabe destacar que recientemente se ha descrito que los GC de un modo dependiente de transrepresión sobre NF- $\kappa$ B inhiben la expresión del receptor de serotonina 5-HT<sub>1a</sub>, lo que parece relacionarse con las fases de cambio de humor antes descritas [760]. Lógicamente, por el contrario la retirada de un tratamiento prolongado a base de GC puede favorecer la apatía y un comportamiento tendente a la depresión en el paciente.

#### **6.9.6. Efectos adversos de los GC sobre el sistema endocrino**

Los efectos de los GC a nivel metabólico ya fueron expuestos en su mayoría en el apartado de acciones fisiológicas. Brevemente, los GC inducen hiperglucemia con glucosuria, que puede agravar la condición de un paciente previamente diabético, aunque esta situación es clínicamente controlable y no debe suponer un impedimento de cara a la instauración de una terapia a base de GC en el paciente. Además, por la inhibición del eje HHA provocan insuficiencia corticosuprarrenal.

### **6.9.7. Efectos adversos de los GC sobre el sistema cardiovascular**

Los efectos fisiológicos de los GC directos sobre el sistema cardiovascular, el metabolismo lipídico y el equilibrio hidroelectrolítico descritos en capítulos anteriores justifican que los pacientes sometidos a tratamientos prolongados a base de GC sistémicos desarrollen clásicamente hipertensión y dislipemia.

### **6.9.8. Efectos adversos de los GC sobre el aparato gastrointestinal**

Los efectos adversos de los GC sobre el aparato gastrointestinal incluyen principalmente un riesgo incrementado de presentar úlceras pépticas y sangrados del tracto intestinal superior, así como candidiasis oportunistas derivados del uso de GC vía inhalatoria. Los mecanismos moleculares que justifican la mayor incidencia de úlceras sangrantes en el tracto gastrointestinal superior no se conocen en detalle, pero se cree que están relacionados con una hiperplasia en las células parietales gástricas que generan una hipersecreción ácida anormalmente elevada. Además, esto se acompaña con una menor producción de mucinas gástricas y una menor capacidad restitutiva en el epitelio gastrointestinal [761]. No obstante, no se puede descartar la posibilidad de que el origen de estas úlceras sangrantes no sea la exposición a GC, sino que se deba a la muy común exposición concomitante a antiinflamatorios no esteroideos, en los que este efecto adverso se encuentra plenamente descrito.

### **6.9.9. Efectos adversos de los GC sobre el crecimiento y el desarrollo**

Los niños pueden presentar defectos significativos en el crecimiento como consecuencia de la administración de dosis relativamente pequeñas. Esto está directamente relacionado con una atenuación del efecto de la GH y los efectos anteriormente descritos de los GC sobre la homeostasis del tejido óseo y del músculo estriado, los cuales en un individuo que se encuentre en edad de crecimiento exponencial necesariamente implicarán un retardo en su desarrollo.

En lo referente a los efectos de la exposición a GC *in utero* hay escasa información, pero existen estudios en animales que indican que la administración de GC al animal en gestación, aumenta el riesgo de desarrollar paladar hendido y defectos en el desarrollo neuronal que conducen a defectos conductuales complejos. A pesar de la conocida relevancia de los GC durante el período perinatal en el ser humano, no se puede descartar la posibilidad de que la exposición a dosis elevadas de GC durante el embarazo pueda generar modificaciones leves en el normal desarrollo fetal [762].

### **6.10. Agonistas selectivos del receptor de glucocorticoides (SEGRAs)**

Los efectos terapéuticos de naturaleza inmunomoduladora y antiinflamatoria por los cuales se usan los GC en trastornos inflamatorios crónicos como la EII, así como sus efectos adversos arriba descritos, son igualmente dependientes de la interacción del GC con el GR y de los mecanismos de acción molecular que de ella surgen, anteriormente descritos en su capítulo específico. Sin embargo, diversas investigaciones en las últimas dos décadas han permitido dilucidar que los efectos antiinflamatorios interesantes dependen fundamentalmente del mecanismo de transrepresión, mientras que la mayor parte de los efectos adversos que más limitan en la práctica clínica el uso de los GC como son atrofia de la piel, supresión del eje HHA, los dependientes de la modificación del metabolismo de grasas, glucosa y proteínas, así como las alteraciones en el

equilibrio dinámico óseo, tienen básicamente su origen en el proceso de transactivación y/o represión clásica [763-765].

La búsqueda de nuevos GC más seguros y con un mejor perfil terapéutico ha sufrido un giro radical con el descubrimiento de que los mecanismos de transactivación-represión y la transrepresión eran eventos funcionalmente independientes dentro de la farmacodinamia de los GC. Esto fue puesto de manifiesto por primera vez en el año 1998, cuando haciendo uso de los ratones GR<sup>dim/dim</sup>, Reichardt *et al* descubrieron que en estos animales cuyo GR no tiene capacidad de unión a DNA y por tanto no puede realizar transactivación o represión clásica tras la recepción del GC, la dexametasona seguía presentando una acción antiinflamatoria eficaz derivada de la transrepresión, mientras que los efectos adversos derivados de una disfunción metabólica dependiente de GC no aparecían [766, 767]. Lógicamente, como consecuencia de este hallazgo se ha dedicado un gran esfuerzo investigador orientado a explotar la posibilidad de obtener moléculas que activen selectivamente el GR de cara a la transrepresión, del cual han surgido los denominados agonistas selectivos del receptor de glucocorticoides (SEGRAs). En la actualidad se conocen diversas moléculas que se ajustan al concepto de SEGRA, entre los que destacan el ZK216348 [768, 769] y el que es hoy por hoy el más profundamente estudiado, el conocido como compuesto A (CpdA) [769], entre otros [770, 771]. Existen múltiples publicaciones que indican que estas moléculas son muy prometedoras en cuanto a su selectividad farmacodinámica, lo que implica una sustancial mejora de su perfil terapéutico si se las compara con los GC tradicionales, ya que parecen mantener una eficacia antiinflamatoria comparable a la de los convencionales pero acompañada de un perfil de efectos adversos mucho más reducido [772-781].

De forma paralela al desarrollo de los SEGRAs, se realizó la descripción exhaustiva de los ratones GR<sup>dim/dim</sup>. Estos estudios han arrojado algunos resultados que han levantado cierta controversia alrededor del concepto en el que se basa el desarrollo de los SEGRAs, ya que a pesar de poseer un GR incapaz de unirse a DNA seguían presentando algunos de problemas metabólicos asociados al uso de GC convencionales, lo que implica que tampoco el desarrollo de los SEGRAs va a permitir solucionar de un modo taxativo el problema de los efectos adversos asociados al tratamiento esteroideo. No obstante, la existencia de gran cantidad de estudios citados al final del párrafo anterior indicando una relación eficacia/efectos adversos bastante favorable para muchos de los SEGRAs al aplicarlos en diversos modelos inflamatorios experimentales, hace que el concepto de disociación farmacodinámica por el cual se desarrollaron estas moléculas siga siendo prometedor para el futuro tratamiento de trastornos inflamatorios crónicos como la EII.

## 6.11. GC y el entorno intestinal

La mayor parte de los estudios que han arrojado luz sobre los efectos de los GC en el contexto intestinal hasta la fecha derivan de la descripción de las alteraciones intestinales que se producen en diversos modelos experimentales de estrés [782]. El estrés se encuentra tan íntimamente relacionado con una elevación de los niveles de GC endógeno que hay fisiólogos que definen el estrés en el ser humano como cualquier condición que determina un aumento en la liberación de cortisol a nivel adrenal. El tracto gastrointestinal es particularmente sensible a los diferentes mediadores que intervienen en una respuesta fisiológica al estrés, destacando fundamentalmente el caso de los GC endógenos locales como elemento director del proceso, pero siendo asimismo destacable el papel que juegan otros agentes como la CRH que también ven incrementada su

presencia en este caso, tal y como se describe a continuación. Por esta razón, en este apartado se establece con precisión cuál es la contribución relativa de los GC locales intestinales y la CRH en las disfunciones intestinales que aparecen asociadas a los modelos experimentales de estrés.

### **6.11.1. Efectos del estrés sobre la función de barrera epitelial**

El epitelio de la mucosa intestinal es especialmente sensible al estrés, debido fundamentalmente a su rápida velocidad de proliferación, que implica su total renovación en aproximadamente dos días en algunas partes. Esto explica la fragilidad de este tejido, ya que la aplicación de un estímulo estresante durante un tiempo relativamente corto es suficiente para generar un epitelio intestinal condicionado en su totalidad por dicho fenómeno. Este concepto se ve apoyado por las escasas diferencias que aparecen entre las alteraciones intestinales inducidas por estrés agudo y crónico, aunque lógicamente la severidad de las consecuencias de estos sí se ve incrementada con el tiempo de exposición [783].

Las uniones estrechas son unas estructuras muy dinámicas con gran relevancia en el comportamiento de la mucosa intestinal como una barrera semipermeable. Estas sufren la modulación de la expresión y/o distribución de las proteínas que las componen por parte de diferentes mediadores propios de situaciones fisiológicas o patológicas. En el caso del estrés, se produce un aumento su permeabilidad debido a la aparición de una distribución irregular de ocludina y ZO-1 que se manifiesta a corto plazo, así como una contracción del citoesqueleto celular dependiente de la activación de la MLC por el TNF $\alpha$  que deriva a su vez de la ligera inflamación intestinal subyacente presente [784]. Es poco probable que los elevados niveles de GC justifiquen estos efectos, pues está demostrado que los GC tienden a reducir la disfunción asociada al TNF $\alpha$  antes citada [785]. Sin embargo, otros trabajos indican que el estrés reduce la expresión de ZO-1 en las células epiteliales intestinales de un modo sensible a mifepristona y por ende directamente dependiente de GC [786]. Curiosamente, los GC presentan otros efectos sobre las las células epiteliales intestinales que se encuentran bien constatados y se traducen en un refuerzo de la función de barrera ejercida por estas, destacando un aumento de su expresión de TLR2 que facilita la respuesta reconstitutiva del epitelio ante una agresión [787] y una protección ante el estrés asociado al retículo endoplásmico mejorando el plegado proteico y la degradación de las proteínas erróneamente plegadas [788]. Por tanto, resulta comprensible que el modo en que los GC contribuyen a la disfunción en la barrera epitelial intestinal sea objeto de gran controversia, siendo esta de hecho la razón de ser de esta tesis doctoral que pretende aclarar este extremo.

### **6.11.2. Efectos del estrés sobre el flujo hidroelectrolítico intestinal**

Los modelos experimentales de estrés y las evidencias extraídas del estudio de pacientes bajo estrés psíquico o físico han permitido establecer de forma incontrovertible que la consecuencia neta del mismo es un aumento de la presencia de electrolitos y agua en la luz intestinal [332, 789]. Esto ocurre debido a la asociación de la reducción de los procesos de absorción iónica con un aumento de la secreción, traduciéndose ambos en un incremento de la corriente de cortocircuito en los ensayos con cámara de Ussing. Estos efectos aparecen en los diferentes segmentos intestinales e indistintamente asociados a los modelos de estrés agudo y crónico [790, 791]. En referencia a las hormonas asociadas al estrés responsables de estas alteraciones, las evidencias experimentales apuntan a los efectos periféricos de la CRH directos sobre el epitelio intestinal e independientes de la síntesis de GC como principales responsables, ya que los antagonistas específicos de estos

receptores, astresina o CRF9-41, administrados intraperitonealmente corrigen las alteraciones antes mencionadas. Asimismo, la administración de CRH exógena formulada para no atravesar la barrera hematoencefálica mimetiza la afectación intestinal asociada al estrés, actuando sobre sus receptores periféricos CRHR1 y CRHR2 [792]. Otra razón que sustenta la independencia de estas alteraciones respecto de los elevados niveles de GC circulantes, es que sus acciones directas sobre el transporte hidroelectrolítico intestinal son bien conocidas. Concretamente, estimulan sustancialmente los procesos de absorción, en especial de Na<sup>+</sup> y, aunque en mucha menor medida, también lo hacen con la secreción de K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>, produciendo un efecto neto que favorece la absorción iónica y secundariamente de agua desde la luz intestinal hacia el espacio basolateral [793]. De hecho, dentro de la fisiopatología de la EII y los modelos de colitis experimental se encuentra la inhibición de los procesos de absorción y secreción iónica intestinal directamente relacionada con la inflamación en sí misma, 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 solo de forma indirecta mediante su acción antiinflamatoria, sino también por su efecto directo sobre el transporte generando absorción electrogénica [794].

### **6.11.3. Efectos del estrés sobre la permeabilidad intestinal a antígenos bacterianos y otras macromoléculas**

Un incremento en la permeabilidad intestinal a macromoléculas está plenamente demostrado en pacientes sometidos a estrés, así como en diferentes modelos experimentales de estrés agudo y crónico. Existen evidencias de un compromiso en la función de barrera tan significativo asociado a estrés experimental, que es capaz de generar *per se* cierta inflamación intestinal, así como un incremento en la susceptibilidad al diferentes modelos de colitis experimental como el TNBS [795] y el DSS [335-337], estando estos últimos fenómenos relacionados en parte con un efecto estimulante de la CRH sobre los linfocitos de lámina propia.

Los mecanismos que relacionan el estrés con un intestino más permeable por vía paracelular y transcelular descritos hoy en día 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 [796, 797]. 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 totalmente independiente de la acción de los GC endógenos, estando asociado en exclusiva a la acción de la CRH sobre sus receptores CRHR1 y CRHR2 presentes en los mastocitos subepiteliales [333, 793]. 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 [798], 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 [799]. 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 esta es la responsable casi en exclusiva de este fenómeno. Sin embargo, aunque más escasos, también hay estudios que revelan como la adrenalectomía o la inhibición farmacológica de la esteroidogénesis reduce significativamente la afectación intestinal asociada al estrés experimental [800]. 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 [801, 802].

### **6.11.4. Diálogo entre la microbiota intestinal y el estrés, con los GC como intermediarios**

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 GF sufren un incremento de los niveles de ACTH y corticosterona mucho mayor que aquellos estándar en términos microbiológicos. Además, el comportamiento de los animales axénicos en relación al estrés se normalizó al colonizarlos exclusivamente con *Bifidobacterium infantis*. Esto estimuló múltiples investigaciones que han permitido poner de manifiesto que la influencia es bidireccional, ya que el estrés produce cambios cualitativos en la microbiota intestinal con un sello específico, que no solo sensibiliza al animal a otros modelos experimentales de estrés como ya se ha descrito mediante estudios de transferencia fecal, sino que también lo hace a modelos de colitis de naturaleza infecciosa como la inducida por *Citrobacter rodentium* [803]. En línea con esta observación, se han realizado varios estudios con objeto de dilucidar si los GC presentan efectos directos sobre la microbiota intestinal que justifiquen al menos en parte el hallazgo anterior. En este sentido, se ha demostrado que la administración de dexametasona exógena al hospedador tiende a incrementar la proporción relativa de bacterias aerobias Gram (-), anaerobias totales y de lactobacilos. Por otro lado, no existen muchos trabajos acerca de la influencia de los GC sobre el crecimiento bacteriano y su patogenicidad más allá de los ya citados anteriormente [801, 802] aunque Kakuno *et al.* han obtenido resultados que apuntan a que la administración sistémica de hidrocortisona incrementa la infección de *E. coli* sobre las células epiteliales de los túbulos renales [804].

A modo de conclusión, el concepto que se puede extraer en referencia a los efectos de los GC sobre la mucosa intestinal intacta propia de un individuo sano es que a pesar de que presenten algunos efectos que puedan contribuir a un reforzamiento de la función de barrera epitelial, parecen ser preponderantes aquellos por los que aumenta la permeabilidad intestinal paracelular y transcelular. Además, teniendo en cuenta que parecen favorecer la adherencia bacteriana a las células epiteliales intestinales, las evidencias existentes invitan a concluir que los GC inducen un comportamiento permeable (“leaky gut”) de aquella mucosa intestinal intacta sobre la que señalizan.

## 7. SÍNTESIS EXTRA-ADRENAL DE GLUCOCORTICOIDES

La total 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, donde el cortisol (humanos) y corticosterona (roedores) son generados a partir de colesterol y liberados al torrente sanguíneo que los distribuye por todo el organismo. No obstante, en las dos últimas décadas distintas líneas de investigación han puesto de manifiesto que otros tejidos cuentan con la maquinaria biosintética necesaria para la esteroidogénesis, y de hecho producen GC biológicamente activos (cortisol o corticosterona). De forma general, estos GC ejercen efectos inmunomoduladores insustituibles mediante una señalización esencialmente local a corta distancia de tipo paracrina o autocrino, a diferencia de los GC de origen suprarrenal que actúan en lugares distantes siguiendo el concepto clásico de hormona. Entre los tejidos con reconocida capacidad para la síntesis extraadrenal de GC destacan células de naturaleza epitelial presentes en el timo, piel, y por supuesto intestino, siendo este último el más interesante en nuestro caso. El epitelio pulmonar y el endotelio vascular presentan algunas de las enzimas propias de la esteroidogénesis, pero a día de hoy no se les considera fuentes extraadrenales de GC. En el caso del epitelio pulmonar porque su demostrada capacidad de liberación de corticosterona no parece ser dependiente de síntesis *de novo*, y sí de una reactivación local de deshidrocorticosterona a corticosterona mediada por 11- $\beta$ -HSD-1 [805]. Por otra parte, el endotelio vascular carece de algunas de las enzimas decisivas en la esteroidogénesis, lo que le inhabilita para la síntesis autónoma de GC, pero no le supone problema alguno producir aldosterona de forma autónoma [806, 807]. Por último, el caso del cerebro es quizá el de más compleja interpretación, pues diferentes estudios realizados en rata y ratón arrojan resultados poco congruentes en relación a la expresión de enzimas de la esteroidogénesis y las evidencias sobre la producción de corticosterona local, por lo que a pesar de la existencia de algunas evidencias que apuntan a que sobre todo en ratones existe una síntesis de corticosterona por parte de células de la glía, e incluso en el pez cebra, no se puede considerar al cerebro como un tejido esteroidogénico al mismo nivel que el epitelio intestinal [808, 809].

En general, la constatación experimental de un determinado tejido como fuente no adrenal de GC requiere de diversos enfoques experimentales. Es imprescindible poner de manifiesto la expresión de todas las enzimas necesarias para la esteroidogénesis y la determinación de GC producido *in vitro* por este tejido o una línea celular concreta del tipo celular implicado, así como la capacidad de este para ejercer acciones biológicas en tipos celulares diana, las cuales deben desaparecer con la exposición del tejido productor a inhibidores de la esteroidogénesis [602]. Hasta la fecha, únicamente los epitelios de piel, intestino y timo han satisfecho estos requisitos en su totalidad. A continuación, se describe brevemente la regulación y relevancia fisiológica de la síntesis de GC de forma local en piel, y algo más extensamente en intestino, obviando el caso del timo por haber sido explicado detalladamente en capítulos anteriores.

### 7.1. Síntesis extra-adrenal de GC en el epitelio epidérmico

El epitelio epidérmico comparte con el intestinal su total exposición al medio externo y a la importante carga antigénica que caracteriza a este. Por tanto, al igual que ocurre con la pared

intestinal, la piel debe comportarse como una barrera semipermeable con alto grado de tolerancia inmunológica respecto al medio externo para evitar el desarrollo de una inflamación crónica. Esta realidad, conjuntamente con los conocidos efectos inmunosupresores de los GC que colaborarían en dicha tarea, hizo que los epitelios epidérmico e intestinal fueran considerados como tejidos candidatos para la esteroidogénesis extra-adrenal.

En la actualidad está demostrado en humanos, aunque no completamente aún en roedores, que los queratinocitos y melanocitos cuentan con toda la maquinaria biosintética necesaria para la esteroidogénesis, desde los transportadores de colesterol, al expresar *metastatic lymph node 64* (MLN64), que es un análogo funcional de la proteína STAR ya comentada [810], hasta las propias enzimas que catalizan la conversión del colesterol en cortisol [811, 812]. Además, estas células expresan CRH y ACTH, así como el receptor específico para la última, por lo que cuentan con todos los componentes del eje HHA. De este modo, se puede hablar de la existencia de un eje análogo al HHA que funciona localmente regulando la síntesis y liberación auto-paracrina de cortisol de forma local en la piel [813]. La síntesis epidérmica local de cortisol se ve estimulada por los procesos inflamatorios, actuando como mediadores la CRH por su efecto inflamatorio directo sobre las uniones estrechas y los mastocitos anteriormente descritos en el caso intestinal, y su estimulación de la producción de ACTH que actuaría como intermediaria en dicha señalización. Otros mediadores que estimulan directamente esta esteroidogénesis cutánea son citoquinas pro-inflamatorias clásicas como la IL1 $\beta$  y el TNF $\alpha$  [814]. Parece obvio que la activación de este eje, que concluye con un incremento en la producción de cortisol en la epidermis, tiene como objeto evitar el desarrollo de procesos inflamatorios descontrolados tras una agresión localizada en la mucosa epidérmica. Sin embargo, está demostrado el efecto perjudicial de los GC sobre la restitución epitelial necesaria cuando esta mucosa se encuentra desorganizada de forma secundaria a una agresión externa, debido esencialmente a su efecto antiproliferativo. Por tanto, parece lógico que a pesar de los beneficios del cortisol localmente producido en dicho contexto existan mecanismos para regular negativamente su producción y efectos. Los dos más relevantes son, por un lado la inhibición de la esteroidogénesis debido al efecto de IGF-1 que ve específicamente incrementada su expresión cuando se perturba la función de barrera epidérmica y, por el otro, un aumento de la expresión de 11- $\beta$ -HSD-2 que cataliza en el entorno de la propia célula diana la conversión del cortisol en cortisona biológicamente inactiva [814].

## **7.2. Síntesis extra-adrenal de GC en el epitelio intestinal**

### **7.2.1. Regulación de la síntesis de GC en el epitelio intestinal**

Alrededor del año 1995 comenzó a ponerse de manifiesto la expresión de enzimas implicadas en la esteroidogénesis como la CYP11A1 en la mucosa intestinal [815]. Estos hallazgos hicieron que comenzara a contemplarse la posibilidad de que la mucosa intestinal tuviera la capacidad de sintetizar GC de forma autónoma, idea que se vio reforzada por otros experimentos que mostraban cómo algunos efectos de los GC sobre las IEL infiltradas en dicha mucosa desaparecían al administrar mifepristona al animal y en cambio apenas se veían reducidos cuando estos eran adrenalectomizados. A día de hoy existen evidencias experimentales consistentes que permiten afirmar que la mucosa intestinal en general, y sus células epiteliales en particular, son una fuente de GC locales que juegan un papel relevante en la tolerancia inmunológica intestinal y por consiguiente en la homeostasis de este tejido en condiciones basales y sobre todo inflamatorias.

Mediante estudios por PCR a tiempo real, se ha demostrado que el intestino delgado y grueso expresa la totalidad de las enzimas que participan en la esteroidogénesis. Aunque dicha expresión en un animal sano es muy baja, esta se ve dramáticamente incrementada ante el desarrollo de un proceso inflamatorio que cursa con afectación intestinal como el que se desencadena ante la administración intraperitoneal de un anticuerpo anti-CD3. Además, el cultivo *ex vivo* de fragmentos intestinales de estos animales reveló un aumento de su liberación de corticosterona que se correlacionó perfectamente con la expresión enzimática antes citada y que fue totalmente abolido por la adición de metirapona al medio de cultivo [816]. Además, la exposición de macrófagos del sistema inmune innato intestinal a LPS provoca un aumento significativo de la esteroidogénesis en las células epiteliales intestinales [817]. Al parecer el mediador inflamatorio determinante para la conexión entre la respuesta inflamatoria celular y la estimulación de la síntesis intestinal de GC es el TNF $\alpha$ , en la medida en que esta desaparece en animales deficientes en dicha citoquina o su receptor [817, 818]. Esto permitió confirmar que la inflamación intestinal provoca un aumento de la esteroidogénesis local que se traduce en la práctica en un incremento en la liberación de corticosterona, posiblemente orientada a contribuir a la represión y resolución de dichos procesos inflamatorios, evitando el daño tisular asociado a una respuesta inmune descontrolada.

Dentro de la complejidad que caracteriza al tejido intestinal, en un principio fue difícil estimar cuál era la fuente celular concreta de dicha 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 en la expresión de enzimas esteroidogénicas en poblaciones celulares intestinales purificadas revelaron que la fuente de estos GC eran las células epiteliales intestinales localizadas en la base de las criptas [816, 819, 820].

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 *steroidogenic receptor 1* (SF-1), en el epitelio intestinal este no se expresa, pasando a desempeñar su papel otra molécula denominada *liver receptor homologue 1* (LRH-1), que cuenta con múltiples similitudes estructurales con la anterior, las cuales se traducen en un significativo solapamiento funcional. Ambas se unen a los promotores de los genes codificantes de las enzimas esteroidogénicas, produciendo un aumento de su expresión. El hecho de que cada tejido use un factor de transcripción diferente y funcionalmente similar para controlar el mismo proceso refleja la necesidad de una regulación diferente en cada caso, que satisfaga las necesidades específicas a nivel de producción esteroidea. En línea con lo anterior, mientras que SF-1 en la corteza adrenal induce una esteroidogénesis de muy rápida respuesta y cuantitativamente potente, LRH-1 en el epitelio intestinal lo hace de un modo más progresivo y cuantitativamente limitado [821-823]. Un ejemplo muy ilustrativo sobre esta regulación diferencial es que mientras que un aumento experimentalmente inducido de AMPc intracelular en un epitelio que realiza esteroidogénesis controlada por SF-1 provoca una estimulación de la síntesis de GC, en otro funcionalmente regulado por LRH-1 se produce el efecto contrario.

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 estas ascendiendo a lo largo de las mismas se va perdiendo la expresión [824]. Cuando se produce

una agresión sobre el epitelio intestinal se ve incrementada la expresión de LRH-1, y en consecuencia la de Cyclin D1 [825], que a su vez aumenta la proliferación epitelial, contribuyendo así a la restitución de la función de barrera comprometida. 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.

### **7.2.2. Efectos de los GC intestinales sobre la inmunidad local de la mucosa intestinal**

#### *Efectos sobre el control de las respuestas antivirales*

Las células T CD8 que forman parte de las poblaciones celulares descritas como IEL, LPL o localizadas en el GALT, presentan un estado basal de activación mayor, caracterizado por una expresión superior de CD69, así como una mayor actividad funcional monitorizada por un incremento en la producción de IFN $\gamma$ , en los animales con la esteroidogénesis intestinal específicamente inhibida. Esto indica que los GC localmente producidos por las células epiteliales intestinales ejercen un papel atenuador sobre el perfil de activación inmune de las células inmunocompetentes que migran selectivamente al intestino (“gut homing”) [826].

#### *Efectos sobre la fisiopatología de la EII*

Las evidencias que hoy en día existen derivan del estudio del impacto que tiene la reducción en la expresión de LRH-1 en diversos modelos de colitis experimental, así como las alteraciones que se producen de dicho receptor nuclear y la esteroidogénesis en el tejido inflamado de pacientes afectados por EII.

En los modelos de colitis experimental asociados a un perfil de citoquinas Th1, destacando el modelo inducido por DSS y por TNBS, se produce un fuerte incremento de la expresión de enzimas esteroidogénicas y la liberación de corticosterona, que parece estar implicado en una acción antiinflamatoria. Es muy interesante destacar que este fenómeno se limita a los modelos de tipo Th1, ya que en la colitis inducida por oxazolona, que es de tipo Th2, esto no ocurre [827]. De confirmarse este extremo, supondría una validación adicional de la importancia de la regulación por TNF $\alpha$ . De hecho, la administración de TNF $\alpha$  exógeno en este modelo estimula la esteroidogénesis en las células epiteliales intestinales de un modo similar a como sucede en modelos como el DSS o el TNBS [817, 818]. En línea con el concepto anterior, los animales con delección condicional de LRH-1 específicamente restringida sobre las células epiteliales intestinales son más susceptibles a la colitis inducida por DSS y TNBS, debido esencialmente a una menor esteroidogénesis intestinal y a una menor capacidad restitutiva por su menor expresión de Cyclin D1, que se traduce en un proceso inflamatorio más intenso.

Para terminar, el análisis de biopsias intestinales de pacientes con EII reveló que, independientemente de que se trate de EC o CU (ya que ambas cursan con un notable aumento de TNF $\alpha$ ), se establece una correlación inversa entre la expresión de LRH-1 y enzimas esteroidogénicas clave en el proceso biosintético, y la gravedad de la respuesta inflamatoria [827].

Las evidencias experimentales acerca del TNF $\alpha$  citadas a lo largo de este texto, permiten atribuirle un papel como hoja de doble filo. Por un lado, tiene un efecto perjudicial sobre la función de barrera induciendo una desorganización de las uniones estrechas de forma dependiente de la estimulación de la proteína MLC, lo que se une a su capacidad de activación directa sobre muchos tipos celulares inmunocompetentes. Mientras que por el otro presenta otros de carácter antiinflamatorio, ya que tiene cierta capacidad para la inducción de apoptosis, así como su relevancia en la estimulación de la síntesis de GC locales intestinales que mecanísticamente se oponen a la desorganización de las uniones estrechas que induce de un modo directo sobre las células epiteliales intestinales [828].

*Efectos sobre la inmunidad antitumoral*

Las células cancerosas que componen los adenocarcinomas colónicos son capaces de producir de forma autónoma y constitutiva GC endógenos. En estas células el factor LRH-1 es decisivo, mediando tanto la esteroidogénesis, como su estado basal hiperproliferativo mediante mecanismos independientes entre sí. En los últimos años está comenzando a ser considerada la capacidad de las células tumorales intestinales para producir GC en su contexto local como un mecanismo específicamente utilizado por el tumor para evadir la inmunovigilancia antitumoral y por tanto su propia destrucción, viéndose facilitado en ese sentido el desarrollo descontrolado del proceso neoplásico [829].



# OBJETIVOS





La terapia farmacológica orientada al manejo clínico de la EII disponible actualmente está dirigida al mero control sintomático de la inflamación y la respuesta inmunológica de un modo inespecífico. La razón principal que justifica esta situación es la insuficiente caracterización de su etiología, lo que implica la ausencia de una o varias dianas farmacológicas mediante cuya modulación se pueda controlar la causa subyacente del desorden. Por esta razón, la investigación básica focalizada en la fisiopatología de esta enfermedad resulta de gran utilidad para tratar de solucionar esta limitación.

Por otro lado, las diferentes opciones terapéuticas existentes a pesar de conseguir en una significativa proporción de los casos un manejo de la enfermedad bastante aceptable, presentan efectos adversos importantes y que aparecen con mucha frecuencia. Por consiguiente, la investigación encaminada a la obtención de nuevas herramientas terapéuticas igualmente se encuentra justificada.

Los GC son una de los grupos farmacológicos de mayor uso especialmente en la inducción de remisión en la EII. Sin embargo, solo un 40% de los pacientes responden con normalidad, mientras que el resto se comportan como corticorresistentes o desarrollan dependencia de estos dentro de su estado de remisión, tal y como se ha descrito anteriormente. Además, las evidencias clínicas también apuntan a la carencia de utilidad de estos en el mantenimiento del estado de remisión no solo por su perfil de efectos adversos, sino también por su ineficacia en ese sentido. Las evidencias experimentales basadas en la aplicación de GC sintéticos en diferentes modelos de colitis experimental surgieron *a posteriori* con respecto a su uso empírico en la clínica, siendo en su mayoría fiel reflejo de su potente actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora que les hace presentar efectos muy beneficiosos en la gran mayoría de ellos, sobre los marcadores fisiopatológicos y la supervivencia [830-833]. No obstante, en el caso concreto del modelo de colitis inducida por DSS, a lo largo de las dos últimas décadas han surgido diversos trabajos que haciendo uso de los GC en general, y la budesonida en particular por su profuso uso clínico, muestran datos que indican de forma inequívoca que aquellos animales que reciben el GC ven incrementada la severidad del modelo y la tasa de mortalidad comparados con el grupo colítico no tratado [834-838]. Sorprendentemente, a pesar de la consistencia de estas evidencias obtenidas de forma repetida en diferentes laboratorios y con diferentes cepas de ratón, en ninguno de ellos se profundiza en las razones que pudieran justificar un comportamiento tan desfavorable de uno de los fármacos de aplicación actual directa en la terapia de la EII, al ser utilizados en uno de los modelos experimentales de EII más usados desde hace años.

Esta tesis doctoral ha tenido como objetivo fundamental la puesta de manifiesto del impacto negativo de los GC en la evolución del modelo de colitis experimental inducido por DSS en ratones, focalizando sobre los efectos de la budesonida en los diferentes componentes del sistema inmune gastrointestinal, especialmente en aquellos que ejercen una contribución significativa a la función de barrera intestinal. Asimismo, se ha tratado de describir los eventos sistémicos que justificaban la elevada mortalidad entre los animales colíticos tratados con el GC vía oral. Con objeto de alcanzar una mayor comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes a los efectos negativos de la budesonida en este modelo de colitis experimental, paralelamente se han realizado estudios *in vitro* haciendo uso de diversos GC de uso clínico, focalizados en algunos de los componentes más relevantes de la mucosa intestinal a nivel inmunológico.

Atendiendo a las premisas anteriormente formuladas, de un modo resumido se pueden establecer los siguientes objetivos para la presente tesis doctoral:

1. Confirmar el impacto negativo de los GC administrados vía oral en el modelo de colitis experimental inducido por DSS y contraponerlo con su efecto sobre la severidad de un modelo de colitis exclusivamente mediado por células T.
2. Dilucidar los eventos de tipo sistémico que concurren en los animales que sufren de colitis inducida por DSS mientras reciben GC vía oral, que puedan ser justificativos de la elevada tasa de mortalidad que les caracteriza.
3. Caracterizar mediante estudios *in vitro* aquellas acciones moleculares de los GC sobre los diferentes tipos celulares que participan activamente en la función de barrera intestinal, que puedan contribuir a sus efectos *in vivo* sobre la colitis inducida por DSS.

# RESULTADOS



Según se ha descrito en el apartado de objetivos, el trabajo experimental reflejado en esta tesis doctoral trata en primer lugar de corroborar el efecto negativo de la administración de GC sobre la evolución del modelo de colitis experimental inducida por DSS. En todos los experimentos *in vivo* se ha hecho uso de la budesonida administrada vía oral, esencialmente por ser este el GC de primera elección en la clínica actual para ser administrado por dicha vía gracias a su elevado efecto de primer paso hepático. Esta virtud supone una gran ventaja frente a otros GC ya que a las dosis a las que se suele administrar su distribución sistémica es inferior al 10%, lo que a su vez minimiza los efectos adversos metabólicos inherentes al uso de los GC. Por esta razón, por su elevada potencia antiinflamatoria y por los reducidos efectos de tipo mineralocorticoide que la caracterizan, la budesonida es profusamente utilizada en el manejo clínico de la EII, lo que a su vez nos hizo decantarnos por ella de cara a su uso en este estudio. No obstante, en los estudios *in vitro* realizados mediante cultivos primarios de células implicadas en la inmunología intestinal y sobre líneas celulares de células epiteliales intestinales, en la mayoría de los casos la budesonida fue ensayada de forma paralela a otros tres GC clásicos como la dexametasona, prednisolona e hidrocortisona.

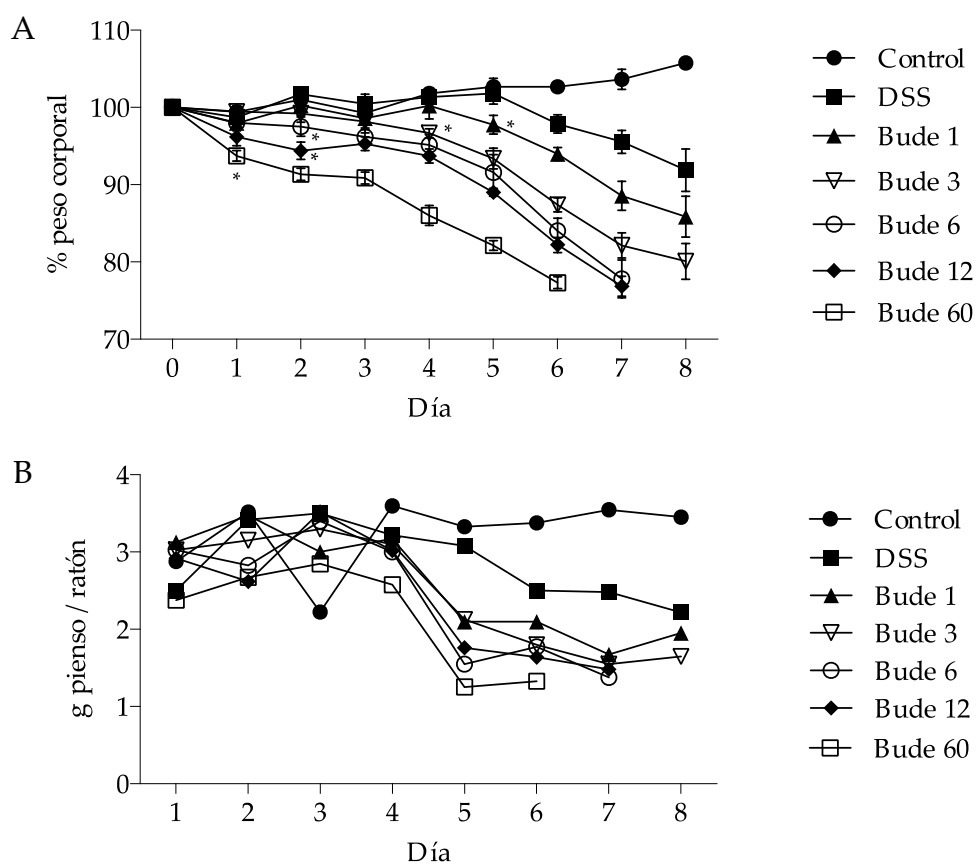
## 1. ESTUDIOS *IN VIVO*

En primer lugar se realizaron dos estudios *in vivo* (DSS1 y DSS2) orientados a la descripción del efecto de la budesonida sobre la colitis aguda inducida por DSS, siendo administrada esta exclusivamente desde la incorporación del DSS en el agua de bebida. En el caso de DSS1, el GC fue administrado en un amplio rango de dosificación con objeto de poner de manifiesto la posible dosis-dependencia del fenómeno en cuestión y establecer una dosis adecuada para los estudios a desarrollar con posterioridad. En el experimento denominado DSS2, la budesonida fue administrada a dos dosis elegidas en virtud de los hallazgos referentes a DSS1, desde el comienzo de la colitis aguda inducida por DSS y paralelamente durante 7 días a animales sanos con objeto de determinar si los efectos negativos del GC a nivel intestinal estaban o no exclusivamente asociados al contexto inflamatorio. Una vez puestos de manifiesto los eventos intestinales y sistémicos que acontecen en los animales tratados con budesonida mientras se les induce una inflamación colónica por DSS, se realizó el experimento denominado como DSS-PGF en el que se aplicó el mismo protocolo experimental que en DSS2 pero sobre animales cuya microbiota intestinal había sido previamente deplecionada mediante la administración de antibióticos, con objeto de determinar la influencia de la carga microbiana luminal en los efectos de la budesonida sobre los animales colíticos. A continuación, se realizó un experimento al que me referiré como DSS3, el cual aplicando un protocolo de doble ciclo de DSS que incluye la administración de budesonida exclusivamente durante los 5 días previos al segundo de ellos, permite conocer las consecuencias de la administración del GC exclusivamente a modo de pre-tratamiento. Por otro lado, con objeto de poder comparar el efecto de los GC sobre otros modelos de colitis experimental más fisiológicos, se ensayó la budesonida en un modelo de colitis no químico, de tipo crónico y estrictamente dirigido por células T como es el inducido mediante transferencia linfocitaria.

### 1.1. Efecto de la budesonida sobre la colitis aguda inducida por DSS

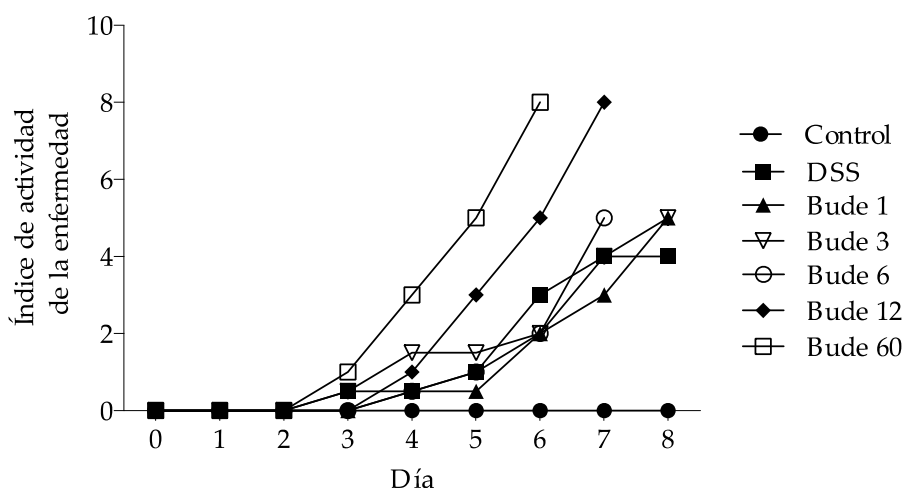
En una primera aproximación experimental (DSS1) se ensayó un amplio rango de dosis de budesonida en la colitis aguda inducida por DSS, abarcando desde 1 hasta 60  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$  (indicado numéricamente), comenzando su administración por vía oral (gastroesofágica) el mismo

día que se incorpora el DSS al agua de bebida. Con este experimento se pretendía corroborar las evidencias publicadas que indicaban un efecto perjudicial de los GC sobre la evolución de este modelo experimental con un importante impacto negativo sobre la supervivencia de los animales objeto de estudio, así como la posible relación existente entre la dosis de GC y dicho fenómeno. El modelo de colitis aguda inducida por DSS se desarrolló con normalidad, cursando con un sangrado rectal manifiesto desde el día 3-4, anorexia y pérdida de peso que se hace notoria desde el día 4-5 en adelante (Fig. 1 A y B) y una afectación inflamatoria que se circunscribe fundamentalmente al entorno colónico, el cual sufre un sustancial acortamiento mostrando un aspecto marcadamente fibrótico, lo que a su vez determina un aumento en su relación peso/longitud (Tabla 5).



Como se puede observar en la figura 1, el tratamiento de los animales colíticos con budesonida agravó significativamente la colitis de forma dosis-dependiente, en la medida que la evolución de pesos se desmarcó de forma estadísticamente significativa respecto al control colítico no tratado en el día 1 para Bude60, día 2 para Bude6 y Bude12, y día 4 y 5 para Bude3 y Bude1, respectivamente. El impacto negativo del GC sobre este modelo de colitis aguda hizo necesario sacrificar a los animales de un modo secuencial por razones éticas conforme alcanzaban el 20% de pérdida de peso, lo que implicó que para Bude60 el experimento se prolongara únicamente 6 días, 7 días para Bude12 y Bude6, mientras que en el caso de Bude3 y Bude1 se pudo extender durante 8 días en paralelo al grupo colítico no tratado. Como se observa en la figura 1 B, el consumo de comida

evolució de forma lógica a como lo hizo el peso de los animales, observándose una reducción del mismo asociado a la administración de budesonida de un modo dosis-dependiente. Del mismo modo, el índice de actividad de la enfermedad se vió sustancialmente incrementado con el transcurso de los días en el grupo colítico no tratado, siendo a su vez dicha tendencia acrecentada por el tratamiento con el GC principalmente a las dosis más elevadas, reflejando en cualquier caso un perfil que denota una manifiesta dependencia de la dosis similar a la descrita anteriormente para la evolución del peso de los animales (Fig. 2).



**Figura 2:** Evolución del índice de actividad de la enfermedad en la colitis aguda inducida por DSS. Los resultados son expresados en forma de valor numérico puntual por grupo y día. Bude=budesonida.

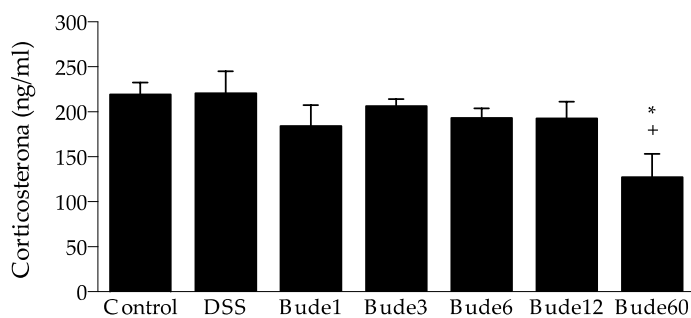
Sin embargo, la budesonida ejerció un efecto antiinflamatorio a nivel intestinal que resultó muy notorio y estadísticamente significativo sobre parámetros como la fibrosis macroscópica y el peso del bazo, pero también se reflejó en la relación peso/longitud de colon e íleon a las dosis de Bude 12 y Bude 60 aunque en este caso sin alcanzar la significancia estadística (Tabla 5). Dichos efectos, en principio no son en absoluto sorprendentes atendiendo a la reconocida potencia antiinflamatoria de la budesonida, pero contrastan radicalmente con el evidente impacto negativo de la misma sobre la evolución y supervivencia de los animales sometidos a la colitis aguda inducida por DSS.

Uno de los objetivos que perseguíamos en este caso, era estimar en nuestro sistema experimental concreto cuál era la máxima dosis de budesonida que no generaba una distribución sistémica significativa de la misma y sus efectos adversos metabólicos inherentes que tratan de evitarse en su uso clínico. En este sentido, la determinación de corticosterona endógena en plasma haciendo uso de un kit de ELISA que la reconoce de forma específica frente a cualquier glucocorticoide sintético, nos permitió observar que únicamente en el caso de la dosis de 60  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$  se produce dicho fenómeno que se refleja en una reducción de los niveles plasmáticos del GC endógeno, asociada a la inhibición ejercida por la budesonida sobre el eje HHS (Fig. 3).



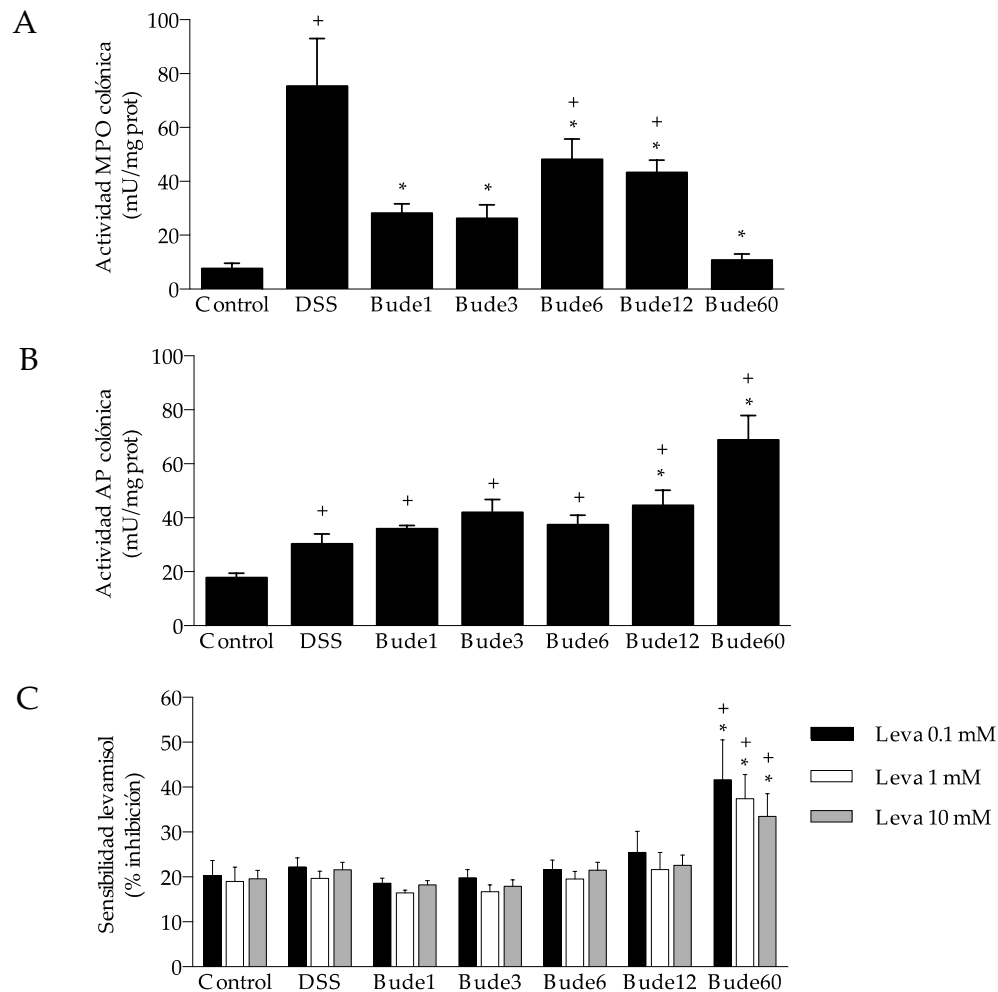
**Tabla 5:** Efecto de la budesonida sobre algunos parámetros inflamatorios y la relación peso/longitud de los segmentos intestinales afectados en la colitis aguda inducida por DSS. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs Control; \*  $p < 0.05$  vs DSS. Bude=budesonida, UA=unidades arbitrarias.

| Grupos  | Fibrosis<br>macroscópica<br>(UA) | Peso Bazo (mg)     | Relación<br>peso/longitud<br>Colon (mg/cm) | Relación<br>peso/longitud<br>Íleon (mg/cm) |
|---------|----------------------------------|--------------------|--|--|
| Control | ---                              | 54.775 $\pm$ 6.21  | 21.4 $\pm$ 1.31                            | 18.2 $\pm$ 3.4                             |
| DSS     | 1 $\pm$ 0 +                      | 85.12 $\pm$ 9.24 + | 32.2 $\pm$ 1.18 +                          | 20 $\pm$ 1.5                               |
| Bude 1  | 0.625 $\pm$ 0.125 +*             | 67.5 $\pm$ 4.78 +* | 36 $\pm$ 2.17 +                            | 25.4 $\pm$ 2.79                            |
| Bude 3  | 0.875 $\pm$ 0.125 +              | 42.85 $\pm$ 2.63 * | 39.2 $\pm$ 1.3 +                           | 19.2 $\pm$ 1.17                            |
| Bude 6  | 1 $\pm$ 0 +                      | 42.55 $\pm$ 4.69 * | 32.6 $\pm$ 2.08 +                          | 18.4 $\pm$ 0.57                            |
| Bude 12 | 0.6 $\pm$ 0.187 +*               | 43.94 $\pm$ 2.49*  | 32.9 $\pm$ 0.92 +                          | 21.6 $\pm$ 2                               |
| Bude 60 | 0.25 $\pm$ 0.25 *                | 53.3 $\pm$ 4.34 *  | 29.2 $\pm$ 2.8 +                           | 15.9 $\pm$ 3.1                             |



**Figura 3:** Determinación de corticosterona en plasma mediante ELISA. Los datos se expresan en ng/ml y como media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs Control; \*  $p < 0.05$  vs DSS.

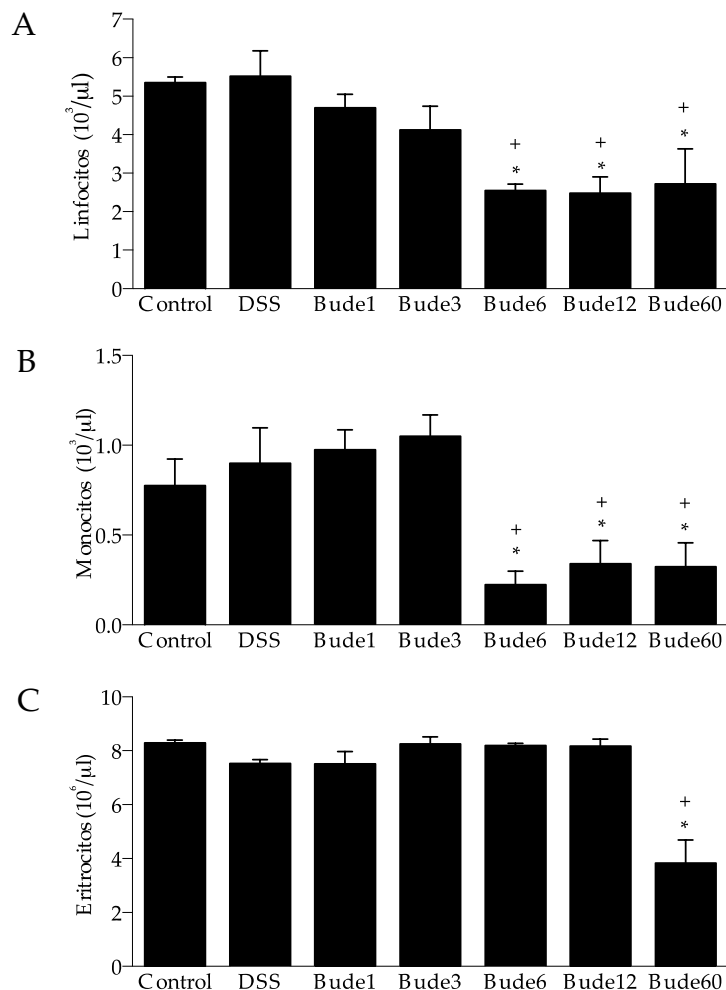
Con objeto de obtener una definición más completa del efecto meramente antiinflamatorio de la budesonida en este modelo experimental se realizó la determinación de las actividades mieloperoxidasa (MPO) y fosfatasa alcalina (AP) en el tejido colónico (Fig. 4). El grupo control colítico (DSS) muestra un aumento de la actividad MPO, reflejo del reclutamiento neutrofílico característico de este modelo. Además, sufre un incremento estadísticamente significativo de la actividad AP colónica aunque cuantitativamente más limitado (2 veces) que el de la MPO que alcanza un valor alrededor de 7 veces superior al Control. Asimismo, se puede observar que el tratamiento con budesonida produce una reducción dramática de la actividad MPO independientemente de la dosis a considerar (Fig. 4 A), mientras que en referencia a la actividad AP colónica el tratamiento no solo no consigue reducirla en comparación con el grupo DSS, sino que en las dosis de 12 y 60  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$  esta se ve claramente aumentada por encima de dicho grupo control colítico (Fig. 4 B). En línea con esto último, la sensibilidad de la AP a levamisol no se vió alterada significativamente en el grupo colítico no tratado, mientras que la budesonida a la dosis más elevada produjo un incremento significativo de la misma a todas las concentraciones del inhibidor adicionado *in vitro*, fenómeno asociado a un cambio de isoforma de la enzima (Fig. 4 C).

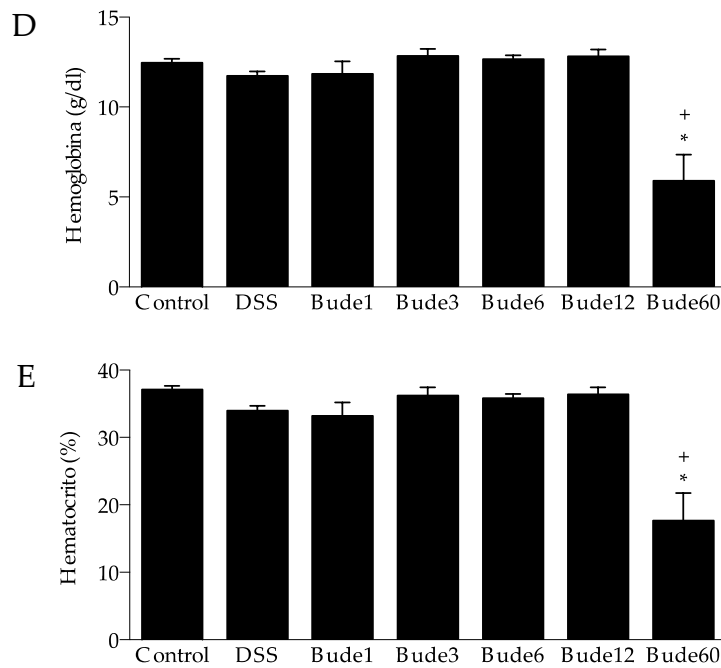


**Figura 4:** Determinación de actividades enzimáticas en el tejido colónico. (A) MPO (mU/mg prot); (B) AP (mU/mg prot); (C) sensibilidad de AP a levamisol (% de inhibición de la actividad AP). Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs Control; \*  $p < 0.05$  vs DSS. Bude=budesonida, Leva=levamisol.

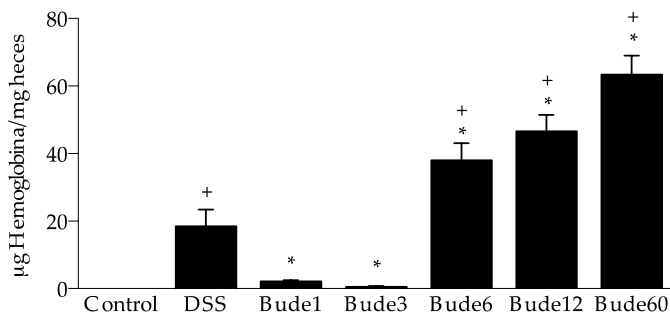
Se realizó asimismo el análisis de algunos parámetros sanguíneos que pudieran resultar de interés para la comprensión del efecto de la budesonida en este modelo experimental. Dado que el sangrado rectal evidente es uno de los eventos más específicamente asociados a la colitis experimental inducida por DSS, se analizaron en sangre periférica algunos parámetros informativos acerca de la pérdida de sangre asociada a la colitis, destacando en ese sentido los eritrocitos totales, la hemoglobina y el hematocrito. No obstante, con objeto de evaluar las consecuencias sistémicas del efecto antiinflamatorio de la budesonida se analizó también la concentración de linfocitos y monocitos en sangre periférica, las cuales se vieron alteradas en este caso como consecuencia del proceso inflamatorio *per se*. El impacto de la budesonida sobre estos parámetros fue destacable, ya que desde la dosis de 6  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$  en adelante produjo una consistente reducción de la concentración de ambos elementos formes sanguíneos respecto a los grupos Control y control colítico, lo que se encuentra en consonancia con su reconocido efecto antiinflamatorio, antiproliferativo e inmunosupresor (Fig. 5 A y B). Por el contrario, la mayor dosis ensayada de budesonida produjo un dramático descenso en los niveles de eritrocitos circulantes, hemoglobina y hematocrito (Fig. 5 C-E), lo que nos pareció plausiblemente asociado a un

agravamiento del sangrado rectal inducido por la exposición de los animales colíticos al GC. Con objeto de confirmar esta hipótesis sustentada además en datos provenientes de la observación diaria de los animales, la cual se ve reflejada en la valoración del índice de actividad de la enfermedad asignados por grupo y día representados en la figura 2, se realizó la determinación cuantitativa de la sangre oculta en heces (Fig. 6). Dicha cuantificación se realizó sobre heces recolectadas individualmente de cada animal en el día 5 de evolución de la colitis, dado que mi experiencia personal me indica que es el momento más sensible a diferencias experimentales antes de que el sangrado rectal sea masivo en cualquier caso. Tal y como se aprecia en la figura 6, la colitis inducida por DSS se acompaña de la presencia de sangre oculta en heces, la cual se ve incrementada de forma estadísticamente significativa respecto al grupo Control, mientras que la administración de budesonida a las dosis de 1 y 3  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$  a dichos animales colíticos la reduce. Sorprendentemente, las dosis superiores a 6  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$  producen un incremento dosis-dependiente del sangrado rectal que es evidente de forma visual y que se traduce en un aumento de la sangre oculta en heces analíticamente cuantificada.





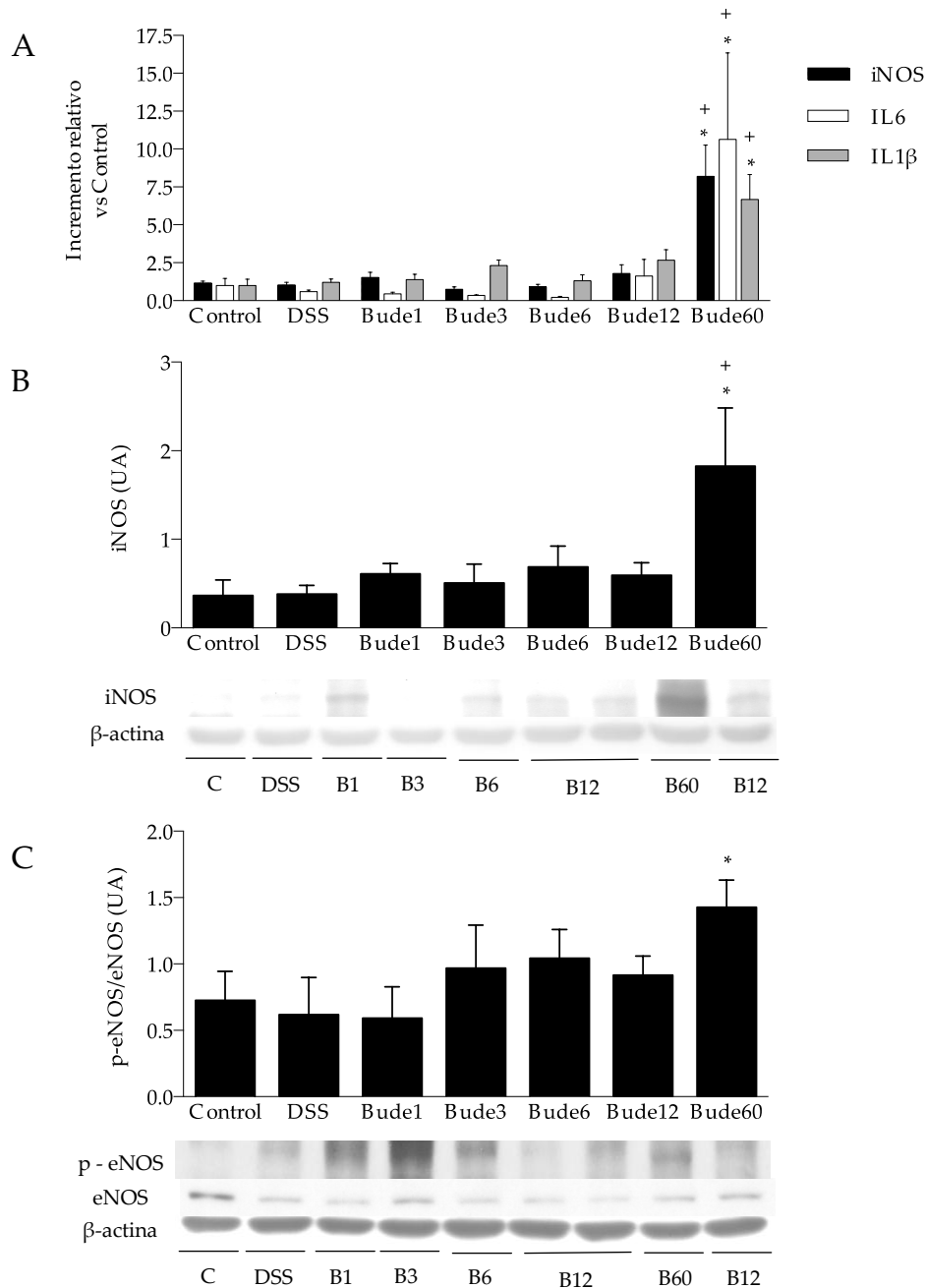
**Figura 5:** Estudio hematológico en sangre extraída el día del sacrificio de los animales. (A) Linfocitos ( $10^3/\mu\text{l}$ ); (B) monocitos ( $10^3/\mu\text{l}$ ); (C) eritrocitos ( $10^6/\mu\text{l}$ ); (D) hemoglobina (g/dl); (E) hematocrito (%). Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs Control; \*  $p < 0.05$  vs DSS. Bude=budesonida.



**Figura 6:** Determinación de sangre oculta en heces obtenidas transcurridos 5 días de inducción de colitis. Los datos se expresan en  $\mu\text{g}$  hemoglobina/mg heces y como media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs Control; \*  $p < 0.05$  vs DSS. Bude=budesonida.

Algunos de los síntomas que observamos en los animales pertenecientes a los grupos Bude12 y Bude60, así como la experiencia previa de otros miembros del grupo de investigación con el uso de la budesonida en el modelo de colitis inducida por TNBS en rata, nos indujeron a pensar que una de las posibles causas que podrían estar detrás de la peor evolución de la colitis inducida por DSS en aquellos animales que reciben el GC podría ser una perturbación de la función de barrera intestinal. Asimismo, nos pareció plausible que fuera a su vez la causante de cierta translocación bacteriana a tejidos extraintestinales, la cual al descontrolarse podría desencadenar una septicemia que encajaría bastante bien con los síntomas e incrementada mortalidad observados en los animales tratados. En consecuencia, decidimos determinar algunos de los parámetros que se encuentran típicamente modificados en los modelos experimentales de shock séptico que se han desarrollado hasta la fecha, en los cuales entre otros eventos, se suele producir un aumento de la infiltración neutrofílica en los pulmones, un marcado incremento de la expresión de iNOS y otras citoquinas proinflamatorias y la fosforilación de eNOS en tejidos altamente vascularizados como pulmón o riñón. Estos biomarcadores asociados a la sepsis son un reflejo del proceso inflamatorio sistémico que se desarrolla, el cual de forma secundaria genera un aumento de la presencia de

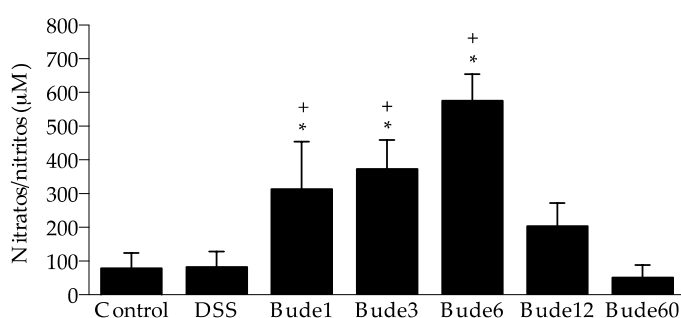
nitratos/nitritos en plasma [839, 840]. En primer lugar se evaluó mediante PCR a tiempo real la expresión en tejido pulmonar de iNOS, IL1 $\beta$  e IL6. De acuerdo con nuestras sospechas, la expresión de estos marcadores de sepsis aumentó notablemente en aquellos animales colícticos que recibieron la budesonida a la dosis de 60  $\mu$ g/ratón/día, mientras que en el resto de grupos colícticos tratados este fenómeno fue muy sutil y no alcanzó la significancia estadística (Fig. 7 A).



**Figura 7:** Análisis de biomarcadores de sepsis en el tejido pulmonar. (A) Expresión génica de iNOS, IL1 $\beta$  e IL6 analizada por PCR a tiempo real, el resultado es expresado como incremento relativo frente al grupo Control; (B) expresión proteica de iNOS, los valores son referidos a la expresión de  $\beta$ -actina; (C) expresión proteica de p - eNOS, los valores aparecen referidos a la expresión de eNOS total. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs Control; \*  $p < 0.05$  vs DSS. Bude=budesonida, UA=unidades arbitrarias, C=control.

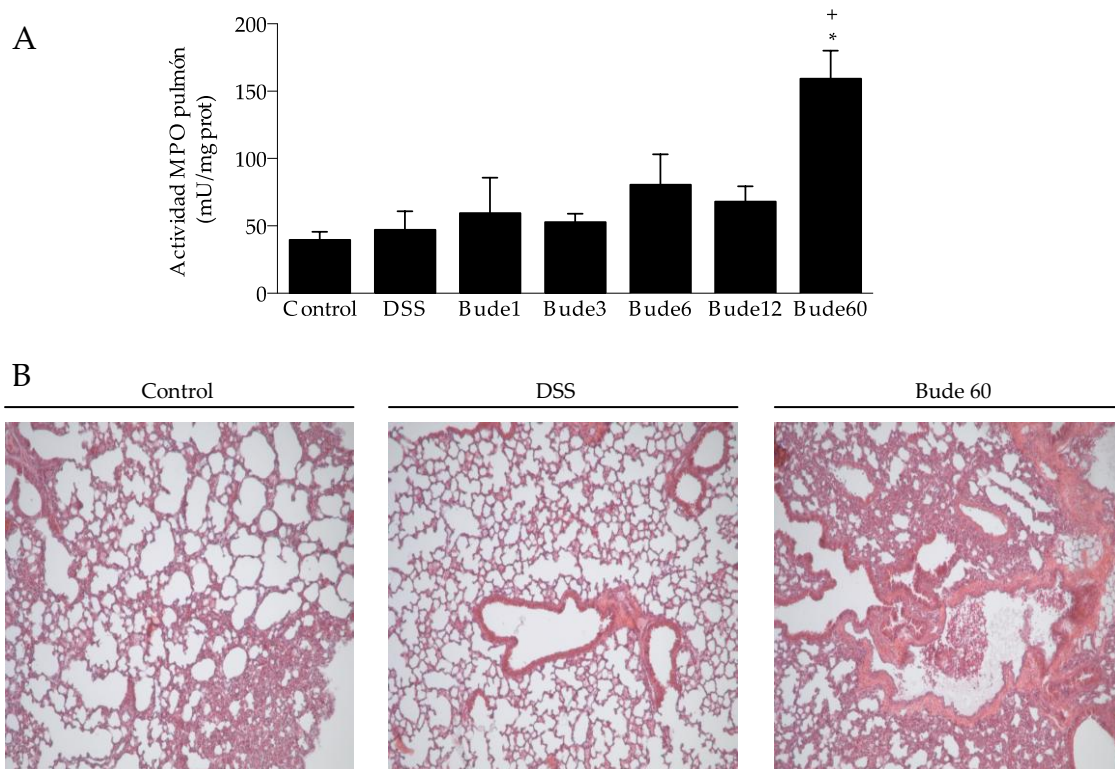
Asimismo, se analizó la expresión proteica de iNOS y la relación p – eNOs/eNOS en pulmón mediante Western Blot, arrojando resultados esencialmente comparables a aquellos obtenidos por PCR a tiempo real, ya que ambos parámetros aparecen exclusiva y significativamente incrementados en el grupo tratado con budesonida a la mayor dosis ensayada, mientras que ni el control colítico ni ninguno de los otros grupos colíticos tratados alcanzaron significancia estadística en ningún caso (Fig. 7 B y C).

Para concluir el análisis de aquellos biomarcadores relacionados con el metabolismo del óxido nítrico que se ven modificados en los modelos experimentales murinos de sepsis, se realizó la cuantificación de los nitratos/nitritos presentes en plasma haciendo uso de la reacción de Griess. Al parecer, este es un parámetro bastante más sensible a la septicemia que los analizados en la figura 7, ya que mientras que el grupo control colítico no sufre modificación alguna o sutil en todo caso, se produce una elevación consistente del mismo en aquellos grupos que recibieron dosis bajas de budesonida (1, 3 y 6  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$ ). Paradójicamente, a pesar de ser los grupos más afectados por la septicemia inducida por la administración del GC en el contexto inflamatorio de la colitis inducida por DSS según los datos que arrojan el resto de parámetros analizados, los nitratos/nitritos en plasma no se encuentran significativamente elevados en los grupos Bude 12 y Bude 60, muy probablemente por la cierta distribución sistémica del GC que acontece ante dicha dosificación, la cual enmascara la sepsis monitorizada a través de este parámetro debido al potente efecto antiinflamatorio del propio GC sobre algunas de las fuentes periféricas de este metabolito (Fig. 8).



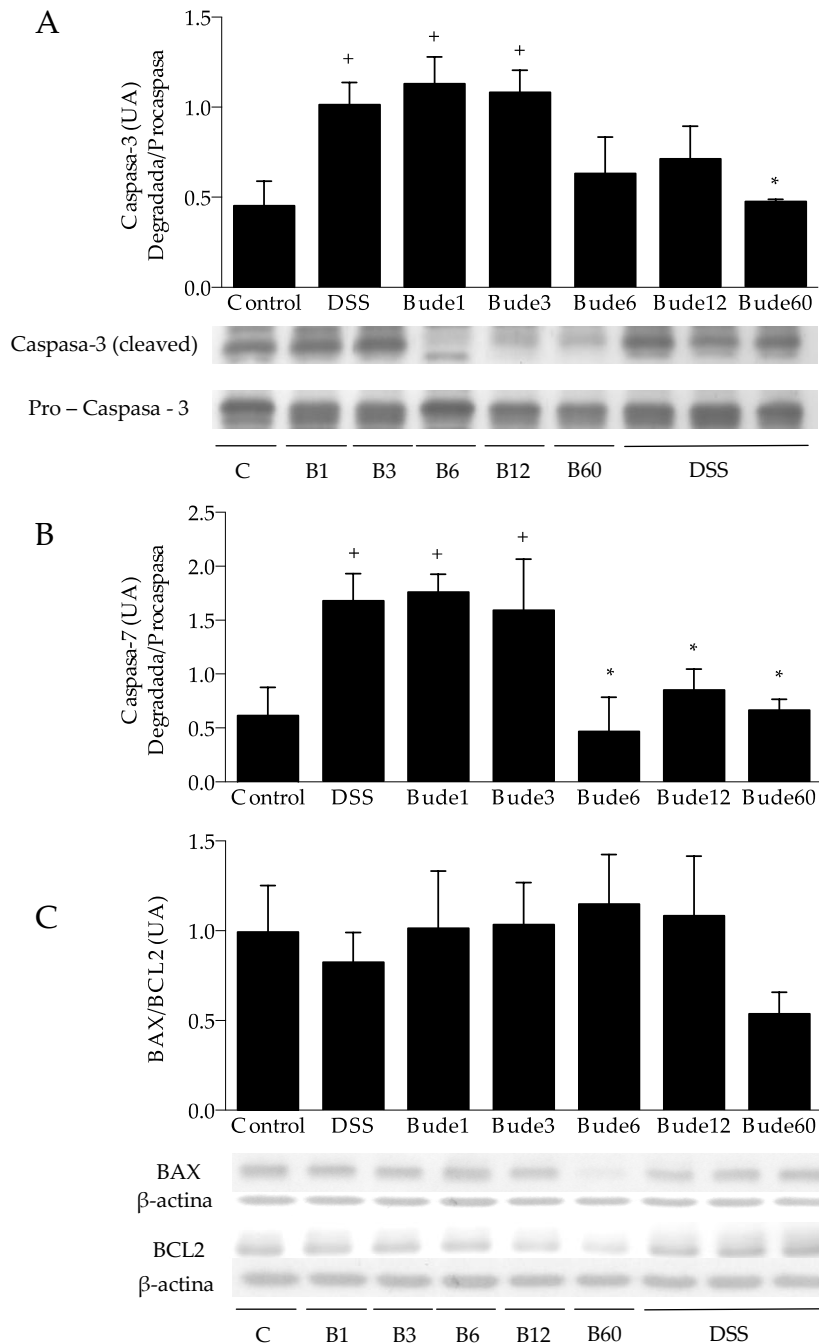
**Figura 8:** Concentración de nitratos/nitritos en plasma. Los resultados son expresados en concentración  $\mu\text{M}$ , y en forma de media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs Control; \*  $p < 0.05$  vs DSS. Bude=budesonida.

Con objeto de determinar el grado de infiltración neutrofílica en el tejido pulmonar de aquellos animales objeto de estudio, se analizó la actividad MPO de dicho tejido y se realizó un estudio histológico sobre secciones longitudinales del propio pulmón. Los resultados del análisis de la actividad MPO pulmonar muestran un perfil coincidente con el mostrado por el estudio de la expresión génica y proteica de iNOS, quedando de este modo confirmada la concurrencia de una septicemia en los animales colíticos tratados con budesonida, siendo esta tanto más evidente cuanto mayor es la dosis de GC administrada (Fig. 9 A). En consonancia con estos hallazgos, el análisis de las secciones de tejido pulmonar sometidas a la tinción con hematoxilina & eosina reveló un ligero aumento de la infiltración leucocitaria alrededor y en el espacio alveolar, en aquellos animales colíticos que recibieron budesonida a la dosis de 60  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$  en comparación con el grupo colítico no tratado, mientras que la colitis inducida por DSS no generó efecto alguno *per se* a este nivel (Fig 9 B).



**Figura 9:** Análisis de la infiltración neutrofílica en el tejido pulmonar. (A) MPO (mU/mg prot); (B) imágenes de histología (10X) de secciones longitudinales de pulmón, sometidas a la tinción clásica con hematoxilina & eosina, representativo de los grupos control, control colítico (DSS) y colítico tratado con budesonida a 60  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$  (Bude 60). Donde corresponde, los datos son expresados en forma de media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs Control; \*  $p < 0.05$  vs DSS. Bude=budesonida.

En la fisiopatología de la EII y los modelos experimentales de la misma, la apoptosis en el tejido intestinal inflamado juega un papel relevante en la modulación de la función de barrera ejercida por el mismo. Por esta razón, decidimos evaluar si la administración de budesonida ejercía algún efecto sobre este aspecto que pudiera justificar al menos en parte el agravamiento observado en el proceso inflamatorio aquí ensayado. La relación entre la forma degradada (“cleaved”) y la forma de pro-caspasa para las caspasas-3 y 7 fue analizado mediante Western Blot. Los resultados para ambas proteínas reflejan un aumento de la apoptosis asociada al modelo inflamatorio, ya que la relación antes mencionada sufre un aumento de entre 2 y 3 veces en el grupo colítico no tratado (DSS) en comparación con el Control. La budesonida por su parte, produjo una consistente inhibición de dicho fenómeno aunque solo a partir de la dosis de 6  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$  (Fig.10 A y B). Utilizando la misma técnica se analizó la expresión de las proteínas *bcl2-associated x protein* (BAX) y *B cell lymphoma 2* (BCL2), las cuales ejercen una regulación mutuamente antagónica sobre la apoptosis, ya que BAX presenta un efecto favorecedor de al apoptosis mientras que BCL2 la previene. En la figura 10 C, sorprendentemente no se observó un incremento de la relación BAX/BCL2 como podría esperarse atendiendo los resultados de las caspasas, pero sí que aparece en el grupo Bude 60 al menos cierta tendencia hacia su reducción en comparación con el Control y el grupo colítico no tratado, aunque lejos de la significancia estadística en cualquier caso (Fig 10 C). Estos datos confirman que el tratamiento con el GC reduce la apoptosis inducida por el proceso inflamatorio experimental, y por tanto este no es un parámetro cuya modulación asociada a la budesonida justifique el agravamiento del modelo que esta produce.

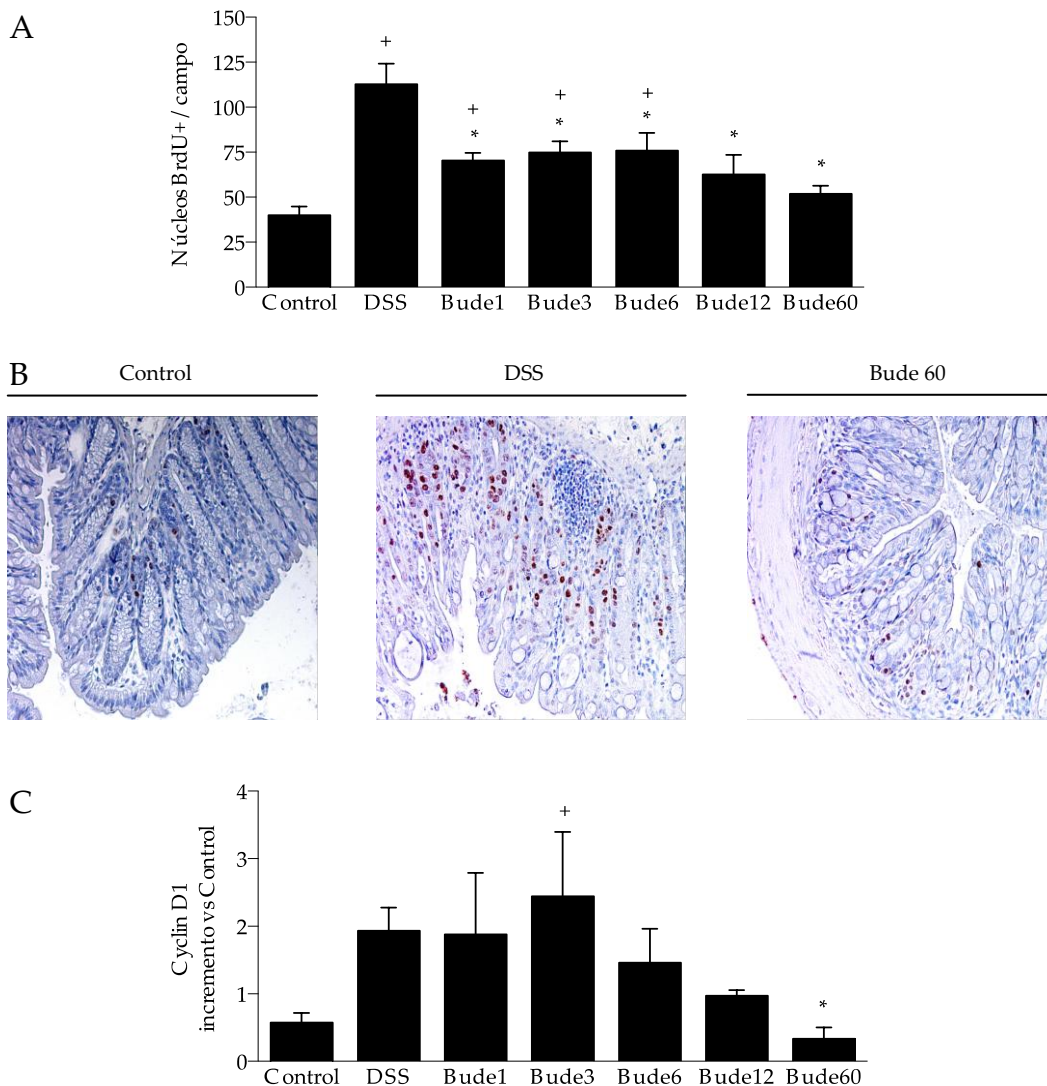


**Figura 10:** Expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis en el tejido colónico determinada mediante Western Blot. Los datos están calculados en todo caso en relación a la expresión de  $\beta$ -actina y aparecen expresados como la media  $\pm$  SEM de las relaciones indicadas en cada caso. (A) Relación caspasa-3 degradada/pro-caspasa-3; (B) relación caspasa-7 degradada/pro-caspasa-7; (C) relación BAX/BCL2. +  $p < 0.05$  vs Control; \*  $p < 0.05$  vs DSS. Bude=budesonida, UA=unidades arbitrarias, C=control, B=budesonida.

La capacidad de restitución propia del epitelio intestinal es una de las características del mismo que más decisivamente influyen en la evolución de la colitis aguda inducida por DSS. A día de hoy está totalmente demostrado que cuando el epitelio intestinal presenta una reducida capacidad proliferativa, su capacidad para restituir la función de barrera que queda comprometida ante la erosión del epitelio dependiente del DSS es menor, y ello generalmente se traduce en una mayor



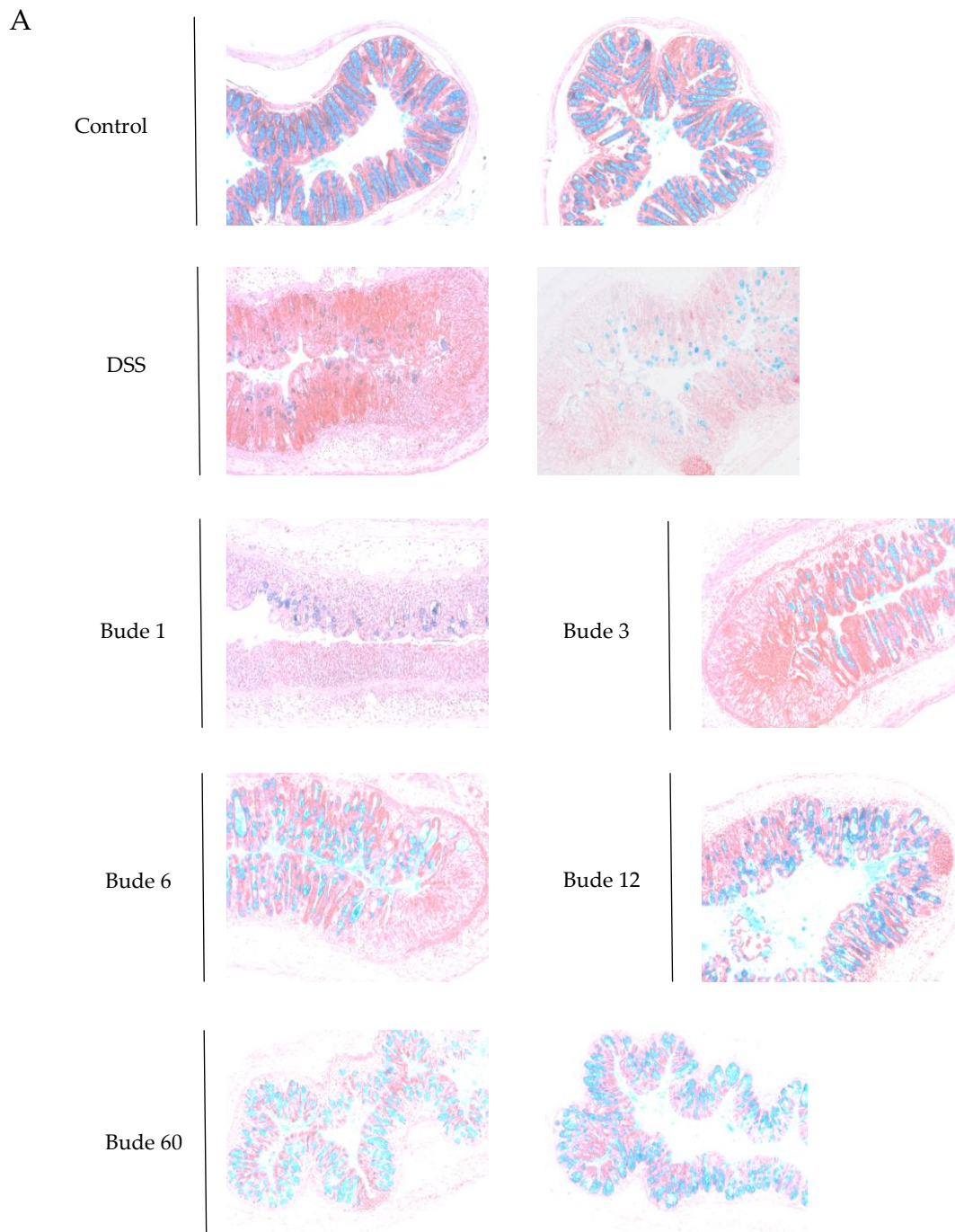
susceptibilidad al modelo en sí. Por tanto, analizamos el estado proliferativo del mismo en nuestras condiciones experimentales mediante la detección del BrdU incorporado en las células epiteliales de la mucosa colónica. Esta se vio lógicamente incrementada en el grupo DSS debido a la conocida respuesta hiperplásica inherente al modelo, fenómeno que resultó inhibido de forma significativa por la budesonida a todas la dosis ensayadas siguiendo un claro patrón de dosis dependencia (Fig.11 A y B). Este resultado se confirmó determinando la expresión de Cyclin D1 en tejido colónico mediante PCR a tiempo real, que se encontró reducida también de forma dosis dependiente (Fig.11 C).

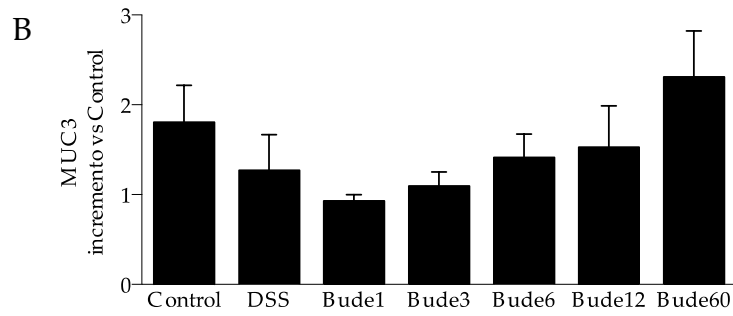


**Figura 11:** Evaluación del estado proliferativo del epitelio intestinal en el modelo de colitis aguda inducida por DSS. (A) Número de células con BrdU incorporado por campo; (B) imágenes representativas de los resultados obtenidos mediante la detección por inmunohistoquímica de las células con BrdU incorporado; (C) expresión génica de Cyclin D1 relativa al grupo Control. Los datos aparecen expresados como media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs Control; \*  $p < 0.05$  vs DSS. Bude=budesonida.

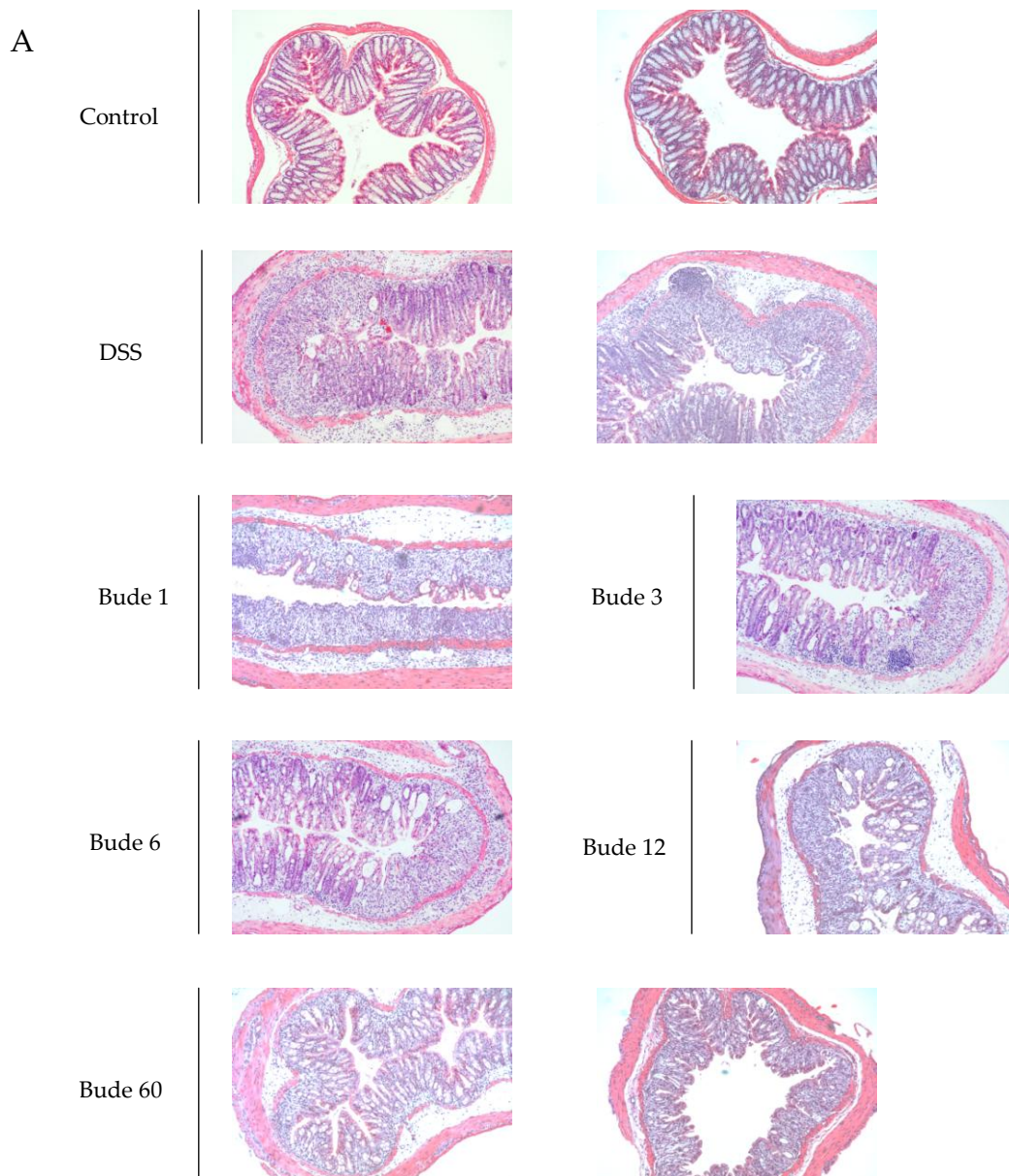
A nivel histológico estimamos oportuno analizar la integridad del glucocálix, el cual está principalmente formado por mucinas que se disponen en la cara apical del epitelio intestinal ejerciendo una contribución positiva a la función de barrera intestinal. Para ello se aplicó una

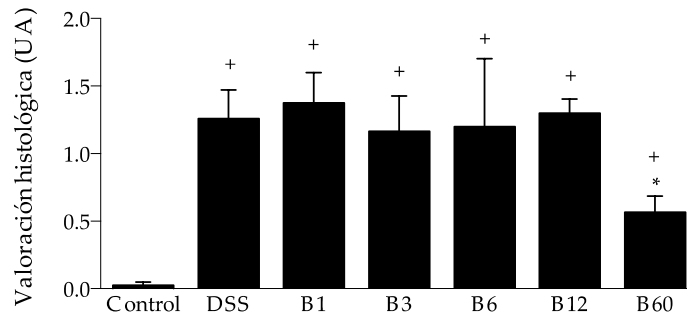
tinción específica (azul alcian) para las mucinas sobre cortes histológicos transversales de tejido colónico, siendo estas mucho menos abundantes en los animales colíticos no tratados y viéndose este fenómeno revertido de un modo dosis-dependiente por la budesonida. Como se puede observar en la figura 12 A, el GC aumenta la presencia de mucinas no solo en las células caliciformes insertadas en la mucosa intestinal, sino también en la propia luz intestinal donde son secretadas. Este efecto fue corroborado mediante la determinación de la expresión de MUC3 por PCR a tiempo real en tejido colónico, a pesar de no alcanzarse diferencias estadísticamente significativas en este último caso (Fig. 12 B).





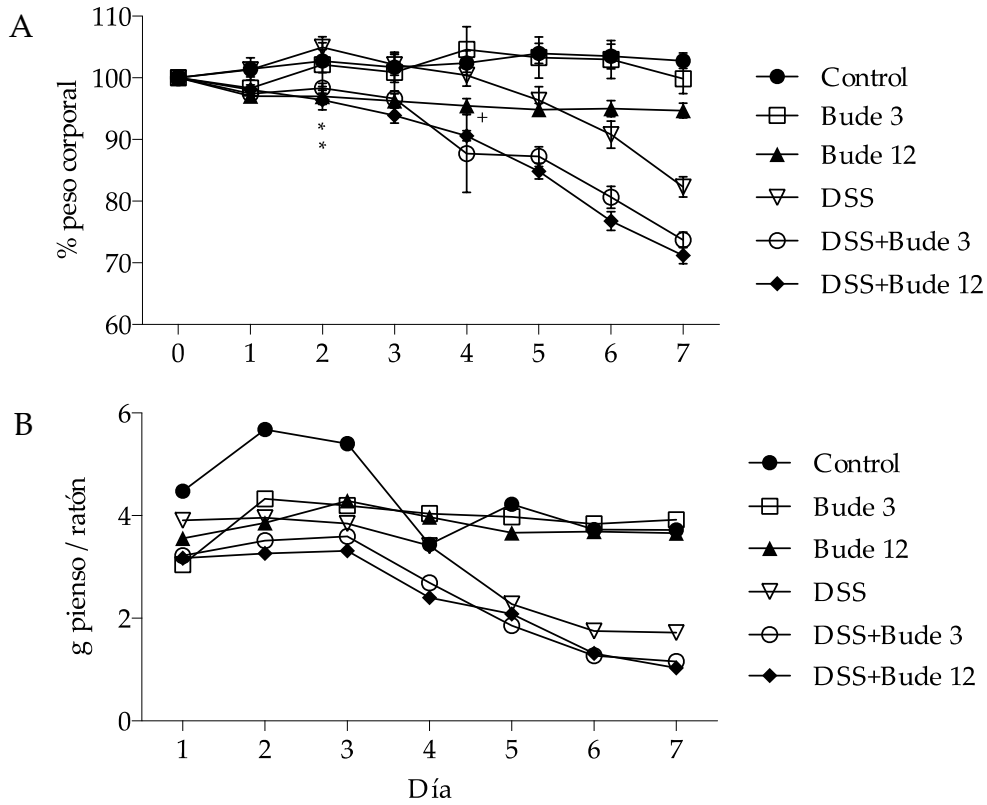
**Figura 12:** Integridad del glucocálix sobre el epitelio intestinal en el modelo de colitis inducida por DSS. (A) Tinción con azul alcian de cortes histológicos transversales de tejido colónico; (B) expresión génica de MUC3 expresada de forma relativa al grupo Control. Los resultados son expresados como media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs Control; \*  $p < 0.05$  vs DSS. Bude=budesonida.



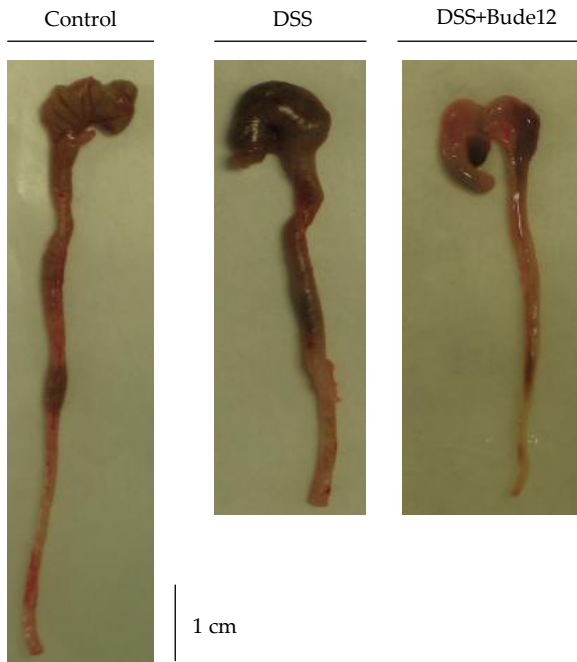


**Figura 13:** Estudio histológico del colon. (A) Imágenes histológicas (10X) de secciones transversales de tejido colónico sometidas a la tinción con hematoxilina & eosina; (B) valoración histológica expresada como media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs Control; \*  $p < 0.05$  vs DSS. Bude=budesonida, UA=unidades arbitrarias.

Con objeto de definir más detalladamente los acontecimientos intestinales y sistémicos que se encuentran detrás del efecto perjudicial de la budesonida sobre la colitis aguda inducida por DSS, así como las alteraciones inducidas por esta a nivel molecular en el tejido intestinal que la justifiquen, se decidió realizar otra aproximación experimental que denominaré **DSS2** y cuya descripción comienza a continuación. Conviene destacar que en DSS2 se ensayó la budesonida a las dosis de 3 y 12  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$ , ya que la de 60  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$  había mostrado significativos efectos sistémicos en el ensayo antes descrito. Además, en este experimento la budesonida se administró paralelamente a animales sanos y colíticos, con la intención de descartar un efecto tóxico de la misma que pudiera aparecer en los ratones de forma independiente de la concomitancia de la inflamación intestinal inducida por DSS. Como se puede observar en la figura 14 A y B, el protocolo experimental es bastante similar al aplicado en DSS1, pero en este caso todos los animales fueron sacrificados en el mismo momento (día 7), al contar ya con mayor conocimiento sobre la evolución de los animales tratados con GC bajo la inflamación inducida por DSS. Como se ha comentado, también se establecieron dos grupos de animales que recibieron budesonida durante 7 días en ausencia de DSS en agua de bebida. La evolución del peso de los animales sanos bajo tratamiento con budesonida refleja un leve descenso del mismo en el grupo Bude12 los primeros días, alcanzando la significancia estadística respecto al Control en el día 4, manteniéndose posteriormente estable en torno al 5% de pérdida de peso hasta el final. Sin embargo, el grupo Bude 3 evoluciona de un modo comparable al Control. En el caso de los animales colíticos, el tratamiento con budesonida volvió a mostrar un efecto negativo sobre la evolución de los animales, tal y como ocurriera en el caso de DSS1. Este se tradujo en una pérdida de peso corporal más temprana y mayor en términos cuantitativos siguiendo un patrón de dosis-dependencia en comparación con el grupo colítico no tratado, la cual alcanzó la significancia estadística para ambos grupos tratados en el día 2 comparado con el grupo colítico control (DSS). El perfil que presenta la gráfica del consumo de pienso a lo largo de la experiencia es lógicamente similar al de la evolución del peso antes descrito. Por tanto, se puede concluir que la budesonida carece de un efecto tóxico inespecífico sobre los animales a las dosis aquí ensayadas, mientras que por otro lado se confirma el impacto perjudicial de tipo dosis-dependiente de la misma sobre la evolución de la colitis aguda inducida por DSS.



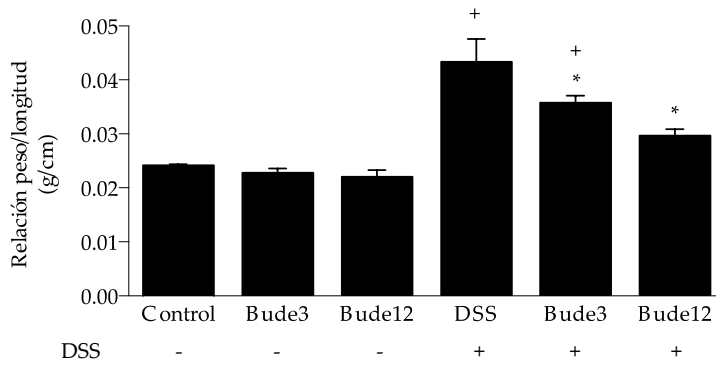
**Figura 14:** Evolución de los animales en el modelo de colitis aguda inducida por DSS. (A) Peso corporal (% de peso inicial); (B) Consumo de pienso (g/ratón/día). Datos expresados como media  $\pm$  SEM en el caso de A. (n=8). + primer día con  $p < 0.05$  para los grupos sanos tratados vs Control, \* primer día con  $p < 0.05$  para los grupos colíticos tratados vs DSS. Bude=budesonida.



**Figura 15:** Alteraciones macroscópicas en el colon de animales sometidos a colitis aguda inducida por DSS. Fotografías del colon en el momento de la necropsia.

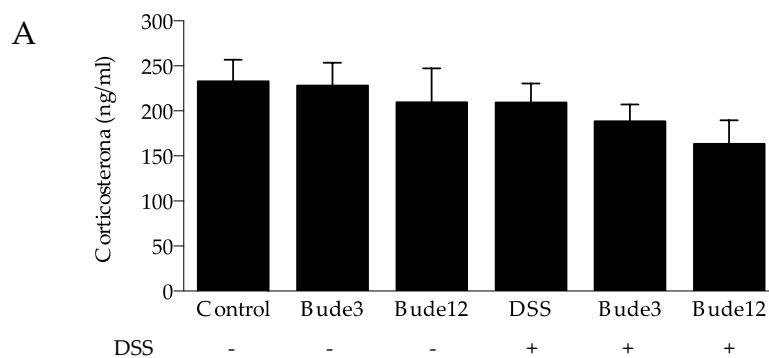
De un modo análogo a lo acontecido en el caso de DSS1, el tratamiento con budesonida presentó un efecto antiinflamatorio consistente que se tradujo en una significativa inhibición del aumento de la relación peso/longitud del colon que muestra el grupo colítico no tratado, mientras

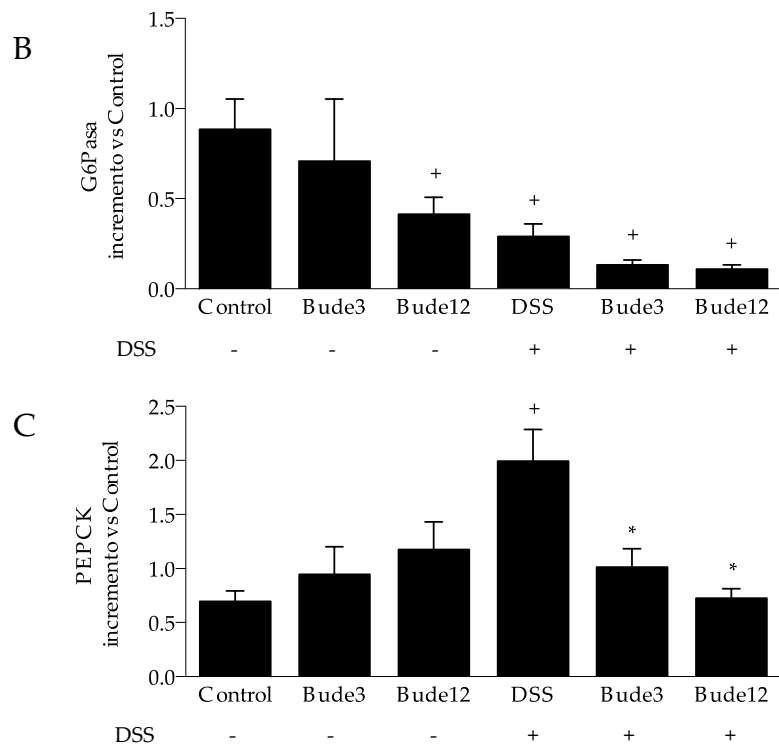
que no produjo afectación alguna en condiciones no inflamatorias (Fig. 16). Como se puede observar en las fotografías de la figura 15, este efecto está relacionado con una reducción de la fibrosis y el peso del segmento intestinal, ya que el acortamiento inducido por la inflamación no se ve afectado por el tratamiento en ningún caso. Además el tratamiento con budesonida produce en el tejido colónico inflamado una extrema delgadez, acompañada de cierta atrofia de la pared intestinal que se traduce en una manifiesta fragilidad.



**Figura 16:** Relación peso/longitud de colon. Datos expresados como media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs Control; \*  $p < 0.05$  vs DSS. Bude=budesonida.

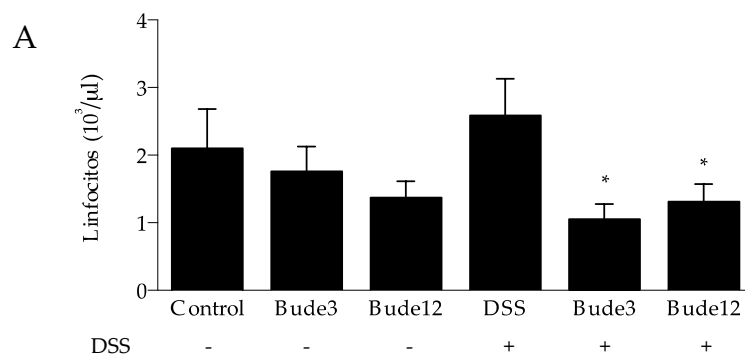
En este experimento nos propusimos corroborar si las dosis de GC empleadas generaban efectos de tipo metabólico debido a una hipotética distribución sistémica significativa del mismo. Para ello se cuantificó la corticosterona en plasma, la glucemia y la expresión en tejido hepático de dos enzimas implicadas en la gluconeogénesis (glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa) y fosfoenol piruvato carboxiquinasa (PEPCK)), la cual se suele ver incrementada por los GC. Tal y como se esperaba atendiendo a las evidencias extraídas de DSS1, la budesonida a las dosis de 3 y 12  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$  independientemente de que se consideren condiciones de inflamación o ausencia de la misma, no afectó significativamente a la actividad del eje HHS, ni elevó la expresión en hígado de las enzimas gluconeogénicas antes citadas, encontrándose paradójicamente un efecto opuesto principalmente en el caso de la G6Pasa, mientras que en la PEPCK ocurrió exclusivamente en condiciones inflamatorias. Estas evidencias apoyan la ausencia de diferencia en cualquier caso, en la glucemia como consecuencia del tratamiento con budesonida en determinaciones realizadas de un modo rutinario tras el sacrificio de los animales (datos no mostrados) (Fig.17 A-C).

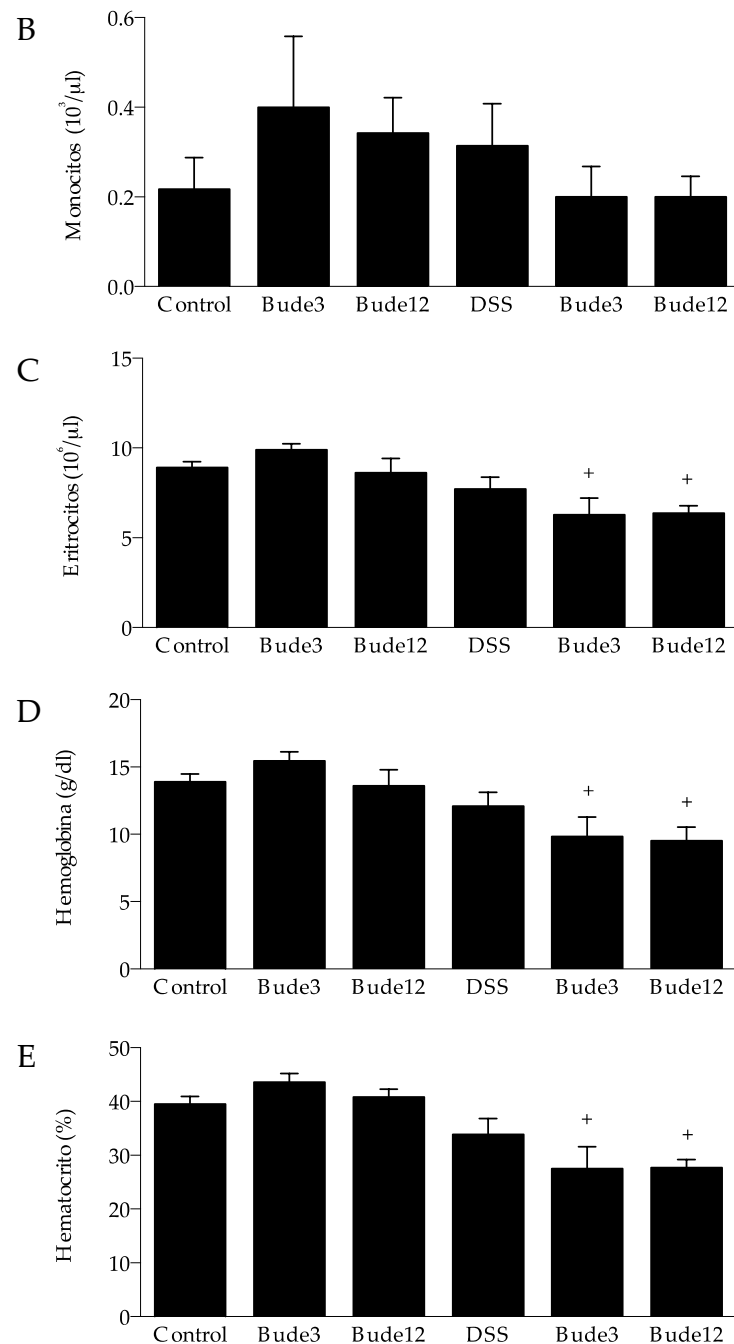




**Figura 17:** Análisis de los efectos sistémicos de la budesonida en ratones sanos y sometidos colitis aguda inducida por DSS. (A) Corticosterona en plasma (ng/ml); (B y C) expresión génica en tejido hepático relativa a Control. Datos expresados como media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs Control; \*  $p < 0.05$  vs DSS. Bude=budesonida.

En este caso también se realizó un estudio hematológico sobre los parámetros analizados en el caso de DSS1. Mientras que la administración del GC a animales sanos no produjo ningún efecto digno de mención, dicha administración sobre los animales colíticos produjo un descenso notorio del número de linfocitos y monocitos circulantes aunque solo se alcanzó la significancia estadística en el primer caso. De forma análoga, la budesonida provocó un descenso en los eritrocitos circulantes, así como en la hemoglobina y el hematocrito, que aunque no alcanzó la significancia estadística respecto al grupo DSS sí lo hizo en comparación con el grupo Control. Estos resultados son totalmente coherentes con los extraídos del experimento anteriormente descrito.



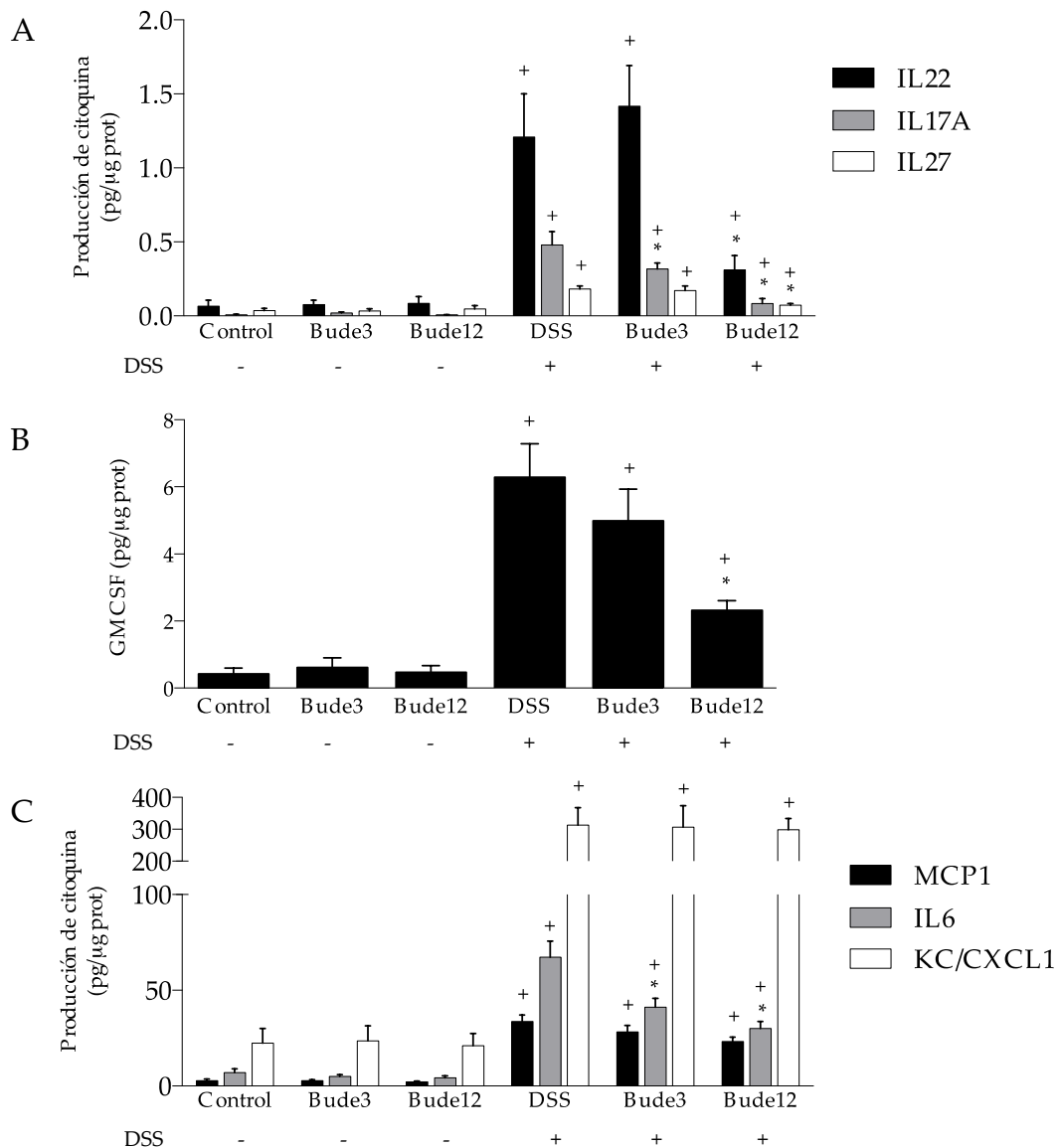


**Figura 18:** Estudio hematológico en sangre extraída el día del sacrificio de los animales. (A) Linfocitos ( $10^3/\mu\text{l}$ ); (B) monocitos ( $10^3/\mu\text{l}$ ); (C) eritrocitos ( $10^6/\mu\text{l}$ ); (D) hemoglobina (g/dl); (E) hematocrito (%). Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs Control; \*  $p < 0.05$  vs DSS. Bude=budesonida.

Mediante el cultivo de fragmentos de tejido colónico *ex vivo* y la posterior determinación de citoquinas en el medio de cultivo utilizado para tal efecto, así como mediante el análisis por PCR a tiempo real de la expresión génica en el propio tejido colónico completo, se evaluó el efecto de la budesonida sobre diferentes citoquinas y quimioquinas clásicamente incrementadas en la colitis inducida por DSS. En este sentido se analizaron aquellas para las que existen evidencias experimentales consistentes que les atribuyen un papel beneficioso sobre la restitución epitelial y la función de barrera físico-inmunológica a nivel intestinal, lo que a su vez determina un impacto



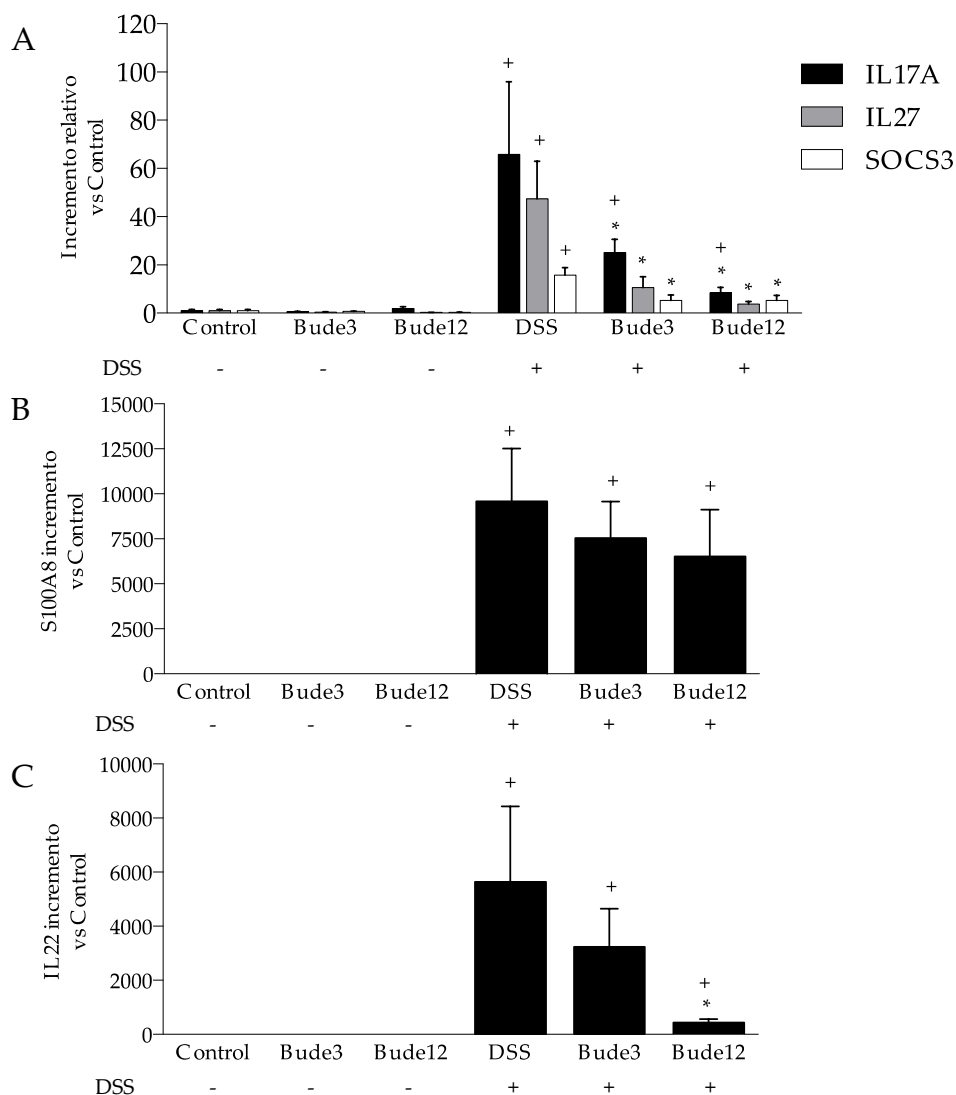
positivo en la evolución de la colitis aguda inducida por DSS. En primer lugar, destacar que la budesonida administrada a animales sanos no produjo efecto alguno sobre la producción de citoquinas por parte de explantes de tejido colónico (Fig.19 A-C). En cambio, en condiciones inflamatorias se produjo un aumento de la liberación de todas las citoquinas ensayadas respecto al control, fenómeno que fue reducido de forma estadísticamente significativa por ambas dosis de budesonida si consideramos la IL17A y la IL6. En el caso de IL22, IL27 y GMCSF, solo en el grupo Bude 12 se alcanzó la significancia estadística para dicho efecto inhibitorio, mientras que la administración de budesonida no ejerció efecto alguno sobre la producción de las quimioquinas MCP1 y KC/CXCL1 (Fig.19 A-C).



**Figura 19:** Producción de citoquinas y quimioquinas por parte de explantes de tejido colónico obtenidos de ratones sanos y sometidos a colitis aguda inducida por DSS. (A) IL22, IL17A e IL27; (B) GMCSF; (C) MCP1, IL6 y KC/CXCL1. Los resultados son expresados en pg de citoquina/μg de proteína del explante y en forma de media ± SEM. + p<0.05 vs Control; \* p<0.05 vs DSS. Bude=budesonida.

Como se ha comentado anteriormente, el estudio del estado inflamatorio del colon de los animales incluidos en el experimento denominado DSS2, fue completado mediante PCR a tiempo

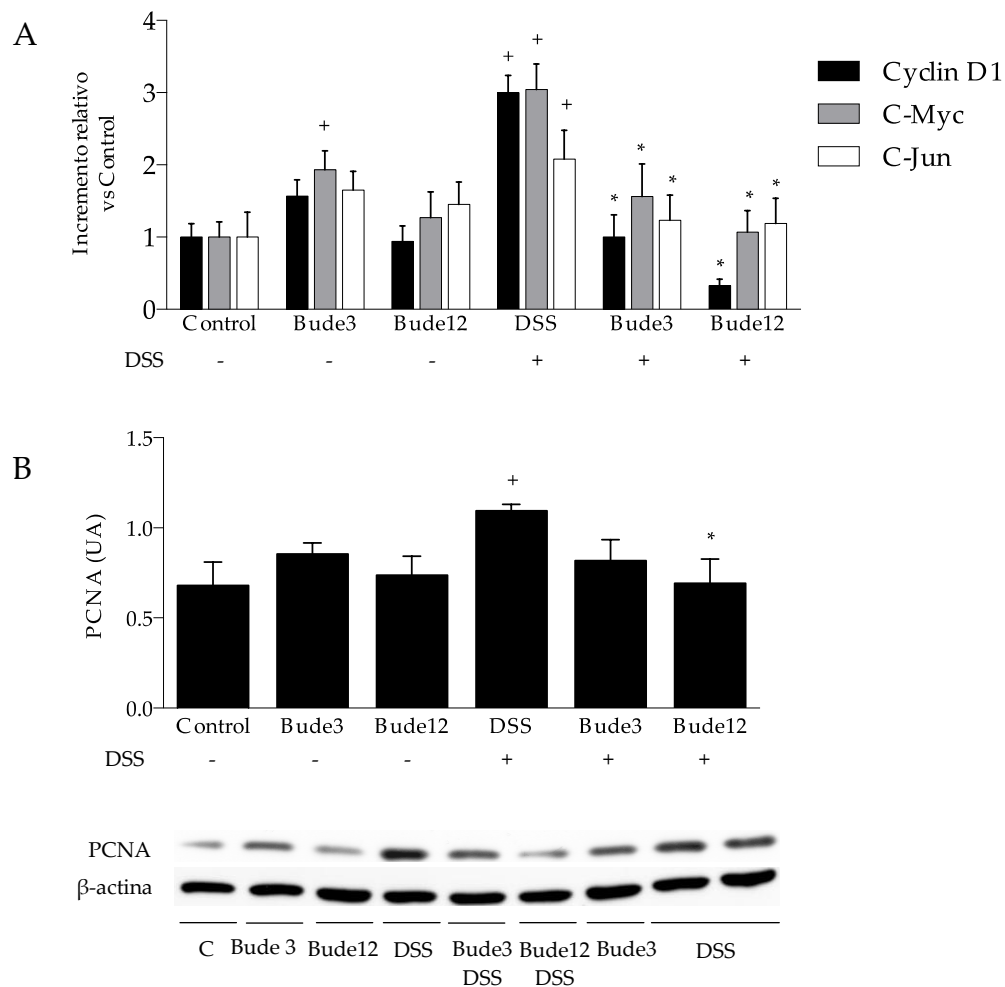
real. Este análisis arrojó resultados comparables a los descritos en la figura 19, produciéndose un aumento estadísticamente significativo en el grupo colítico no tratado de la expresión de las citoquinas IL22, IL27 e IL17A, así como de la proteína reguladora SOCS3 (cuyo gen es diana para el factor de transcripción STAT3) y de la alarmina S100A8 (Fig. 20 A-C). La administración de budesonida no generó ninguna modulación significativa sobre la expresión de estas proteínas en el tejido colónico de los animales sanos, mientras que las dos dosis ensayadas redujeron de forma notable la expresión de IL17A, IL27 y SOCS3 en los animales colíticos, aunque haciendo referencia sobre la expresión de IL22 solo ocurrió lo propio en el grupo Bude12 (Fig 20 A y C). Finalmente, la budesonida a las dos dosis ensayadas fue incapaz de reducir significativamente la expresión de S100A8 en comparación con el grupo colítico control (Fig. 20 B).



**Figura 20:** Expresión génica de diversos marcadores inflamatorios en tejido colónico de ratones sanos y sometidos a colitis aguda inducida por DSS. (A) IL17A, IL27 y SOCS3; (B) S100A8; (C) IL22. Los resultados son expresados como incremento relativo tomando como referencia el grupo Control, y como media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs Control; \*  $p < 0.05$  vs DSS. Bude=budesonida.

Atendiendo a los indicios que se pueden extraer de DSS1 acerca de un significativo efecto inhibitor de la budesonida sobre la hiperplasia que aparece en el epitelio intestinal de los animales

colíticos en este modelo, la cual no es más que una respuesta fisiológica que trata de conseguir la restitución de la barrera epitelial distorsionada por el efecto directo del DSS sobre las células madre de las criptas intestinales, se decidió analizar también este extremo en este enfoque experimental. En este sentido, se cuantificó la expresión génica relativa de Cyclin D1, C-Myc y C-Jun, encontrándose lógicamente un incremento de su expresión en los animales colíticos en comparación con el grupo Control. La budesonida por su parte, no produjo cambios sobre dicha expresión al ser administrada a animales sanos, mientras que en consonancia con los hallazgos obtenidos en DSS1 redujo la expresión de los tres genes antes citados en condiciones inflamatorias (Fig. 21 A).

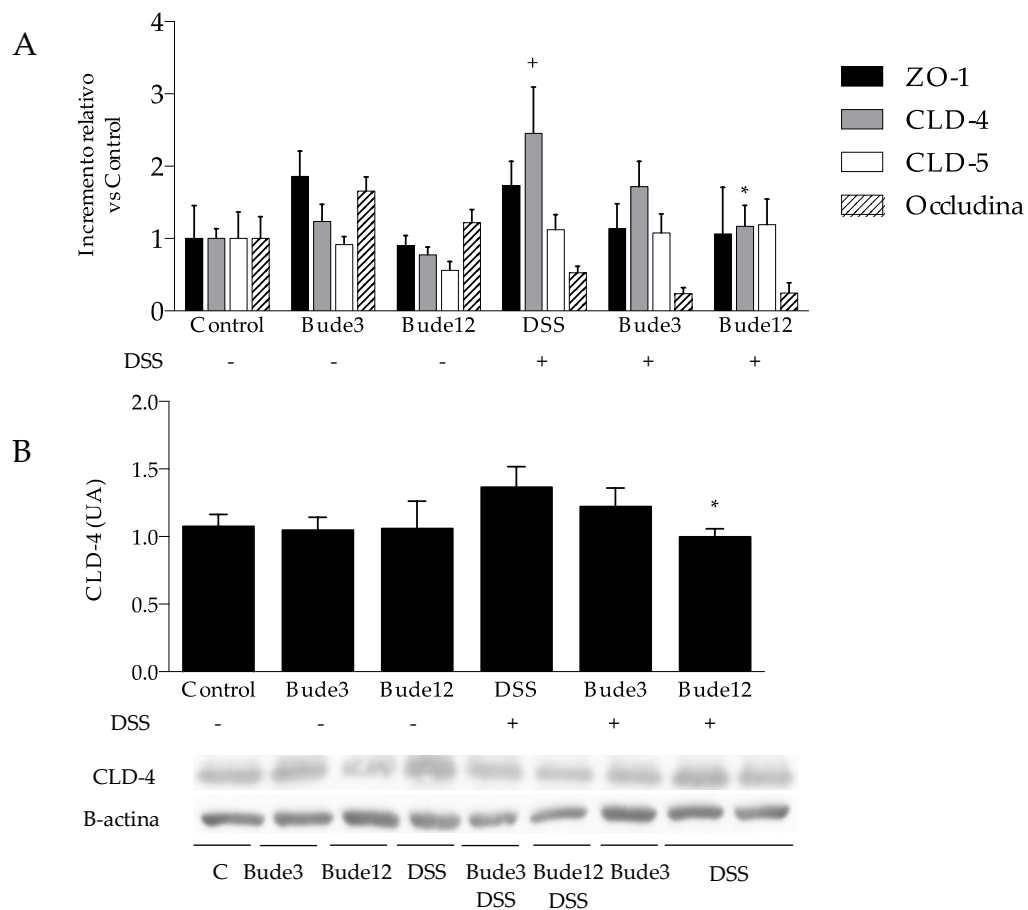


**Figura 21:** Expresión génica y proteica de marcadores de proliferación celular en tejido intestinal. (A) Expresión génica en tejido colónico completo de Cyclin D1, C-Myc y C-Jun en comparación con el grupo Control; (B) Expresión proteica de PCNA en células epiteliales aisladas de intestino delgado (UA). Los resultados están expresados en forma de media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs Control; \*  $p < 0.05$  vs DSS. Bude=budesonida, UA=unidades arbitrarias, C=control.

Con objeto de corroborar este efecto antiproliferativo intestinal de la budesonida, se analizó mediante Western Blot la expresión proteica del antígeno de proliferación nuclear (PCNA) en una muestra de células epiteliales intestinales purificadas del intestino delgado de los animales objeto de estudio. Como se puede observar en la figura 21 B, este resultado muestra un perfil muy similar al de la figura 21 A, apareciendo de nuevo un efecto inhibitorio de la proliferación celular por parte

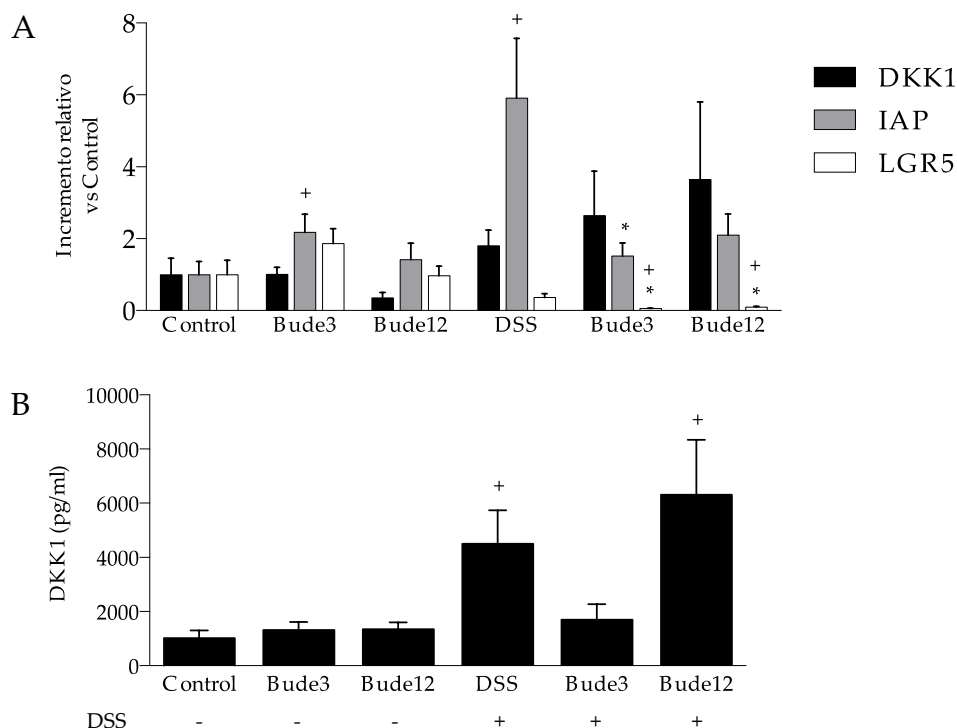
de ambas dosis de budesonida, el cual alcanza la significancia estadística en comparación con el grupo colítico no tratado únicamente en la dosis de 12 µg/ratón/día.

Además evaluamos la posible afectación de la expresión de algunas de las proteínas directamente implicadas en la integridad de las uniones estrechas. En este sentido, se analizó la expresión génica de ZO-1, CLD-4, CLD-5 y ocludina en tejido colónico completo. En este sentido no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ni alguna tendencia más o menos consistente en ningún caso excepto para la CLD-4, la cual paradójicamente vió incrementada su expresión en el grupo colítico no tratado, fenómeno que fue revertido de un modo dosis-dependiente por el GC alcanzando la significancia estadística en el caso del grupo Bude12 (Fig. 22 A). Por esta razón, decidimos evaluar si este fenómeno aparecía igualmente a nivel de expresión proteica, extremo que fue corroborado atendiendo a los resultados mostrados en la figura 22 B que hacen referencia al análisis mediante Western Blot de la expresión de CLD-4 en células epiteliales intestinales aisladas de intestino delgado.



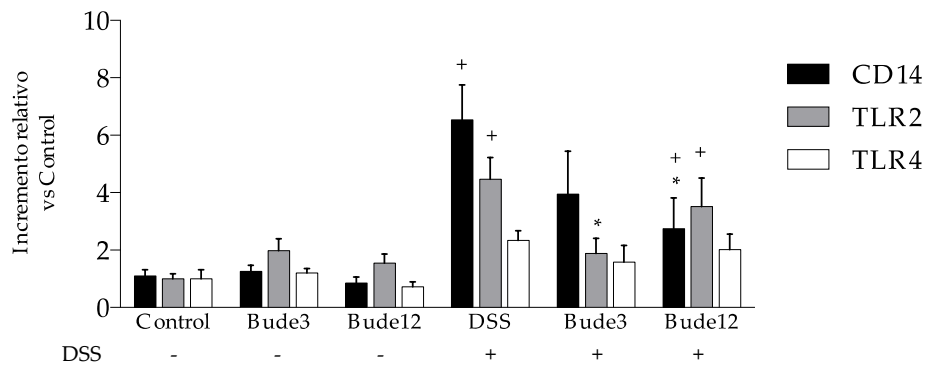
**Figura 22:** Expresión génica y proteica de componentes relevantes en las uniones estrechas del epitelio intestinal. (A) Expresión génica de ZO-1, CLD-4, CLD-5 y ocludina en tejido colónico completo, expresados como incremento relativo respecto al grupo Control; (B) expresión proteica de CLD-4 analizada por Western Blot en células epiteliales intestinales aisladas de intestino delgado. Los resultados son expresados como media ± SEM. + p<0.05 vs Control; \* p<0.05 vs DSS. Bude=budesonida, UA=unidades arbitrarias, C=control.

Asimismo, en este experimento se estudió la posible modulación que los GC en general y la budesonida en particular, pudiera ejercer sobre la funcionalidad de la cascada de señalización del factor de transcripción  $\beta$ -Catenina. Resultados obtenidos de un *microarray* llevado a cabo por el grupo de investigación al que pertenezco, mostraron un incremento asociado a la budesonida de la expresión del inhibidor soluble DKK1 de los receptores tipo LRP de alrededor de 3 veces. Este fenómeno unido a algunos de los efectos descritos para los GC sobre el tejido óseo, nos hizo considerar la posibilidad de que la budesonida pudiera modular negativamente el funcionamiento de dicha ruta de señalización. Por tanto, se analizó la expresión génica en tejido colónico completo de DKK1, la cual no se vió modificada por el GC en los animales sanos, aumentó como consecuencia del proceso inflamatorio y aunque no alcanzó significancia estadística apareció una cierta tendencia a agudizarse dicho aumento en los grupos colíticos expuestos a budesonida. Además, se evaluó la expresión del gen codificante para la fosfatasa alcalina intestinal (IAP) y para el LGR5 que son clásicos genes diana para el factor de transcripción  $\beta$ -Catenina. Aunque su modulación exclusivamente por la inflamación fue paradójicamente diferente, en ambos casos la administración de budesonida en los animales colíticos redujo significativamente su expresión (Fig. 23 A). Con la intención de confirmar las tendencias arriba descritas, se cuantificó mediante ELISA la presencia de DKK1 en plasma, observándose el lógico aumento de la misma asociado al modelo inflamatorio. La budesonida por su parte, solo a la dosis de 12  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$  produjo un incremento significativo de la presencia de dicha proteína por encima del grupo control colítico que en cualquier caso anduvo lejos de la significancia estadística, mientras que en el grupo Bude 3 incluso se observó un descenso de la misma (Fig.23 B).



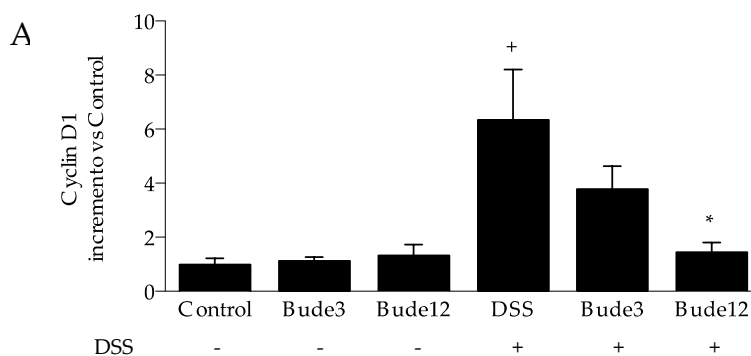
**Figura 23:** Efecto de la budesonida sobre la cascada de señalización de la  $\beta$ -Catenina *in vivo*. (A) Expresión génica en tejido colónico completo de DKK1, IAP y LGR5, expresado como incremento relativo respecto al grupo Control; (B) Cuantificación de DKK1 en plasma mediante ELISA, expresado en pg/ml. Los resultados aparecen representados como media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs Control; \*  $p < 0.05$  vs DSS. Bude=budesonida.

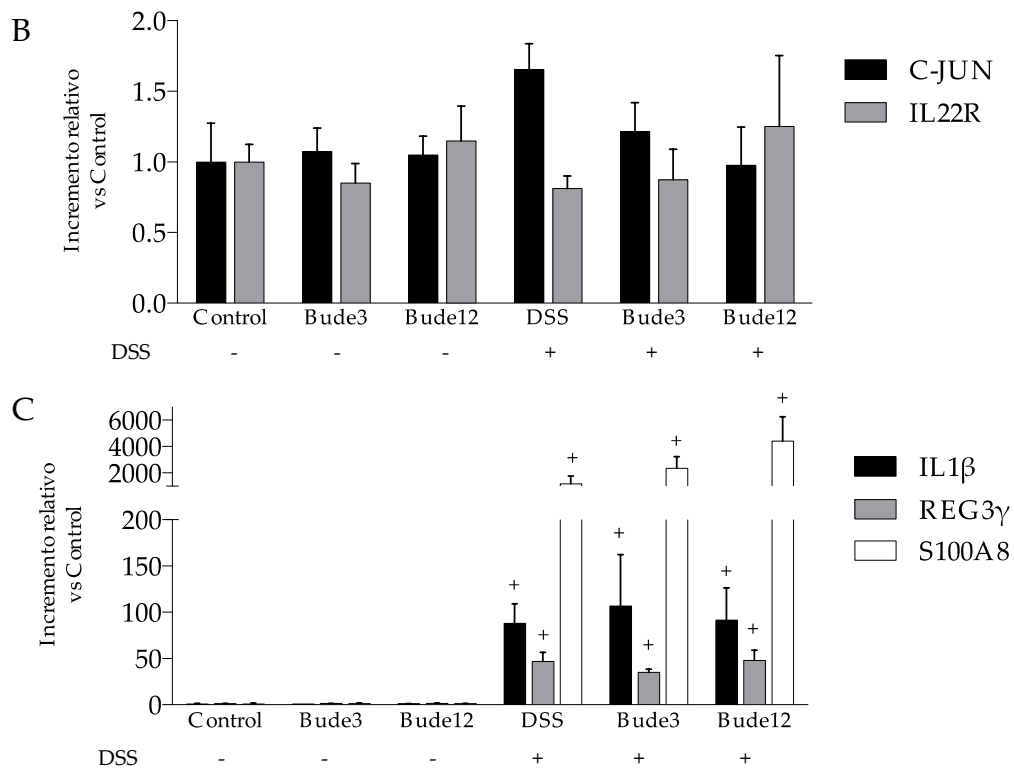
Por otro lado, se analizó la expresión de otros genes codificantes para proteínas de reconocida relevancia en la vertiente innata del sistema inmunitario intestinal, destacando los receptores tipo PRR pertenecientes a la familia de los TLR, TLR2 y TLR4, así como la proteína accesoria de este último denominada CD14. En consonancia con los resultados mostrados en bibliografía [634, 787, 841], la administración de budesonida en animales sanos aumentó ligeramente la expresión de TLR2 aunque sin alcanzar significancia estadística. Sin embargo, no ocurrió lo propio con ninguno de los otros dos genes testados. Asociado a la inflamación intestinal se produjo un incremento de la expresión de TLR2 y CD14, el cual se vió dramáticamente reducido por la budesonida de un modo no dependiente de la dosis administrada (Fig 24).



**Figura 24:** Expresión génica en tejido colónico completo de PRR implicados en la inmunidad innata intestinal. Los resultados se expresan en forma de incremento relativo al grupo Control, y como media ± SEM. + p<0.05 vs Control; \* p<0.05 vs DSS. Bude=budesonida.

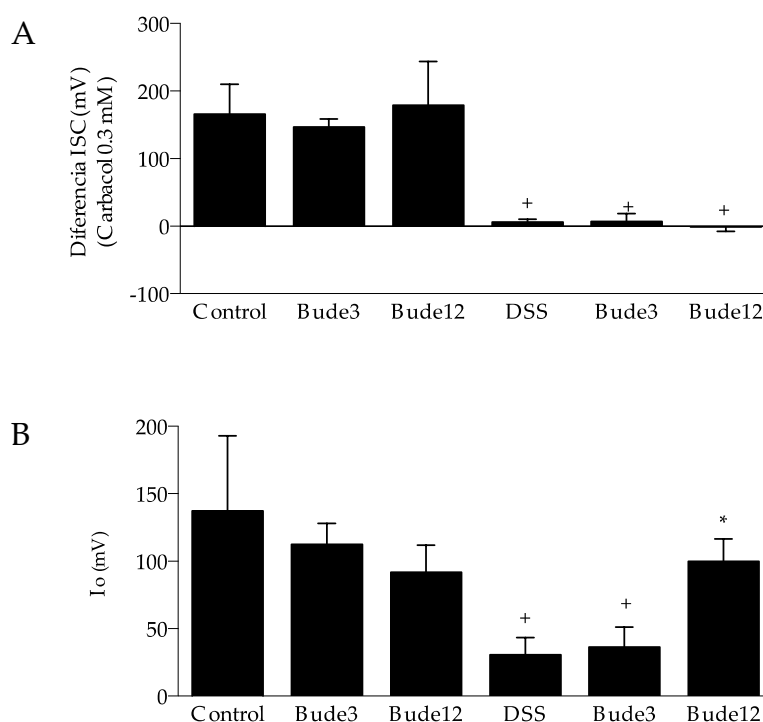
Finalmente, se analizó en células epiteliales colónicas aisladas mediante PCR a tiempo real la expresión de algunos genes relevantes en la biología de las mismas, especialmente en su función de barrera físico-inmunológica. De este modo, se observó como el efecto antes descrito de la budesonida en condiciones inflamatorias sobre Cyclin D1 que fue obtenido al analizar una muestra de tejido colónico completo, aparece de un modo si cabe más notorio al hacer lo propio con las células epiteliales colónicas aisladas, lo que implica que estas son las principales responsables del efecto reflejado en el resultado anterior (Fig. 25 A). Dicho efecto inhibitor sobre la proliferación celular se vió también reflejado en la expresión de C-Jun, aunque en este caso no se alcanzó la significancia estadística (Fig 25 B). Además, tampoco se alcanzó dicha significancia en el análisis de la expresión de REG3γ, IL1β y S100A8, al comparar el grupo control colítico con aquellos inflamados que recibieron budesonida, si bien se observó un marcado incremento de los tres considerando el proceso inflamatorio de forma exclusiva (Fig. 25 B).





**Figura 25:** Análisis mediante PCR a tiempo real de la expresión génica relativa al grupo Control en muestras de células epiteliales colónicas aisladas. (A) Cyclin D1; (B) C-Jun y receptor de IL22 (IL22R); (C) IL1 $\beta$ , REG3 $\gamma$  y S100A8. Los resultados se expresan como incremento respecto al Control y en forma de media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs Control; \*  $p < 0.05$  vs DSS. Bude=budesonida.

Alcanzado este punto, teníamos razones para considerar al menos como una posibilidad plausible que la budesonida administrada sobre los animales colíticos generara una significativa atenuación sobre la función de barrera epitelial. Desde el punto de vista de la vertiente estrictamente inmunológica de esta última ya contábamos con resultados consistentes, pero con objeto de conocer la posible afectación que pudiera sufrir la función de barrera intestinal especialmente en condiciones inflamatorias desde un punto de vista meramente físico, se analizó la permeabilidad *ex vivo* a FITC-dextrano (4 Kda) de fragmentos de tejido colónico completo montados en cámara de Ussing. Todos los animales incluidos en el experimento DSS2 recibieron el análisis de su estado funcional en términos de transporte iónico electrogénico, observándose unos valores de *I<sub>sc</sub>* basal tras el pertinente período de estabilización que no se vieron afectados por el GC en condiciones basales mientras que fueron radicalmente reducidos por la inflamación, fenómeno que fue revertido por la budesonida de un modo dosis-dependiente (Fig. 26 A). Evidencias obtenidas por nuestro grupo de investigación y otros, indican que de forma inherente a la inflamación intestinal se produce un bloqueo de los procesos tanto de secreción como de absorción iónica intestinal, por lo que no es sorprendente que el GC por su acción antiinflamatoria y estimuladora directa de la absorción, contribuya a revertir esa situación. Además se evaluó la respuesta del tejido a la estimulación con un secretagogo como el carbacol a concentración elevada (0.3 mM). En consonancia con el concepto anteriormente expuesto, los fragmentos colónicos obtenidos de animales colíticos no tratados no respondieron a dicho estímulo, situación que en este caso la budesonida fue incapaz de modificar (Fig. 26 B).



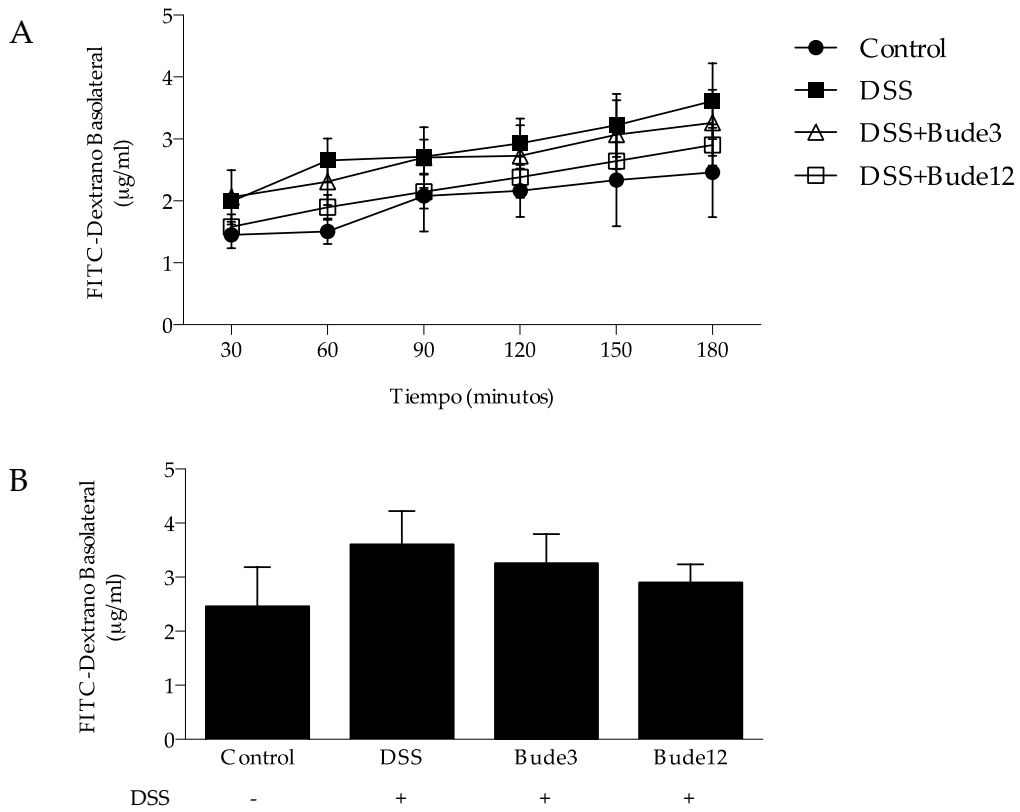
**Figura 26:** Evaluación del transporte iónico electrogénico en fragmentos de tejido colónico montados en cámara de Ussing. (A) Corriente de cortocircuito (Isc) basal (mV); (B) modificación del valor de Isc tras la adición de carbacol 0.3mM (mV). Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs Control; \*  $p < 0.05$  vs DSS. Bude=budesonida.

Atendiendo a los resultados obtenidos hasta el momento del sacrificio de los animales incluidos en el experimento DSS2, decidimos aplicar el ensayo de permeabilidad a FITC-dextrano (4 KDa) únicamente a aquellos animales bajo condiciones inflamatorias tomando como referencia el grupo control no colítico. Los resultados representados en las figuras 27 A y B, muestran una acumulación del reactivo en el reservorio basolateral consecuencia de su difusión a través del tejido en todos los casos. En consonancia con la bibliografía existente al respecto, se produjo una mayor acumulación en el caso del grupo DSS en comparación con el grupo Control, mientras que por su parte la administración de budesonida sorprendentemente generó una tendencia hacia una menor acumulación del reactivo aunque esta no alcanzó la significancia estadística para ninguna de las dos dosis ensayadas.

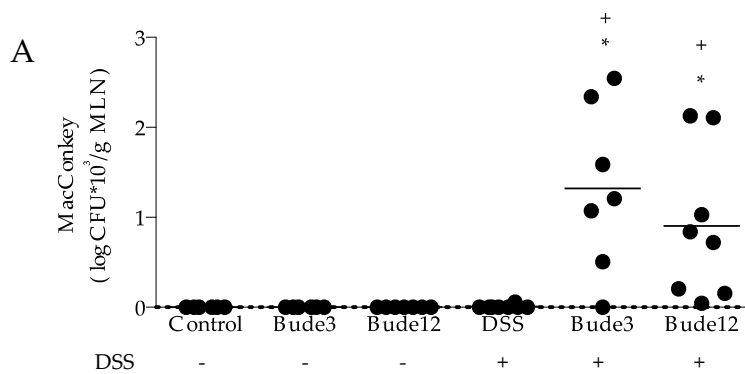
En el experimento DSS1 se obtuvieron evidencias consistentes que apuntaban hacia la septicemia como el evento sistémico secundario al efecto de la budesonida a nivel intestinal, responsable del incremento de la mortalidad en los animales colíticos que recibieron el GC. Por esa razón, en este caso se realizó un estudio más exhaustivo sobre la función de barrera intestinal, su competencia en la contención de la carga bacteriana en la luz intestinal y los marcadores sistémicos asociados a la sepsis experimental. En este sentido, se evaluó la posible translocación de bacterias de la luz intestinal a tejidos extraintestinales del entorno mesentérico mediante la detección de la presencia de bacterias aerobias y anaerobias viables en los MLN y aerobias exclusivamente en el hígado. Estas, como se esperaba, resultaron prácticamente indetectables en los grupos sanos independientemente de que recibieran o no budesonida. Por otro lado, en los grupos colíticos se detectaron de forma meramente esporádica en el grupo no tratado mientras que la administración

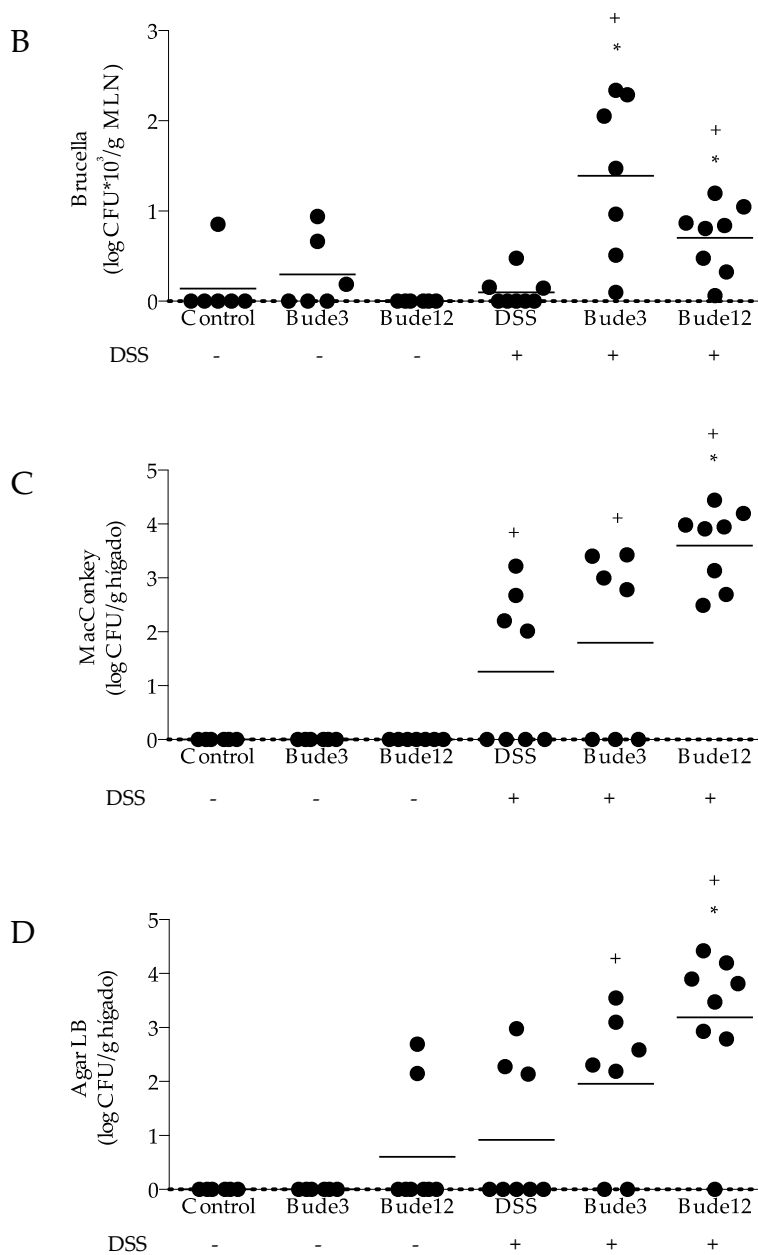


del GC produjo un drástico incremento de las mismas en ambos órganos. Curiosamente, mientras que en el caso de los MLN las bacterias fueron algo más abundantes en el grupo Bude3 que en el tratado con la mayor dosis de GC, en hígado el incremento de la detección de bacterias asociado al tratamiento en los animales colícticos se ajustó a un perfil dosis-dependiente, alcanzando en este caso la significancia estadística exclusivamente el grupo Bude12 al compararlo con el colíctico no tratado (Fig. 28 A-D).



**Figura 27:** Permeabilidad *ex vivo* de fragmentos de tejido colónico completo ensayada en cámara de Ussing. (A) Acumulación de FITC-dextrano (4 KDa) en el reservorio basolateral durante las 3 horas de exposición (µg/ml); (B) Concentración de FITC-dextrano en el reservorio basolateral en el punto final del experimento (3 horas). Los resultados se expresan como media ± SEM. + p<0.05 vs Control; \* p<0.05 vs DSS. Bude=budesonida.

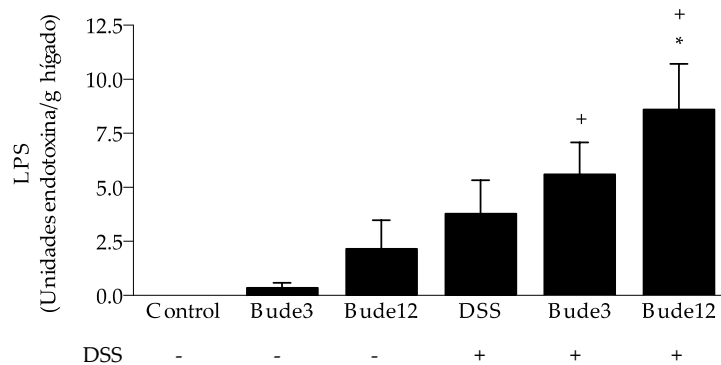




**Figura 28:** Estudio de la presencia de bacterias viables aerobias y anaerobias en MLN e hígado. (A) Bacterias aerobias presentes en MLN cultivadas en un medio selectivo para enterobacterias (Agar MacConkey) (log CFU\*10<sup>3</sup>/g MLN); (B) bacterias anaerobias presentes en MLN cultivadas en un medio agar sangre comercial enriquecido que será denominado como Brucella (log CFU\*10<sup>3</sup>/g MLN); (C) bacterias aerobias presentes en hígado cultivadas en agar MacConkey (log CFU/g hígado); (D) bacterias aerobias presentes en hígado cultivadas en agar LB (log CFU/g hígado). Los resultados son presentados como la media de cada grupo, apareciendo asimismo representado el valor individual de cada animal. + p<0.05 vs Control; \* p<0.05 vs DSS. Bude=budesonida.

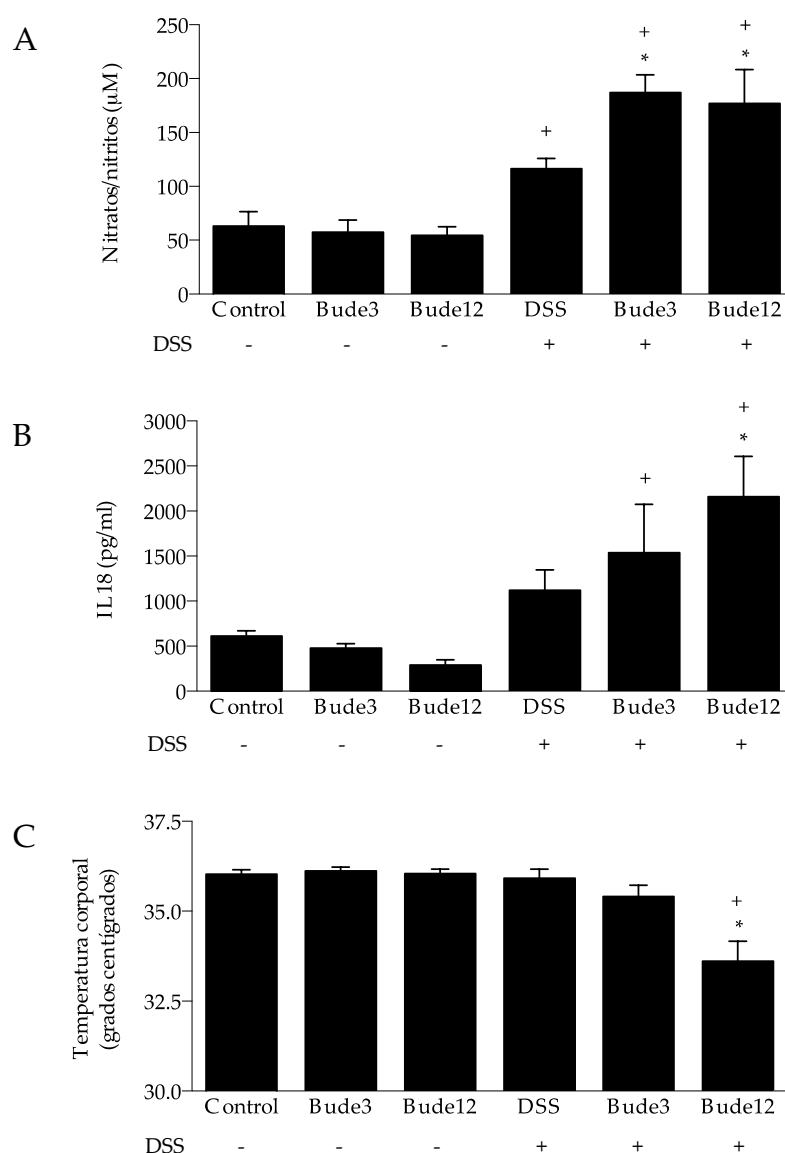
En el homogenado de hígado utilizado para la detección de bacterias arriba representada, se determinó la presencia de LPS mediante un método estandarizado denominado ensayo LAL (*lymulus ameocyte lysate*). De forma congruente con el aumento de la translocación bacteriana inducido por la budesonida en los animales colícticos reflejado en la figura 28, se produjo un

aumento de la presencia de LPS en hígado en dichos animales siguiendo un patrón dosis-dependiente, por encima de la ya generada por la inflamación intestinal *per se* (Fig. 29). A pesar de no observarse translocación bacteriana detectable en los animales sanos que recibieron budesonida, en la figura 29 sorprendentemente se puede intuir una clara tendencia hacia una mayor presencia de LPS en el hígado de aquellos animales que recibieron el GC a pesar de no alcanzar significancia desde el punto de vista estadístico.



**Figura 29:** Cuantificación del LPS presente en hígado. Los resultados están expresados como unidades de endotoxina/g de hígado y en forma de media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs Control; \*  $p < 0.05$  vs DSS. Bude=budesonida.

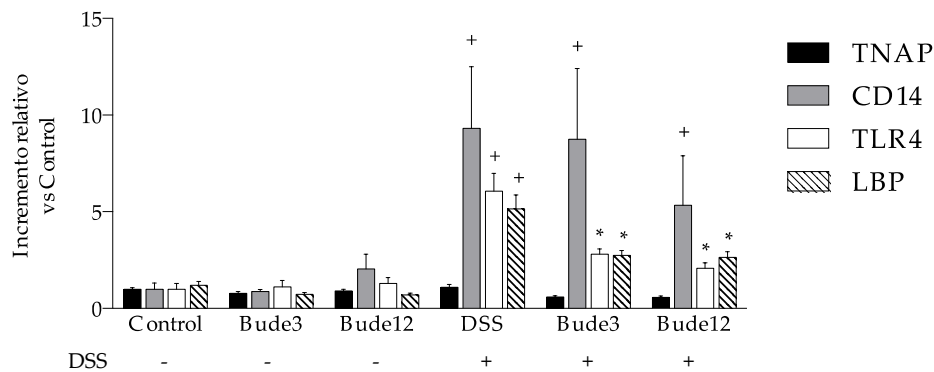
De forma análoga al análisis realizado sobre DSS1, aquí también evaluamos diferentes parámetros a nivel sistémico inherentes a la septicemia. En primer lugar, determinamos la presencia de nitratos/nitritos en plasma, obteniendo un resultado básicamente comparable al obtenido en DSS1, ya que detectamos un incremento de su concentración plasmática en los grupos colíticos tratados con budesonida en comparación con el colítico control (Fig 30 A). Además, en este caso se cuantificó la IL18 en plasma, al ser esta probablemente la citoquina más representativa de la denominada “tormenta de citoquinas” que se desencadena de forma asociada a la sepsis inducida a nivel experimental [842]. De forma coherente con la anterior determinación, la administración de budesonida sobre animales sanos no generó efecto alguno, mientras que en los animales colíticos produjo un incremento de tipo dosis-dependiente de la concentración de IL18 que alcanzó la significancia únicamente en el grupo Bude 12 que presentó un aumento de aproximadamente 2 veces respecto al grupo DSS (Fig 30 B). Uno de los parámetros que se encuentran clásicamente modificados en los modelos experimentales de sepsis en roedores es la temperatura corporal, la cual se ve drásticamente reducida probablemente por la hipoperfusión periférica que acontece en dichas condiciones experimentales. Como se puede comprobar en la figura 30 C, nuestros resultados en este sentido se compadecen perfectamente con los anteriormente expuestos, al producirse un descenso de la temperatura corporal consistente especialmente en el caso del grupo colítico que recibió la dosis de 12  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$ .



**Figura 30:** Evaluación de parámetros sistémicos asociados a la septicemia. (A) Concentración de nitratos/nitritos en plasma ( $\mu\text{M}$ ); (B) concentración de IL18 en plasma ( $\text{pg/ml}$ ); (C) temperatura corporal en grados centígrados. Los resultados son expresados en forma de media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs Control; \*  $p < 0.05$  vs DSS. Bude=budesonida.

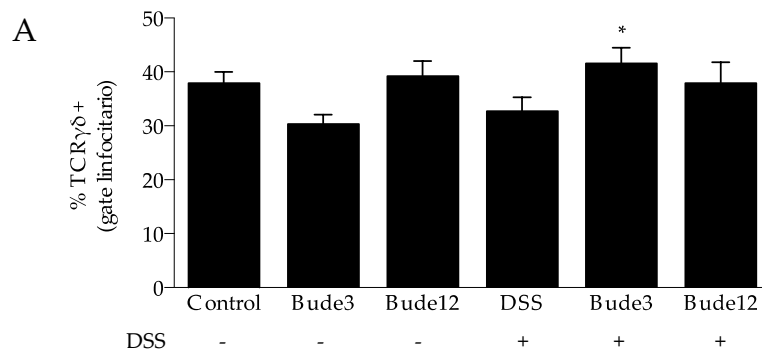
Dado que los resultados expuestos arriba ponen claramente de manifiesto la translocación de bacterias de la luz intestinal y sus componentes antigénicos hasta el hígado en los animales colíticos que recibieron budesonida durante la inducción del proceso inflamatorio, decidimos estudiar los efectos que el GC en sí mismo y el flujo de antígenos bacterianos podía tener sobre el tejido hepático. Como se observa en la figura 31, en estas condiciones experimentales no se produjo modificación de la expresión de TNAP, mientras que los genes codificantes para CD14, TLR4 y *LPS-binding protein* (LBP) vieron incrementada su expresión como consecuencia del proceso inflamatorio intestinal, probablemente por el aumento de la llegada de LPS y/o bacterias completas. Por su parte, la administración de budesonida en dichos animales generó un descenso de la expresión de los tres genes en comparación con el grupo DSS, probablemente por una

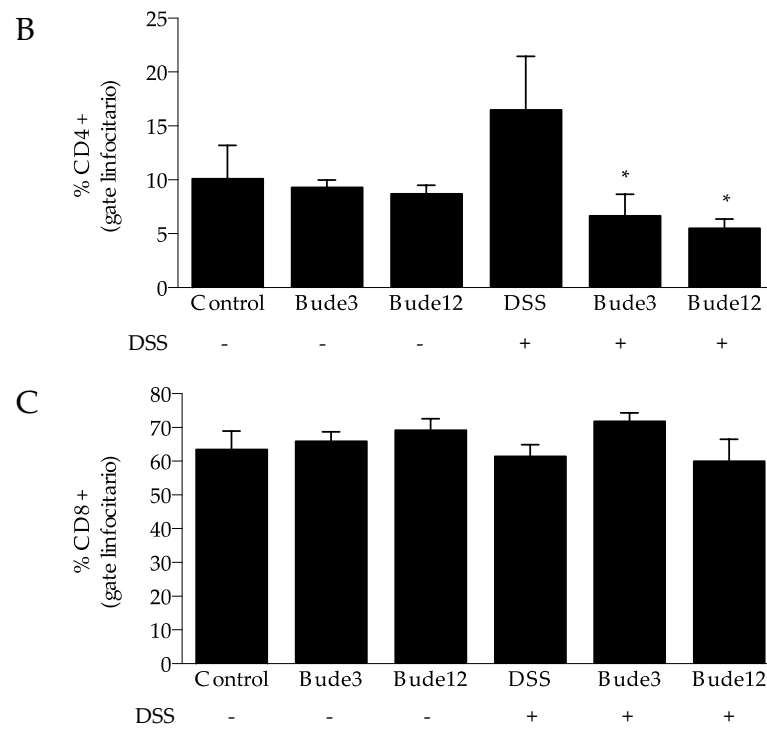
combinación del efecto directo del GC con el de la masiva llegada de bacterias y PAMP de origen comensal, secundario a la administración del GC.



**Figura 31:** Expresión génica relacionada con el metabolismo del LPS en el tejido hepático y su modificación por la inflamación y la budesonida. Los resultados se expresan como incremento relativo respecto al grupo Control y en forma de media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs Control; \*  $p < 0.05$  vs DSS. Bude=budesonida.

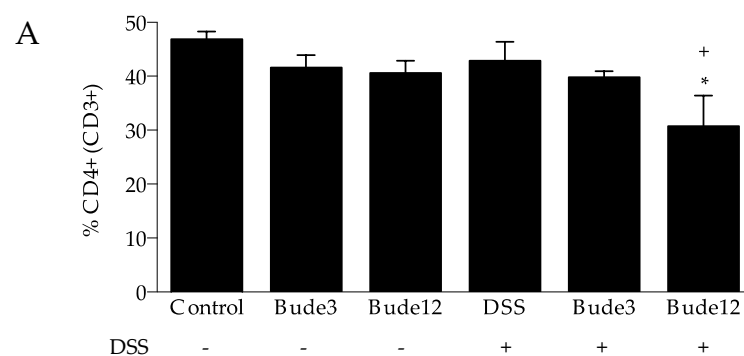
En este experimento se realizó a nivel de la mucosa intestinal en sí misma, así como en órganos linfoides del entorno mesentérico, un análisis más exhaustivo mediante citometría de flujo de algunas poblaciones linfocitarias funcionalmente relevantes en la colitis inducida por DSS. En primer lugar, se evaluó la abundancia relativa de los linfocitos T TCR  $\gamma\delta+$ , así como de aquellos CD4+ y CD8+, dentro de los linfocitos intraepiteliales (IEL) aislados del tejido colónico mediante un proceso mecánico y enzimático. Mientras que no se encontró diferencia alguna dependiente de la inflamación o el tratamiento exógeno respecto al caso de los linfocitos TCR  $\gamma\delta+$  y los CD8+, los CD4+ se vieron incrementados como consecuencia de la inflamación, siendo este efecto significativamente revertido por la budesonida (Fig. 32 A-C). Cabe destacar, que nuestros resultados confirman la mayor abundancia ya descrita en bibliografía, de los linfocitos CD8+ respecto a los CD4+ dentro de los IEL.

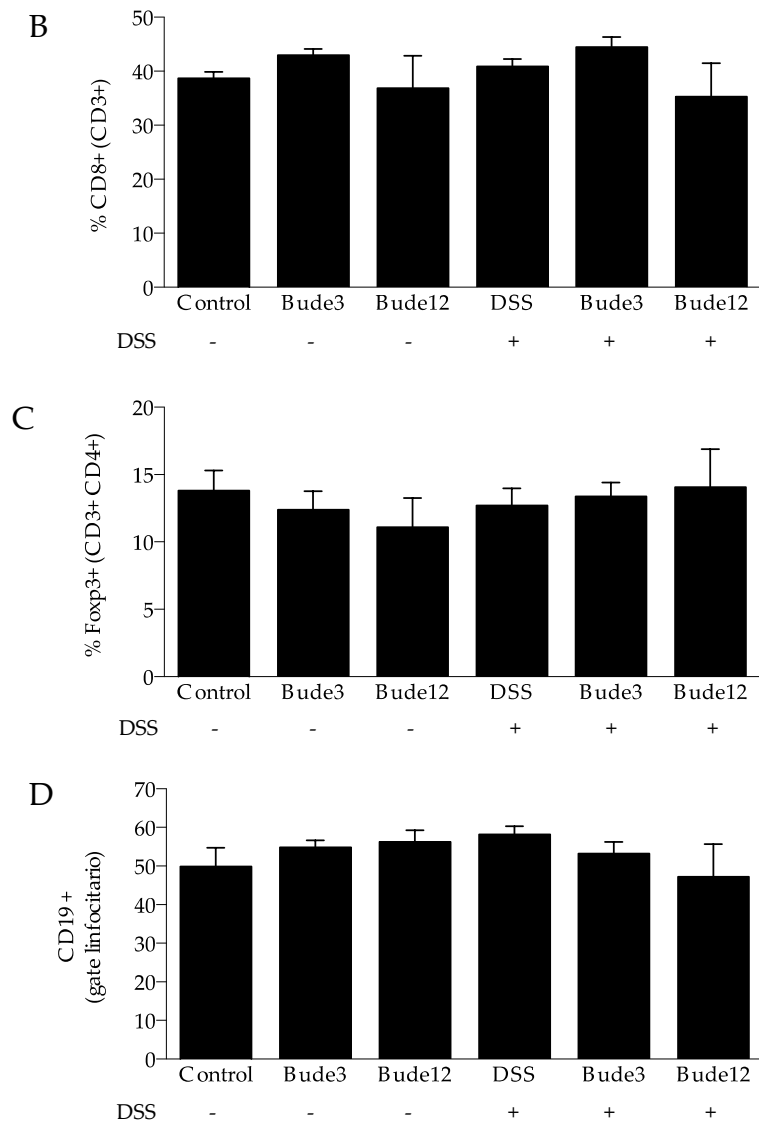




**Figura 32:** Estudio mediante citometría de flujo de los IEL aislados de tejido colónico. (A) TCR  $\gamma\delta$ + en gate linfocitario; (B) CD4+ en gate linfocitario; (C) CD8+ en gate linfocitario. Los resultados son expresados en forma de % y como la media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs Control; \*  $p < 0.05$  vs DSS. Bude=budesonida.

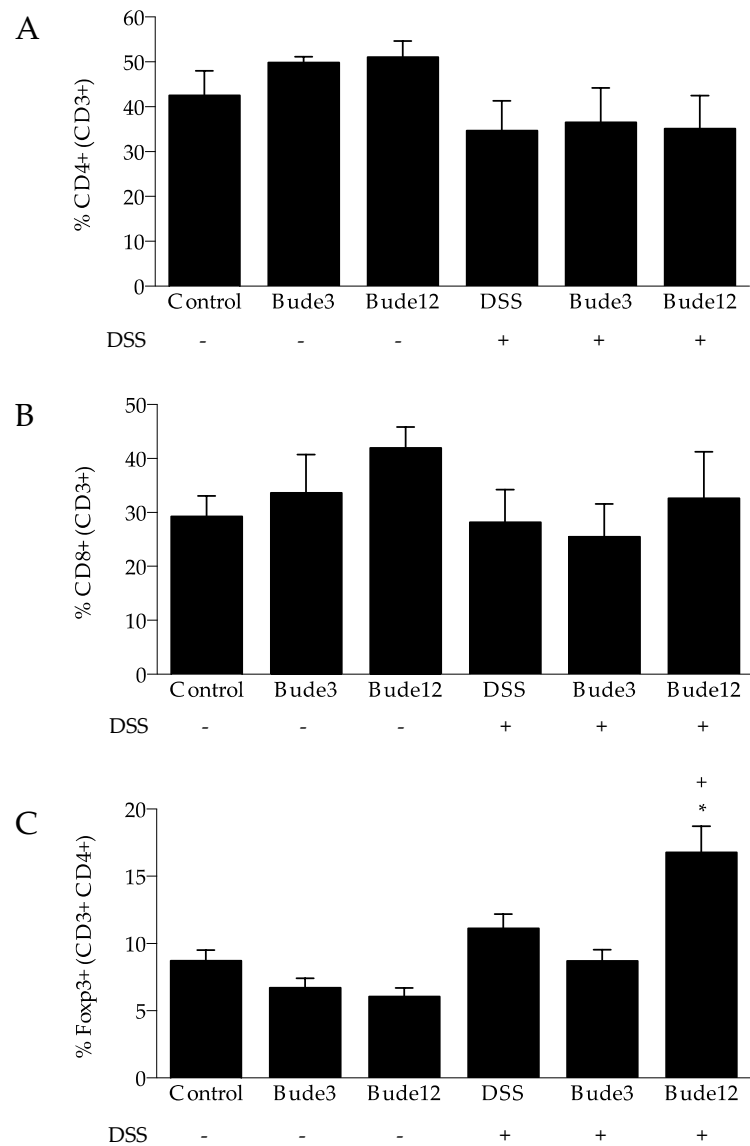
Asimismo, se estudió la abundancia relativa de diferentes poblaciones linfocitarias en las células obtenidas del bazo de los animales en las que fueron analizados separadamente los linfocitos T CD4+, CD8+, Foxp3+ y los linfocitos B en virtud de su expresión de CD19. No se obtuvieron diferencias dignas de mención en ningún caso, excepto un cierto descenso de la presencia de células T CD4+ dentro de los linfocitos (Fig 33 A-D).





**Figura 33:** Estudio mediante citometría de flujo de las células aisladas de bazo. (A) CD4+ entre las CD3+; (B) CD8+ entre las CD3+; (C) Foxp3+ entre las CD3-CD4 dobles positivas; (D) CD19+ en gate linfocitario. Los resultados son expresados en forma de % y como la media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs Control; \*  $p < 0.05$  vs DSS. Bude=budesonida.

Finalmente, se realizó un estudio focalizado sobre los linfocitos T dentro de las células de los ganglios mesentéricos (MLNCs). En este caso, no se observaron diferencias en referencia a la abundancia relativa de las células CD4+ y las CD8+, mientras que el estudio de la fracción de células T reguladoras incluidas dentro de los linfocitos T CD4+ arrojó resultados muy interesantes. La abundancia relativa de este tipo celular no se vió afectada por la inflamación en sí misma, mientras que bajo dicha influencia la administración de budesonida la incrementó de un modo estadísticamente significativo en la dosis de 12  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$ . Esto puede resultar sorprendente dado el marcado estado inflamatorio sistémico de naturaleza septicémica en el que se encuentran los animales incluidos en dicho grupo experimental (Fig. 34 A-C).



**Figura 34:** Estudio mediante citometría de flujo de las células aisladas de ganglios mesentéricos. (A) CD4+ entre las CD3+; (B) CD8+ entre las CD3+; (C) Foxp3+ entre las CD3-CD4 dobles positivas. Los resultados son expresados en forma de % y como la media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs Control; \*  $p < 0.05$  vs DSS. Bude=budesonida.

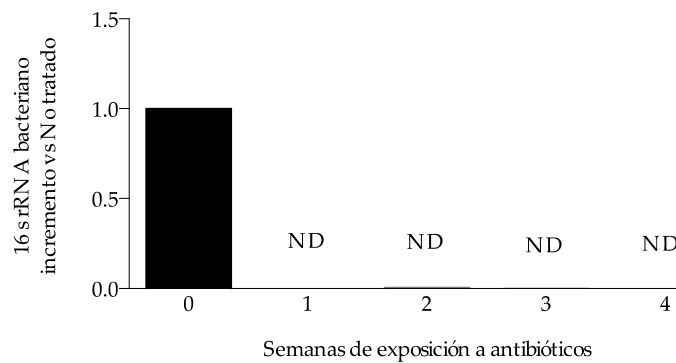
## 1.2. Efecto de la budesonida sobre la colitis aguda inducida por DSS en animales con depleción en la microbiota intestinal

En el momento que pusimos de manifiesto los efectos de la budesonida sobre la colitis aguda experimentalmente inducida por DSS, concluyendo que en condiciones inflamatorias de forma secundaria al efecto meramente intestinal de la budesonida se desencadena un proceso sistémico de tipo séptico, que a su vez justifica la elevada mortalidad asociada a dicha condición experimental, resulta lógico plantear un experimento similar pero en ausencia de carga bacteriana en la luz intestinal.

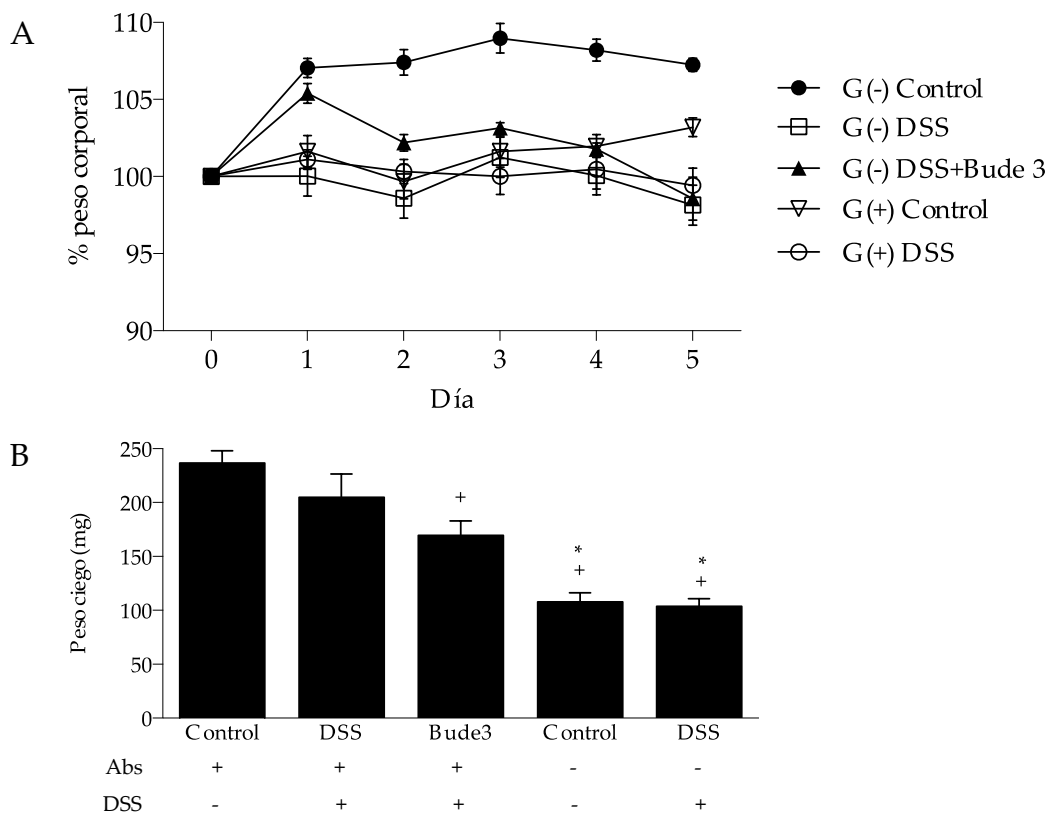
En este experimento que denominaré **DSS-PGF**, los ratones fueron expuestos a un cóctel de antibióticos en el agua de bebida durante cuatro semanas con objeto de conseguir un depleción



prácticamente total de la carga microbiana intestinal (Fig. 35), momento en que se comenzó la administración de DSS en agua de bebida durante la cual se mantuvieron los antibióticos renovados a diario junto con el DSS hasta el final de la experiencia. Uno de los parámetros más fiables para controlar el éxito en el proceso de depleción del contenido bacteriano intestinal es el tamaño y peso del ciego, que efectivamente se encuentran incrementados en aquellos animales expuestos a la terapia a base de antibióticos. Por tanto decidimos controlar dicho factor, observándose un marcado incremento del peso del ciego en los animales que recibieron antibióticos, acompañado de cierta reducción del mismo dependiente de la exposición a budesonida (Fig 36 B).

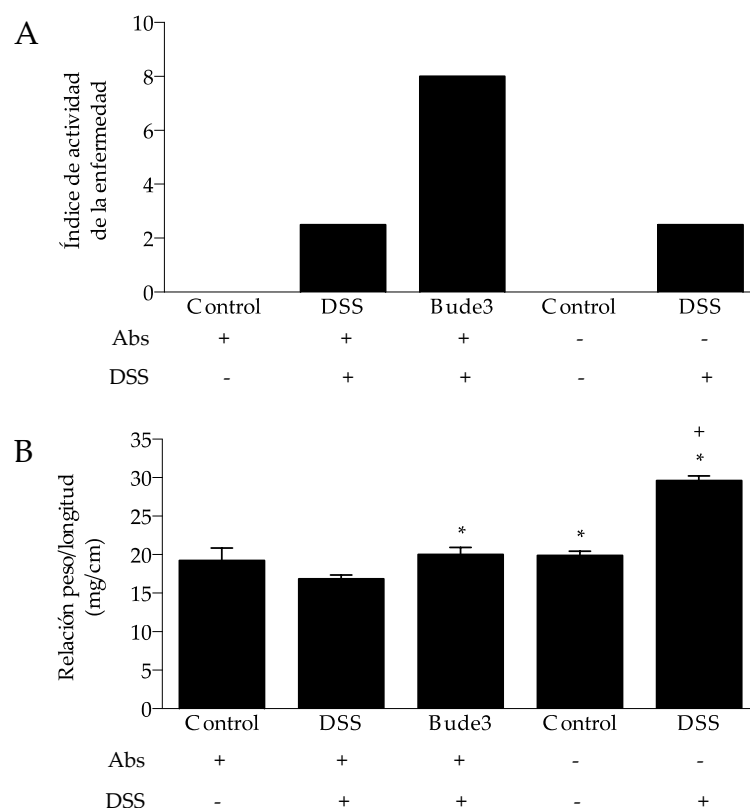


**Figura 35:** Cuantificación relativa por PCR a tiempo real del contenido bacteriano de la masa fecal en virtud de la amplificación del 16S rRNA. Los datos se expresan como incremento relativo al grupo no tratado. ND=no detectado.



**Figura 36:** (A) Evolución de pesos a lo largo del experimento DSS-PGF (%); (B) peso del ciego en mg. Los datos son expresados como media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs Control Abs +; \*  $p < 0.05$  vs DSS Abs+. Bude=budesonida, G(-)=recibe antibióticos, G(+)= no recibe antibióticos, Abs=antibióticos.

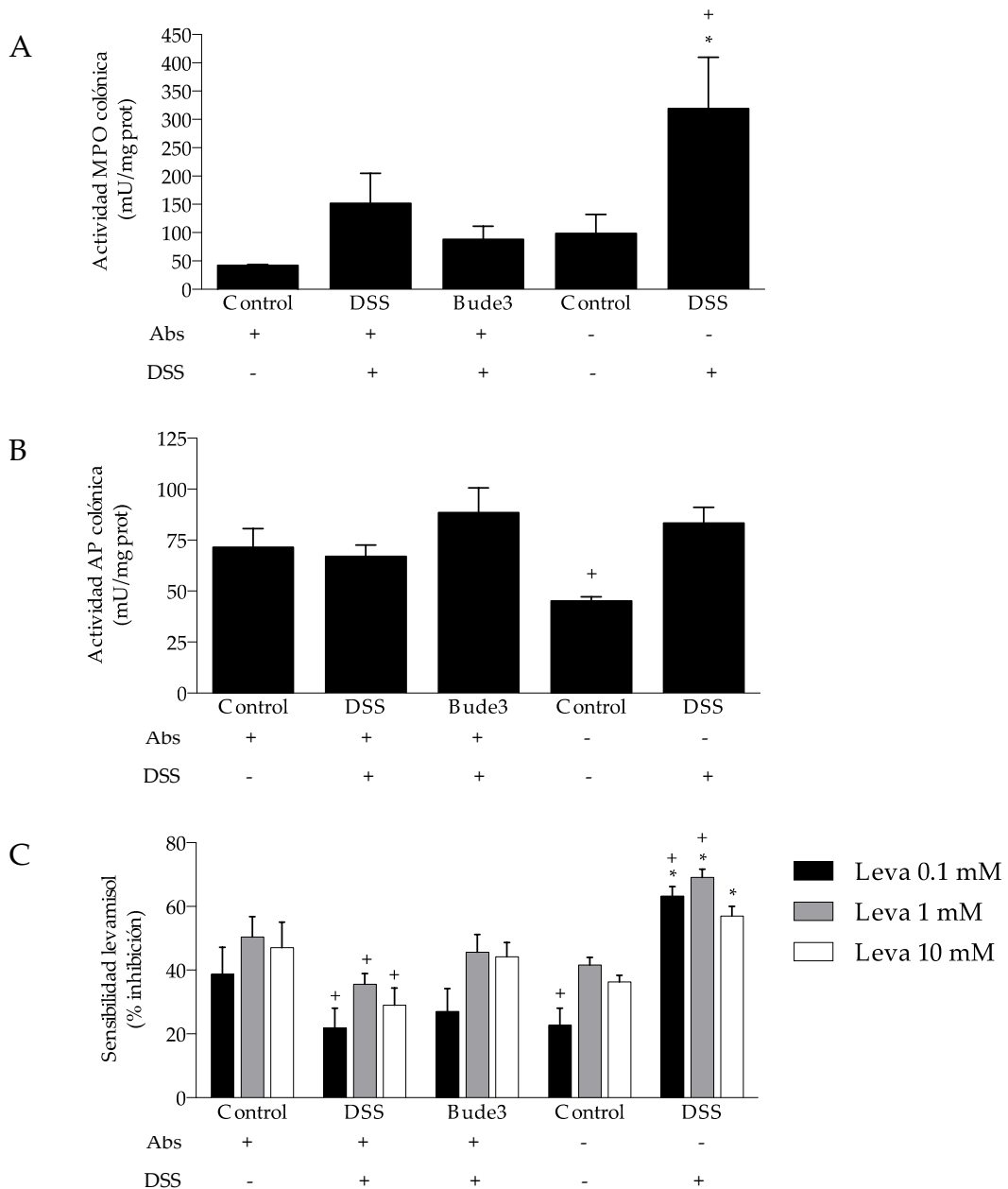
En este experimento se ensayó la colitis aguda inducida por DSS en condiciones estándar y ante una intensa depleción de la microbiota intestinal, incluyendo además en este último caso un grupo que recibió budesonida a la dosis de 3  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$ . La evolución del peso corporal de los diferentes grupos a lo largo de los 5 primeros días del experimento refleja una cierta tendencia hacia la ganancia de peso en el grupo control que recibió antibiótico, mientras que no se observó nada significativo en el resto de grupos (Fig 36 A). No obstante, el sacrificio de los animales se realizó en el día 6, sin que el peso del último día se pueda mostrar ya que por razones técnicas del ensayo de permeabilidad *in vivo* a FITC-dextrano (4 Kda) los ratones se mantuvieron en ayuno durante la noche previa al sacrificio. En un principio, pretendíamos realizar el sacrificio tras 7 días de exposición a DSS como en el caso de DSS2, pero resultó imperativo concluir el experimento transcurridos 6 días debido al fuerte impacto negativo de la budesonida al administrarlo a animales colíticos en ausencia de bacterias luminales (G(-) DSS+Bude3), el cual queda reflejado fundamentalmente en la valoración del índice de actividad de la enfermedad cuyo incremento se asocia esencialmente a un masivo sangrado rectal en este grupo (Fig 37 A). Asimismo, se tomaron fotografías durante la necropsia practicada a estos animales que resultan muy ilustrativas sobre el estado de los ratones incluidos en este grupo, destacando fundamentalmente la presencia de sangre oscura libre entre las vísceras al abrir el peritoneo (Fig. 40 B).



**Figura 37:** Evaluación de la afectación general y colónica de los animales incluidos en DSS-PGF. (A) Índice de actividad de la enfermedad (UA); (B) relación peso/longitud (mg/cm). Los resultados son expresados como media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs Control Abs +; \*  $p < 0.05$  vs DSS Abs+. Bude=budesonida, UA=unidades arbitrarias, Abs=antibióticos.

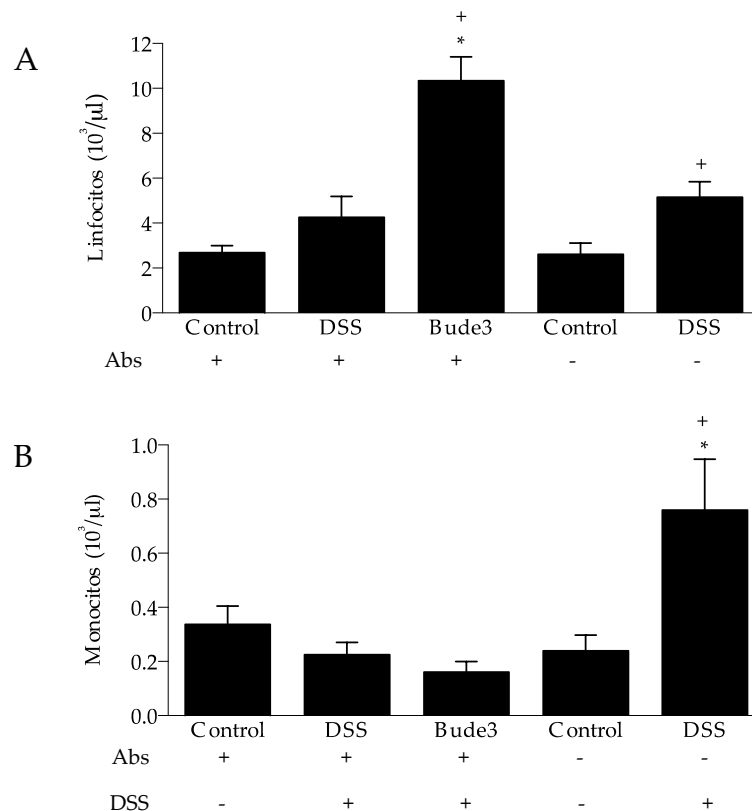
Resulta especialmente interesante destacar que existe en general cierta controversia alrededor de si la eliminación de la microbiota intestinal ejerce algún efecto sobre la evolución de la colitis

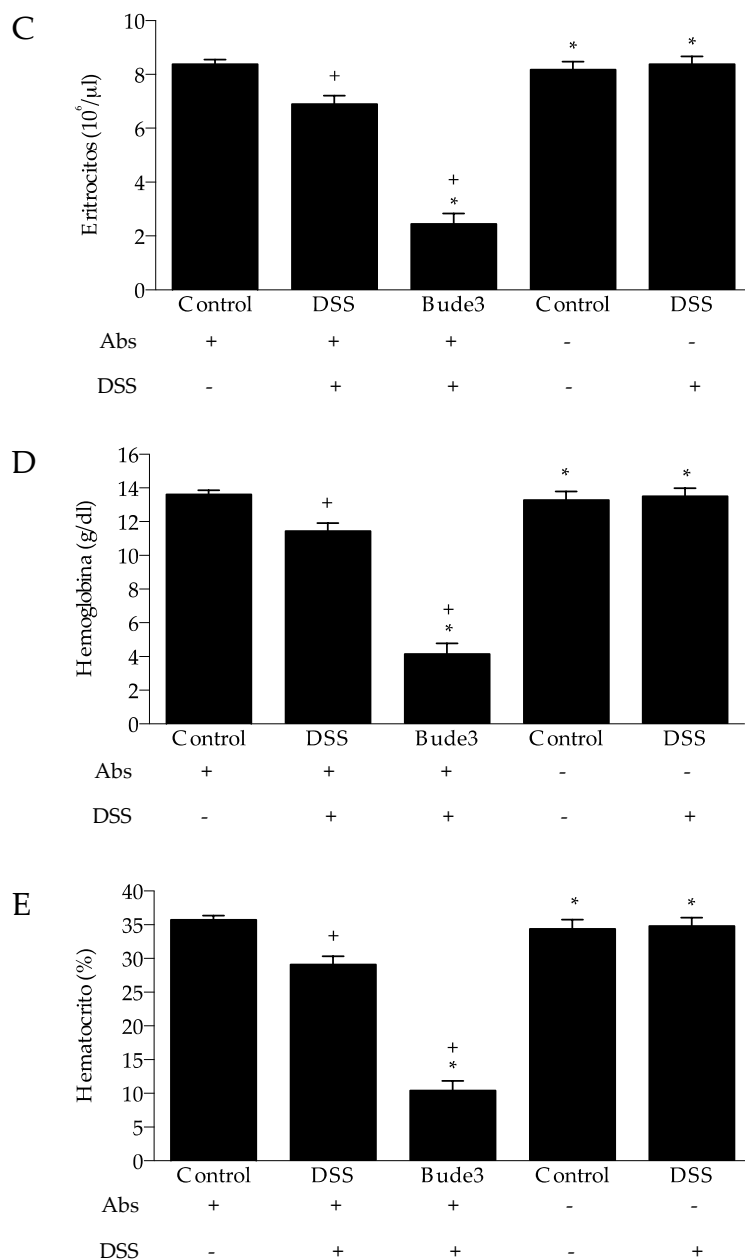
aguda inducida por DSS, existiendo bibliografía que apunta a la total ausencia de afectación inflamatoria, así como otra que indica una mayor severidad en los signos inflamatorios inherentes al modelo tal y como se detalla en el apartado correspondiente de la introducción. En este caso concreto y en general en mi experiencia personal con el manejo de animales sometidos a depleción de la microbiota intestinal y libres de bacterias absolutos (GF), los resultados apuntan a una respuesta inflamatoria muy reducida en el grupo DSS tratado con antibióticos si esta se compara con aquella del grupo DSS en condiciones estándar. Sin embargo, la apariencia general de los animales y en última instancia su supervivencia tras la administración del DSS se vió severamente perjudicada por la ausencia o reducción cuantitativa de la microbiota intestinal.



**Figura 38:** Determinación de actividades enzimáticas en el tejido colónico. (A) MPO (mU/mg prot); (B) AP (mU/mg prot); (C) sensibilidad de AP a levamisol (% de inhibición de la actividad AP). Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs Control Abs+; \*  $p < 0.05$  vs DSS Abs+. Bude=budesonida, Abs=antibióticos, Leva=levamisol.

Estas observaciones se encuentran sustentadas por el escaso aumento de la actividad MPO colónica y la sensibilidad a levamisol de la actividad AP del mismo tejido en el grupo DSS expuesto a antibióticos, que contrasta con la marcada elevación que alcanza la significancia estadística de ambos parámetros en el grupo DSS bajo condiciones convencionales (Fig 38 A-C). Además, la concentración de monocitos en sangre cuya elevación se correlaciona fielmente con el grado de inflamación intestinal asociada a la colitis aguda inducida por DSS, se vió lógicamente incrementada en el grupo colítico estándar mientras que no se afectó en aquel que recibió DSS de forma concomitante con los antibióticos (Fig 39 B). El análisis de la concentración de linfocitos en sangre arrojó un resultado sorprendente y de difícil interpretación, ya que mientras en condiciones estándar desde un punto de vista microbiológico el comportamiento fue análogo al encontrado en DSS1 y DSS2, en las condiciones de depleción microbiológica esta elevación fue más sutil y curiosamente se vió dramáticamente potenciada por la administración de budesonida (Fig 39 A). En esta ocasión, también se determinó el hematocrito, así como la concentración de hemoglobina y eritrocitos en sangre con objeto de conocer su modificación secundaria al masivo sangrado rectal observado en el seguimiento de los animales. De acuerdo con lo esperado, los tres parámetros aparecieron extraordinariamente reducidos de forma exclusiva en el grupo DSS deplecionado a nivel microbiológico y que recibió budesonida (Fig 39 C-E). Paralelamente se realizó la cuantificación de sangre oculta en heces recogidas en el día 5 del experimento, encontrándose un aumento de la misma en el grupo DSS con antibióticos tratado con budesonida, que resulta coherente con los resultados anteriormente mencionados y con el aspecto del animal durante la necropsia (Fig 40 A y B).

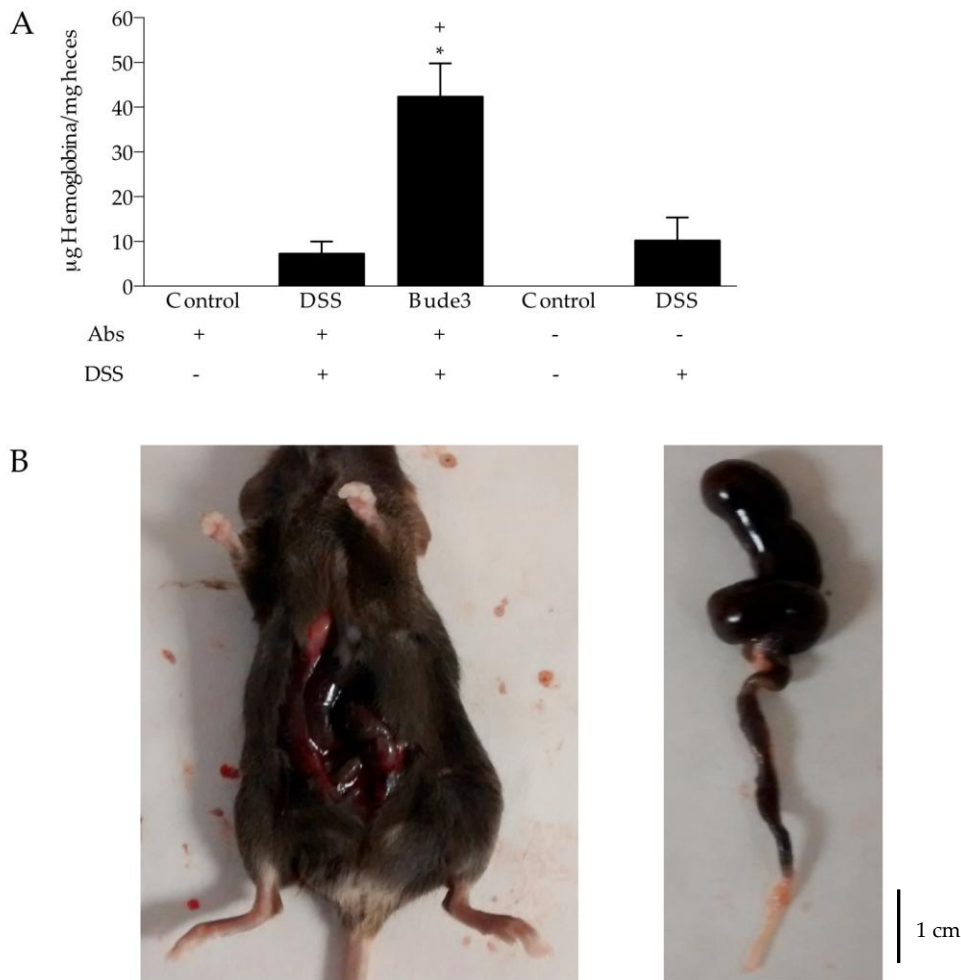




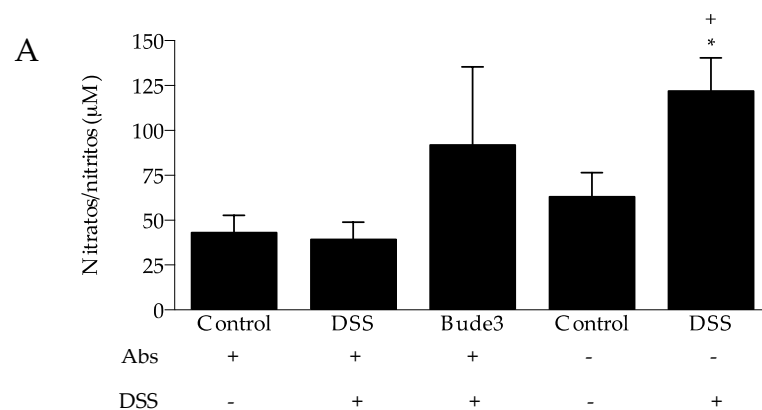
**Figura 39:** Estudio hematológico en sangre extraída el día del sacrificio de los animales. (A) Linfocitos ( $10^3/\mu\text{l}$ ); (B) monocitos ( $10^3/\mu\text{l}$ ); (C) eritrocitos ( $10^6/\mu\text{l}$ ); (D) hemoglobina (g/dl); (E) hematocrito (%). Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs Control Abs+; \*  $p < 0.05$  vs DSS Abs+. Bude=budesonida, Abs=antibióticos.

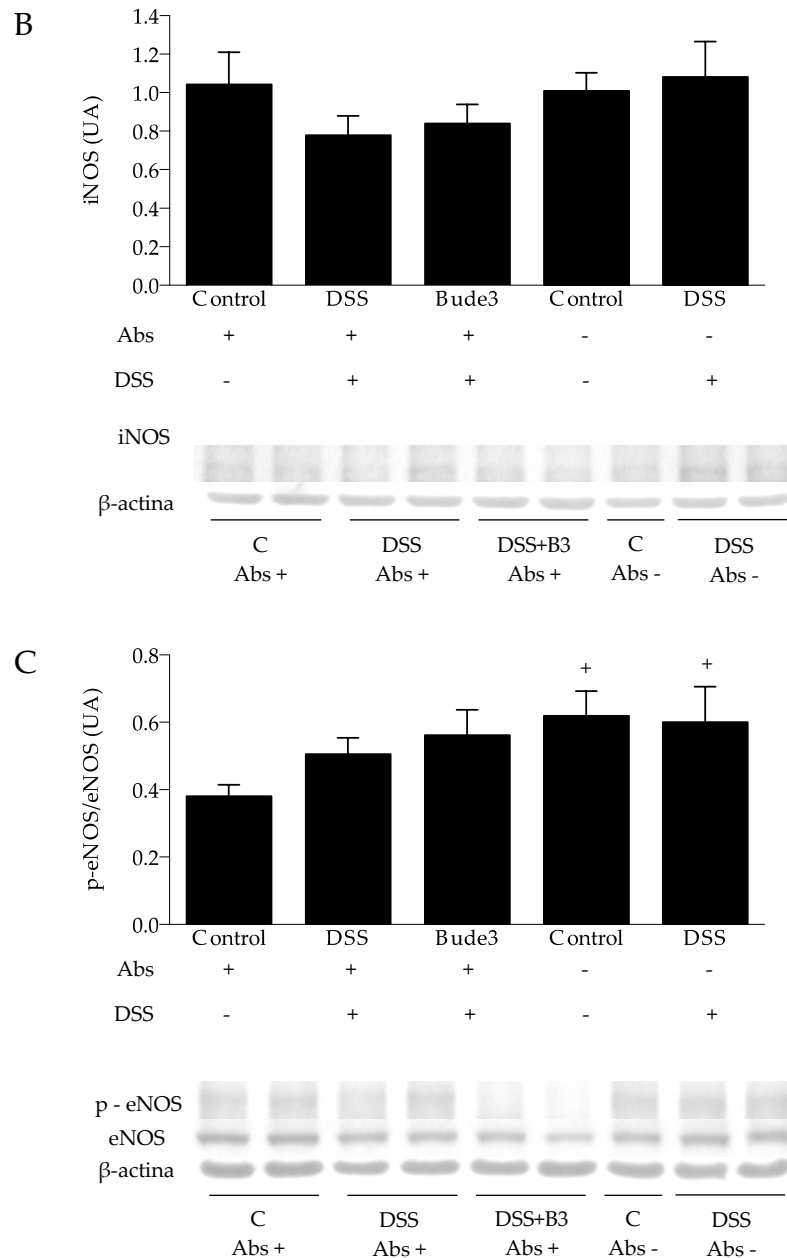
A pesar de que un proceso séptico fuera la causa subyacente a nivel sistémico del empeoramiento del estado de los animales que recibieron budesonida en este experimento parecía una opción poco plausible, dado que la carga bacteriana luminal resultó esencialmente indetectable, con objeto de descartar esa posibilidad decidimos determinar los parámetros incluidos en el análisis de DSS1 y DSS2 que informan al respecto. En este sentido, no se detectaron bacterias viables en MLN y tampoco en hígado en el que asimismo el LPS no se pudo detectar (datos no mostrados). Además, se determinaron los nitratos/nitritos en plasma, sin que se pudiera observar una elevación de los mismos en el grupo colítico que recibió budesonida además del cóctel de antibióticos (Fig 41 A). En consonancia con lo anterior, no se observó incremento significativo

alguno de la expresión proteica de iNOS o de la ratio p-eNOS/eNOS (Fig 41 By C). Por tanto, resulta evidente que la sepsis no ejerce contribución alguna en el marcado impacto negativo de la budesonida en estas condiciones experimentales.



**Figura 40:** (A) Determinación de sangre oculta en heces obtenidas transcurridos 5 días de inducción de colitis. Los datos se expresan en  $\mu\text{g}$  hemoglobina/mg heces y como media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs Control Abs+; \*  $p < 0.05$  vs DSS Abs+. Bude=budesonida, Abs=antibióticos. (B) Panel de la izquierda; comienzo de la necropsia de un ejemplar del grupo DSS+Bude3 Abs +, mostrando el sangrado intraperitoneal. Panel de la derecha; colon del individuo presentado en el panel contiguo.

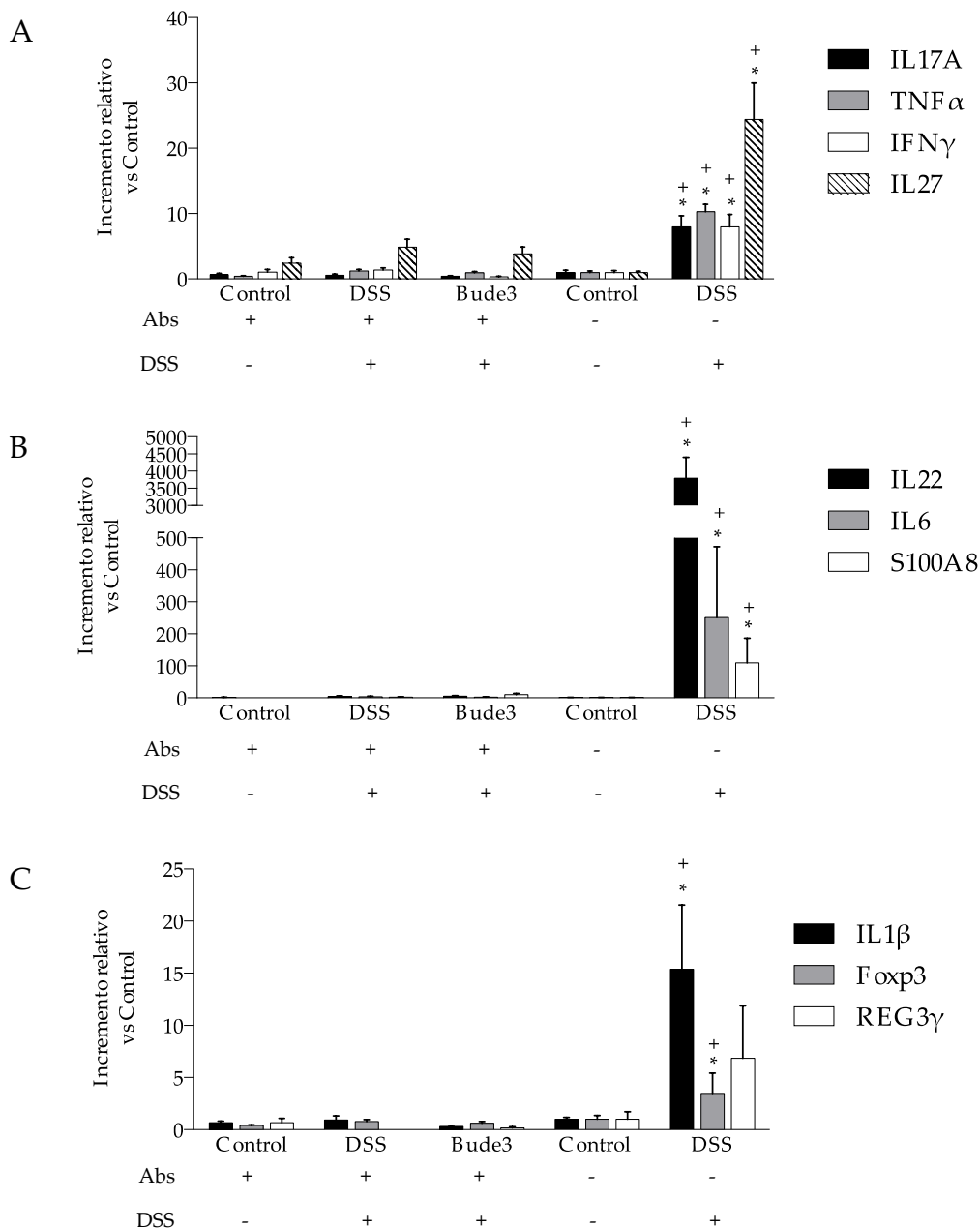




**Figura 41:** Evaluación de parámetros sistémicos asociados a la septicemia. (A) Concentración de nitratos/nitritos en plasma ( $\mu\text{M}$ ); (B) expresión proteica de iNOS en tejido pulmonar (UA); (C) relación p-eNOS/eNOS en tejido pulmonar (UA). Los resultados son expresados en forma de media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs Control Abs+; \*  $p < 0.05$  vs DSS Abs+. Bude=budesonida, Abs=antibióticos, UA=unidades arbitrarias, C=control.

De forma análoga al análisis realizado sobre DSS2, en este caso también se estudió la expresión a nivel génico de diferentes proteínas implicadas en la homeostasis intestinal en condiciones basales y sobre todo en inflamación, focalizando dicho estudio sobre el tejido colónico completo. Los resultados presentados en las figuras 42 A, B y C, muestran claramente como la depleción de la microbiota intestinal reduce dramáticamente la respuesta inflamatoria desencadenada por la administración de DSS, haciéndola prácticamente imperceptible atendiendo a los parámetros descritos anteriormente o mediante PCR a tiempo real como se muestra a continuación. Las proteínas típicamente incrementadas en condiciones inflamatorias cuya expresión génica fue

analizada y que permitieron alcanzar la anterior conclusión son la IL17A, IL27, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL22, IL6, S100A8, IL1 $\beta$ , Foxp3 y Reg3 $\gamma$ .

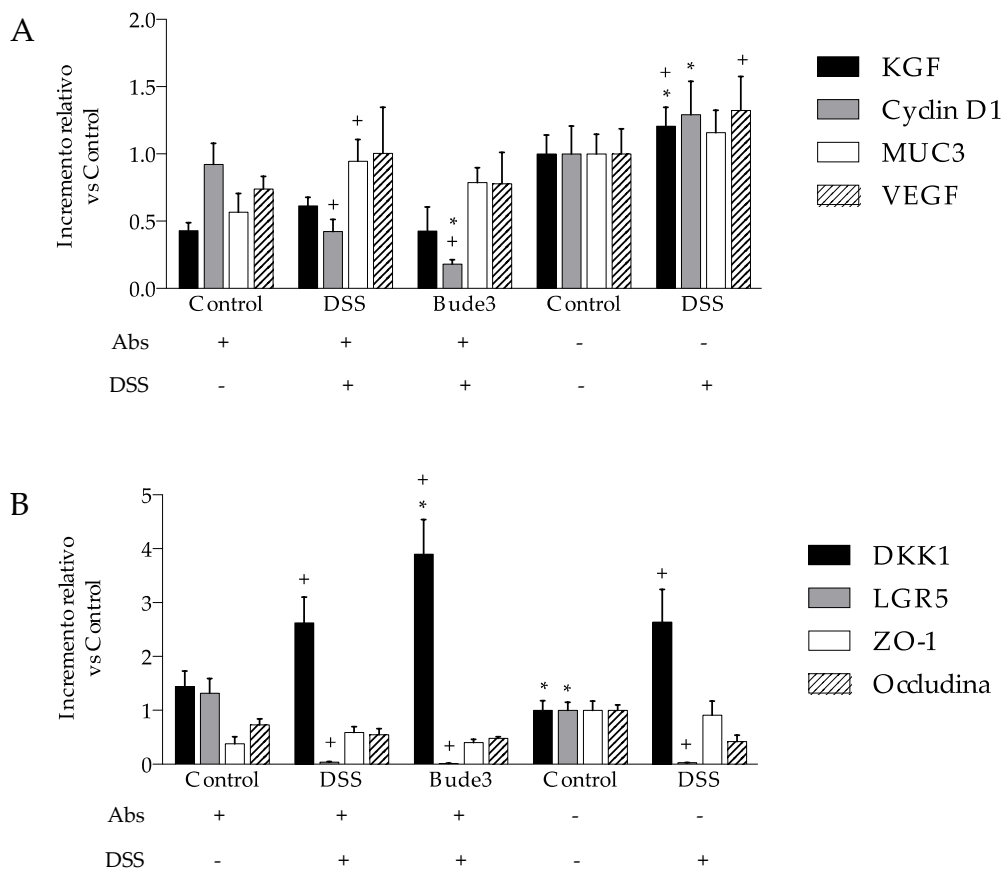


**Figura 42:** Evaluación de la expresión génica de diferentes marcadores inflamatorios en tejido colónico completo. (A) IL17A, IL27, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ; (B) IL22, IL6, S100A8; (C) IL1 $\beta$ , Foxp3 y Reg3 $\gamma$ . Los resultados son expresados como incremento respecto al grupo Control que recibió antibióticos, y en forma de media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs Control Abs+; \*  $p < 0.05$  vs DSS Abs+. Bude=budesonida, Abs=antibióticos.

Además se evaluó la expresión de KGF, que apareció significativa y exclusivamente elevada en el grupo colítico con microbiota intacta. Por su parte la expresión de MUC3 y de VEGF no sufrió grandes variaciones entre los grupos experimentales, siendo especialmente relevante el caso de la segunda proteína que fue analizada atendiendo a su relevante papel en la homeostasis angiogénica en el contexto de la mucosa intestinal, dado que parecía plausible que se encontrara modificada en función de los resultados relacionados con el sangrado rectal anteriormente mostrados. Teniendo



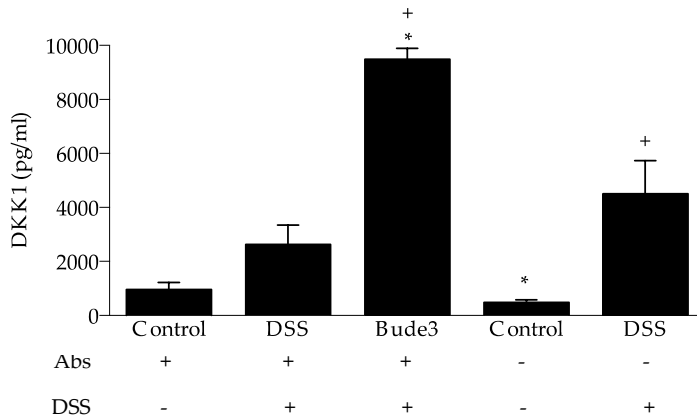
en cuenta que existen evidencias experimentales que han demostrado la decisiva influencia de la señalización de la microbiota sobre las células epiteliales intestinales, favoreciendo su proliferación y por tanto mejorando las respuestas restitutivas epiteliales de carácter hiperplásico ante una agresión sobre el mismo, decidimos evaluar la expresión de Cyclin D1. De forma coherente con el anterior concepto, se produjo un ligero aumento de su expresión en el grupo DSS convencional que alcanzó la significancia comparado con el grupo DSS con antibióticos, mientras que considerando los grupos expuestos a antibióticos, la administración de DSS no produjo dicho aumento de la proliferación epitelial sino que la redujo, siendo esta tendencia significativamente agudizada por la administración de budesonida (Fig 43 A).



**Figura 43:** Evaluación de la expresión génica en tejido colónico completo. (A) KGF, Cyclin D1, MUC3, VEGF; (B) DKK1, LGR5, ZO-1, ocludina. Los resultados son expresados como incremento respecto al grupo Control que recibió antibióticos y en forma de media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs Control Abs+; \*  $p < 0.05$  vs DSS Abs+. Bude=budesonida, Abs=antibióticos.

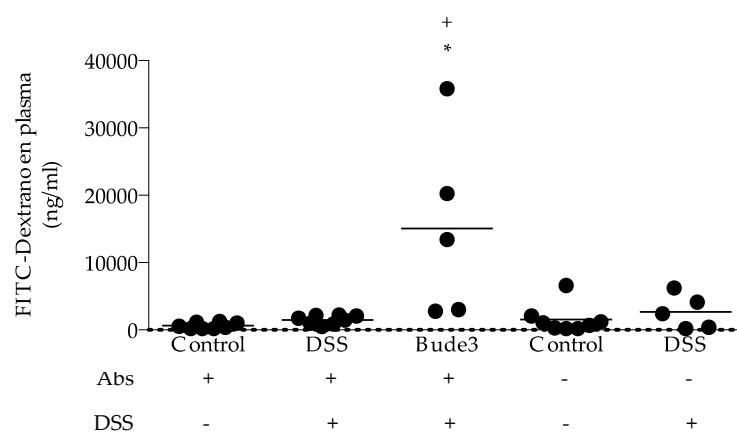
Por otro lado, se estudió la expresión génica en tejido colónico completo de algunas de las proteínas que componen las uniones estrechas como ZO-1 y ocludina, sin llegar a observarse modificaciones sustanciales de la misma. Sin embargo, sí se pudo constatar en estas mismas muestras un incremento de la expresión de DKK1 por la administración de DSS independientemente de las condiciones microbiológicas, siendo dicha tendencia asimismo incrementada de forma consistente por la budesonida. En consonancia con este hallazgo, se observó una reducción de la expresión de LGR5, gen diana del factor de transcripción  $\beta$ -Catenina, aunque probablemente por la mínima expresión del mismo en condiciones inflamatorias la budesonida no generó modulación alguna (Fig 43 B). Con objeto de corroborar los efectos de la

administración del GC sobre la biología de DKK1 en estas condiciones experimentales, se determinó esta proteína en plasma mediante ELISA (Fig 44). Los resultados obtenidos reflejan un perfil muy similar al anteriormente comentado en referencia a la expresión colónica analizada por PCR a tiempo real, por lo que confirman dicha modulación ejercida por el GC.



**Figura 44:** Cuantificación de DKK1 en plasma mediante ELISA. Los resultados son expresados en pg/ml y en forma de media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs Control Abs+; \*  $p < 0.05$  vs DSS Abs+. Bude=budesonida, Abs=antibióticos.

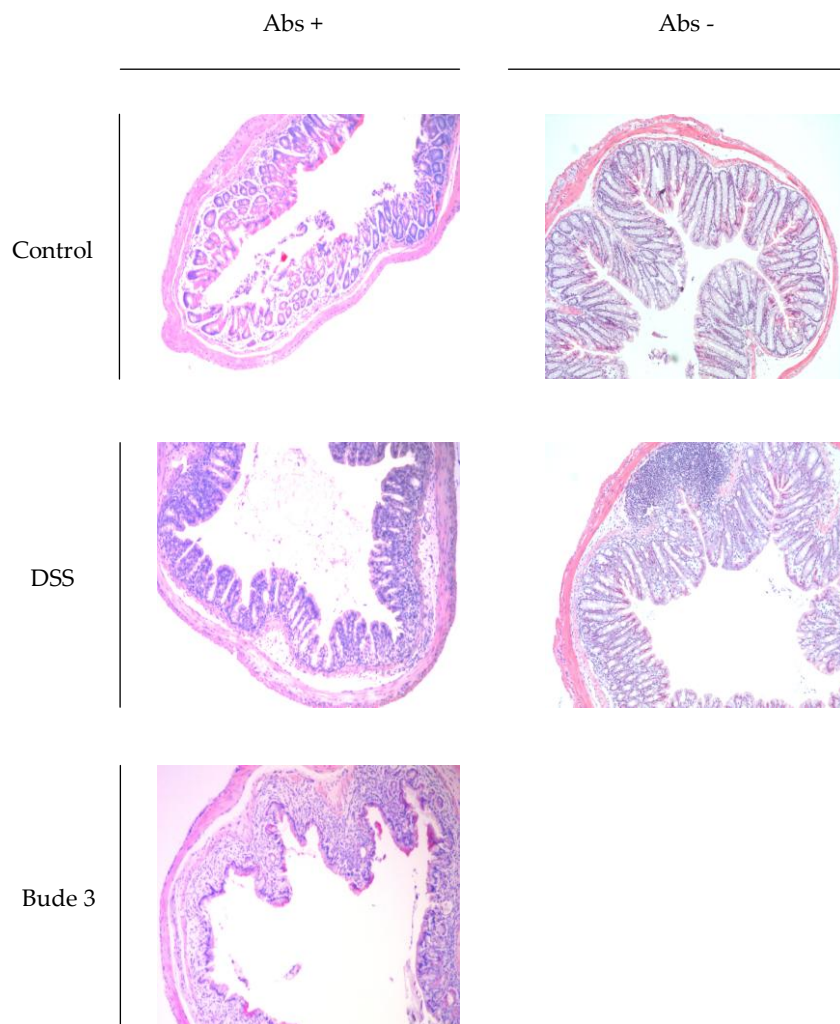
Con la intención de evaluar la función de barrera intestinal al final del experimento denominado DSS-PGF, se administró FITC-dextrano (4 KDa) vía oral a todos los ratones incluidos en el mismo 5 horas antes de su sacrificio, para posteriormente cuantificar su concentración en plasma. Como se podía esperar atendiendo al estado de los animales incluidos en el grupo Bude3 al final del experimento y a los resultados descritos arriba que apuntan a una nula capacidad de restitución epitelial tras la agresión del DSS sobre el epitelio de los mismos, este grupo mostró un extraordinario incremento de su permeabilidad intestinal. Este resultado ilustra con claridad una función de barrera epitelial severamente comprometida (Fig 45).



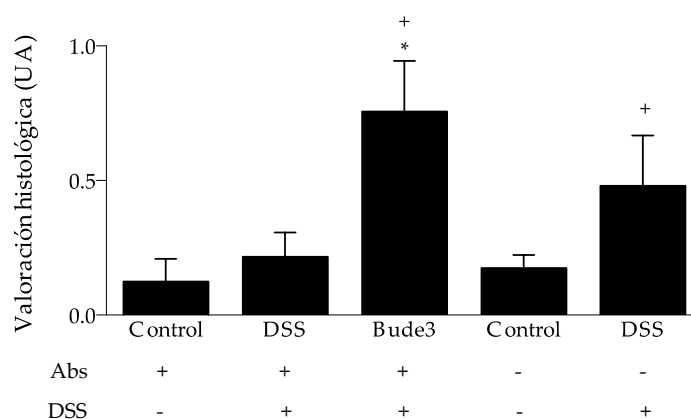
**Figura 45:** Permeabilidad intestinal a FITC-dextrano (4 KDa) ensayada *in vivo*. Los resultados son expresados en ng de fluoróforo/ml de plasma y en forma de media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs Control Abs+; \*  $p < 0.05$  vs DSS Abs+. Bude=budesonida, Abs=antibióticos.

Finalmente, se evaluó el estado del tejido colónico de estos animales a nivel histológico. Como se puede observar en las secciones representativas de cada condición incluidas en la figura 46 y en

los resultados de la valoración objetiva de las mismas recogida en la figura 47, la depleción de la microbiota intestinal mediante antibióticos generó un cierto estado atrófico en el epitelio de la mucosa colónica *per se*. Además, queda patente que la administración de DSS desencadenó un proceso inflamatorio manifiesto evidenciado por una masiva infiltración leucocitaria en los animales no expuestos a antibióticos, mientras que este fue mucho más sutil en los deplecionados microbiológicamente. En lo referente a la administración de budesonida, las evidencias obtenidas a nivel histológico concuerdan con los efectos relacionados con una reducción de la capacidad de restitución epitelial que se asocia con un severo compromiso de la función de barrera mostrados anteriormente, fundamentalmente porque en este caso la budesonida parece incrementar la erosión y sobre todo producir una severa atrofia epitelial en la mucosa colónica, siendo ambos los parámetros que en esencia justifican el incremento de la valoración histológica en el grupo que recibió el GC. Asimismo, cabe destacar que el efecto antiinflamatorio del GC resulta poco patente, probablemente debido a que fue administrado a ratones escasamente colíticos debido a su menor carga bacteriana intestinal.



**Figura 46:** Estudio histológico del colon. Imágenes histológicas (10X) de secciones transversales representativas del tejido colónico, sometidas a la tinción con hematoxilina & eosina.



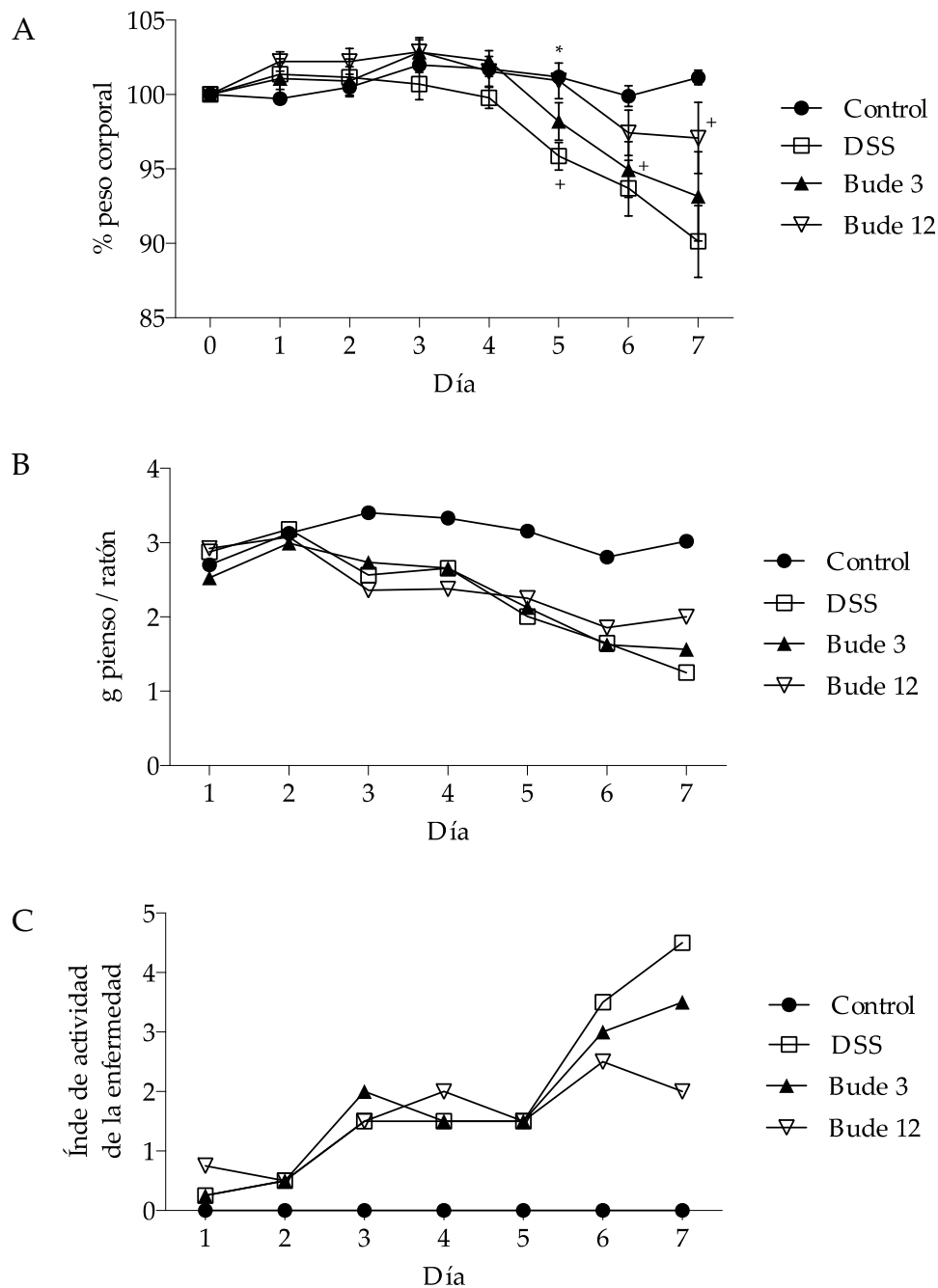
**Figura 47:** Valoración histológica del conjunto de las secciones transversales colónicas que son representadas por la figura 46, expresada como media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs Control Abs+; \*  $p < 0.05$  vs DSS Abs+. Bude=budesonida, Abs=antibióticos, UA=unidades arbitrarias.

### 1.3. Efecto de la exposición a budesonida de forma previa al desarrollo de la colitis aguda inducida por DSS

Una vez puesto de manifiesto el efecto de la budesonida sobre la colitis aguda inducida por DSS siendo esta administrada exclusivamente durante el tiempo de inducción del modelo experimental inflamatorio, mediante el experimento **DSS3** decidimos explorar el efecto del GC cuando este se administra exclusivamente durante los días previos a la adición del DSS en el agua de bebida. Con objeto de reflejar en la medida de lo posible la dinámica recidivante de la EII en humanos, se decidió administrar DSS durante 5 días a los animales, para posteriormente permitir su recuperación durante un período de 14 días. Dicha curación se prolongó durante 5 días atendiendo a las evidencias extraídas de un experimento piloto previo (resultados no mostrados), en el cual el proceso inflamatorio intestinal y el compromiso de la función de barrera ejercida por el epitelio colónico remitían completamente transcurrido dicho período. Esta consideración resulta crítica, dado que los experimentos DSS1 y DSS2 demuestran que la administración de budesonida mientras la función de barrera intestinal se encuentra alterada por el DSS, genera un empeoramiento del estado del animal secundario a un proceso septicémico que acelera la evolución natural del modelo conduciendo a los animales a una muerte temprana. Por tanto, una vez recuperados los animales del primer ciclo de DSS, se administró budesonida o vehículo exclusivamente durante 5 días, para posteriormente inducir una colitis aguda mediante DSS aplicando el mismo protocolo seguido en el experimento DSS2.

En este caso, la administración de budesonida generó un beneficio notorio y de carácter dosis-dependiente que resultó evidente desde el día 4-5 en adelante. La mejoría en la evolución del peso de los animales como consecuencia del tratamiento con el GC resultó significativa desde el punto de vista estadístico en el día 5 independientemente de la dosis de budesonida administrada. No obstante, desde ese momento hasta el final del experimento, el beneficio fue mucho más evidente en el grupo que recibió la dosis de 12  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$  que en aquel que recibió la de 3  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$  (Fig.48 A). Además, este efecto queda igualmente evidenciado por el incremento en el consumo de comida asociado al tratamiento y la reducción en la valoración del índice de actividad de la

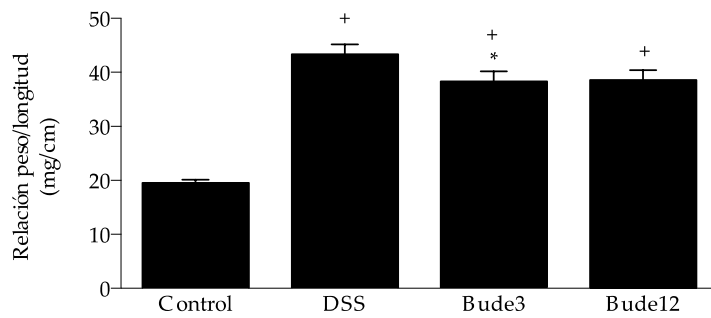
enfermedad, que de un modo análogo a lo acontecido con la evolución del peso, se manifiestan fundamentalmente durante los dos últimos días del experimento (Fig 48 B y C).



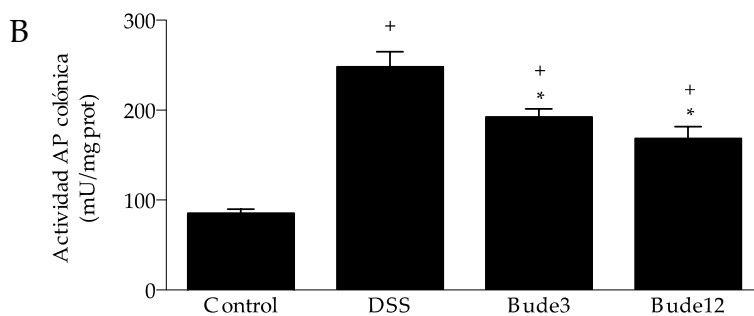
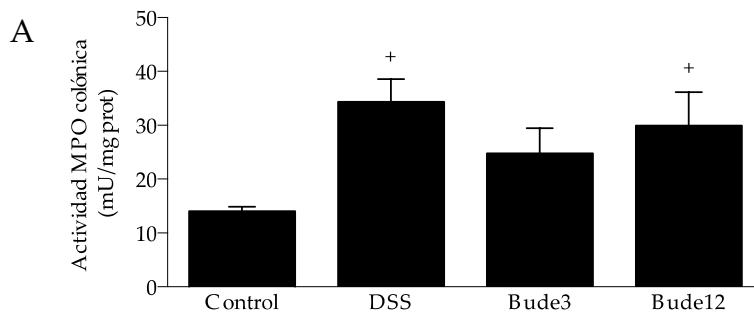
**Figura 48:** Evolución de los animales durante la colitis inducida durante en el experimento DSS3. (A) Peso corporal (% de peso inicial); (B) consumo de pienso (g/ratón/día); (C) valoración del índice de actividad de la enfermedad (UA). Datos expresados como media  $\pm$  SEM en el caso de A. (n=8). + primer día con  $p < 0.05$  para los grupos colíticos vs Control, \* primer día con  $p < 0.05$  para los grupos colíticos tratados vs DSS. Bude=budesonida, UA=unidades arbitrarias.

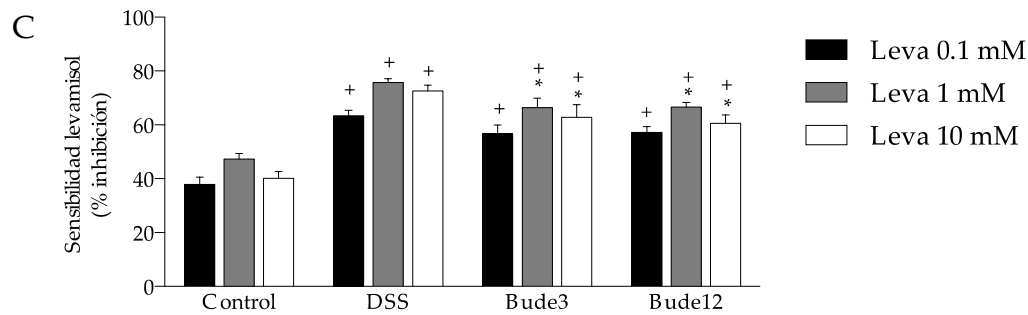
Con la intención de conocer si el evidente beneficio aportado por la budesonida en estas condiciones experimentales se traducía en una mejoría en los parámetros de tipo inflamatorio en el tejido colónico, se realizó un análisis similar al aplicado a otros experimentos anteriormente

descritos. En este sentido, la administración del GC redujo notablemente el clásico incremento de la relación peso/longitud del colon asociado al modelo, aunque este efecto curiosamente solo alcanzó la significancia estadística en el grupo Bude3 (Fig. 49). Por otro lado, el tratamiento no redujo la infiltración neutrofílica tal y como refleja la determinación de la actividad MPO colónica, lo que permite inferir que el efecto inmunosupresor del GC parece ser inexistente en la mucosa colónica de estos animales (Fig 50 A). Curiosamente, ambas dosis de budesonida sí redujeron drásticamente tanto la actividad AP colónica como la sensibilidad *in vitro* de dicha enzima al levamisol, reflejando la mejoría desde el punto de vista inflamatorio aportado por el GC con esta pauta de administración (Fig 50 B y C).



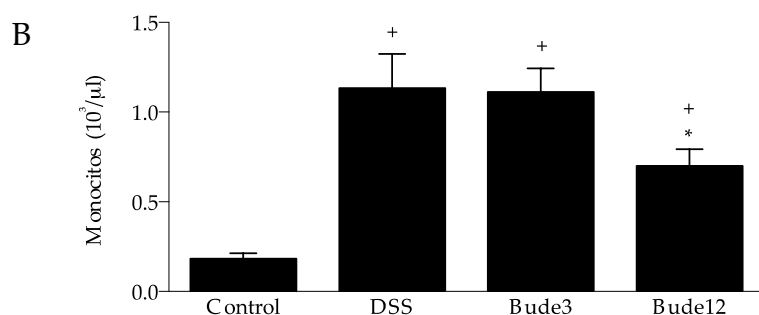
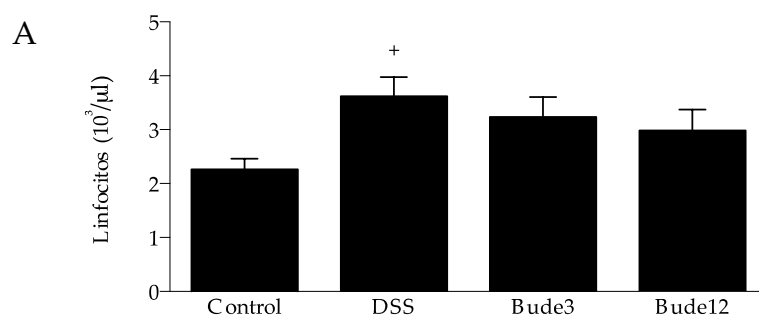
**Figura 49:** Relación peso/longitud colónica de los animales incluidos en DSS3. Los resultados son expresados en mg/cm y en forma de media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs Control; \*  $p < 0.05$  vs DSS. Bude=budesonida.

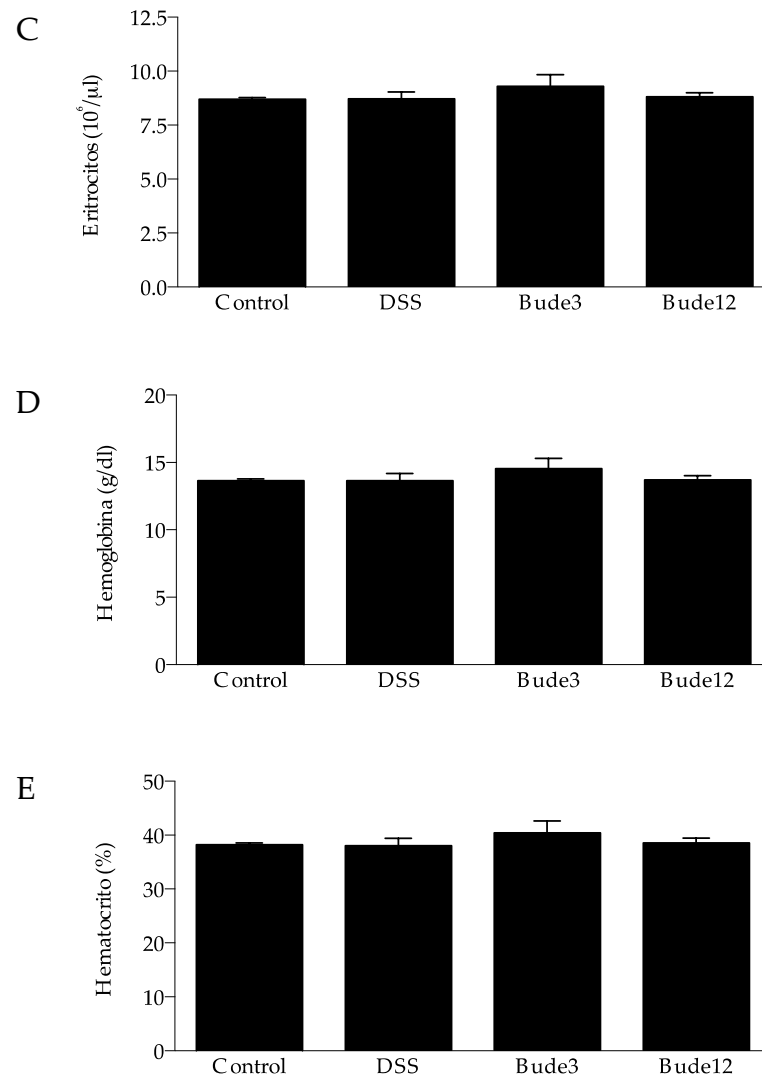




**Figura 50:** Determinación de actividades enzimáticas en el tejido colónico. (A) MPO (mU/mg prot); (B) AP (mU/mg prot); (C) sensibilidad de AP a levamisol (% de inhibición de la actividad AP). Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs Control; \*  $p < 0.05$  vs DSS. Bude=budesonida, Leva=levamisol.

En este experimento también se analizaron los parámetros de tipo hematológico que en DSS1 y DSS2 nos permitieron conocer detalladamente las consecuencias de la administración de budesonida sobre la inflamación intestinal en general y sobre el sangrado rectal en particular. Tal y como ya apuntan los resultados expuestos en las figuras anteriores, la budesonida presentó un efecto antiinflamatorio intestinal importante, que a nivel sistémico se tradujo en un descenso sutil de los linfocitos en sangre y en una significativa inhibición del incremento de los monocitos en sangre que se produce de un modo inherente a este modelo (Fig 51 A y B). En este caso, tanto la inflamación en sí misma como la administración de budesonida previa al segundo ciclo de DSS, no resultaron influyentes sobre los niveles de hemoglobina, eritrocitos y hematocrito sanguíneos, lo que permite pensar que el sangrado rectal en este caso no fue un factor influyente sobre la evolución de los animales (Fig 51 C-E). Este extremo fue corroborado mediante la cuantificación de sangre oculta en heces, la cual resultó indetectable en todos los casos (datos no mostrados).

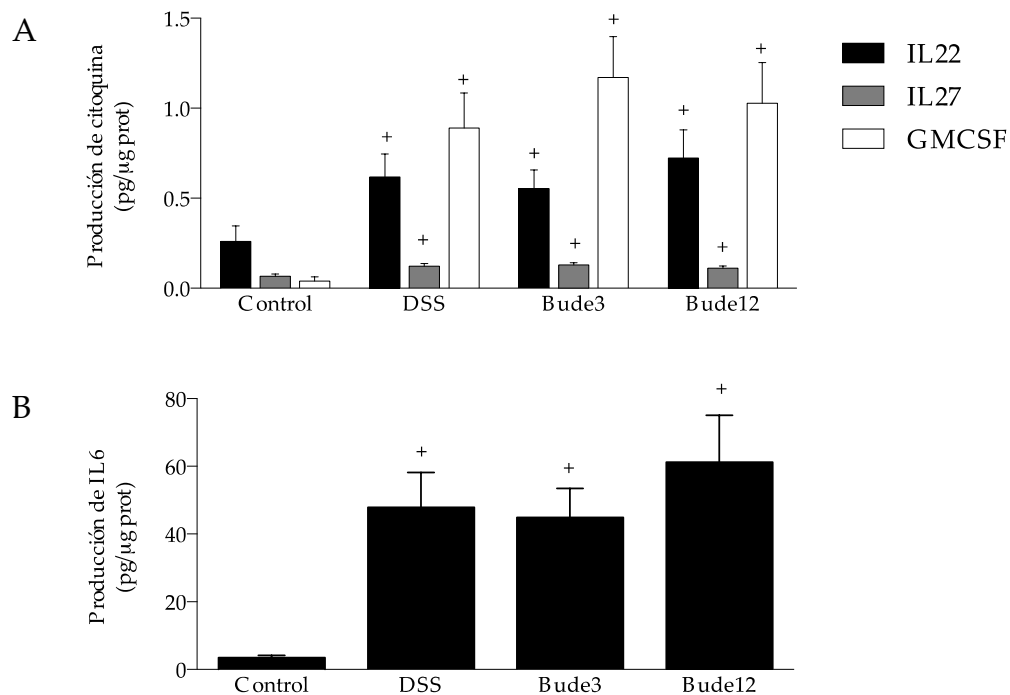




**Figura 51:** Estudio hematológico en sangre extraída el día del sacrificio de los animales. (A) Linfocitos ( $10^3/\mu\text{l}$ ); (B) monocitos ( $10^3/\mu\text{l}$ ); (C) eritrocitos ( $10^6/\mu\text{l}$ ); (D) hemoglobina (g/dl); (E) hematocrito (%). Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs Control; \*  $p < 0.05$  vs DSS. Bude=budesonida.

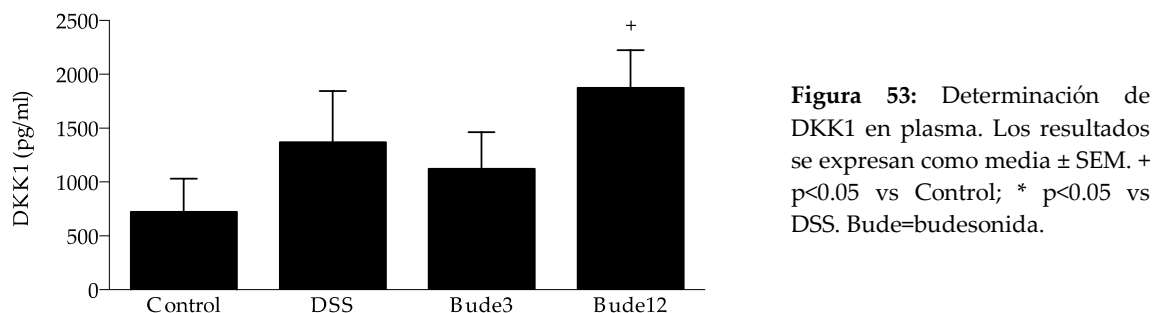
Con objeto de evaluar la producción de citoquinas de carácter inflamatorio y al mismo tiempo citoprotector sobre las células que componen el epitelio intestinal, se cuantificó la liberación de IL22, IL27, IL6 y GM-CSF por parte de fragmentos de tejido colónico cultivados *ex vivo*. Cabe recordar que la administración de budesonida (sobre todo a la dosis de 12  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$ ) durante la inducción de la colitis aguda dependiente de la administración de DSS, produjo una enorme inhibición sobre la producción de las citoquinas arriba mencionadas. En cambio, cuando el GC se administra siguiendo el patrón de administración utilizado en este caso, se produjo el esperado incremento de la misma que en todos los grupos colíticos alcanzó la significancia estadística, mientras que el tratamiento a diferencia de las evidencias obtenidas en DSS2, no generó efecto inhibitorio alguno (Fig 52 A y B).





**Figura 52:** Producción de IL22, IL27, GMCSF e IL6 por parte de explantes de tejido colónico. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs Control; \*  $p < 0.05$  vs DSS. Bude=budesonida.

Debido a la relevancia adquirida por la sepsis como el fenómeno sistémico que justifica la drámatica evolución de los animales que reciben budesonida durante la colitis aguda inducida por DSS, a modo comparativo se decidió evaluar si dicho fenómeno concurría también en este caso. Con objeto de aclarar este extremo, se analizó la presencia de bacterias aerobias y anaerobias en los MLN de estos animales, siguiendo el mismo protocolo aplicado en DSS2, así como la presencia de LPS en hígado. En ambos casos, no se obtuvo evidencia alguna de translocación bacteriana o de sus antígenos a tejidos extraintestinales, ya que en el primer caso no se detectó ninguna bacteria viable en ningún animal y en el segundo los valores obtenidos se encontraron por debajo de la curva patrón aplicada (datos no mostrados).



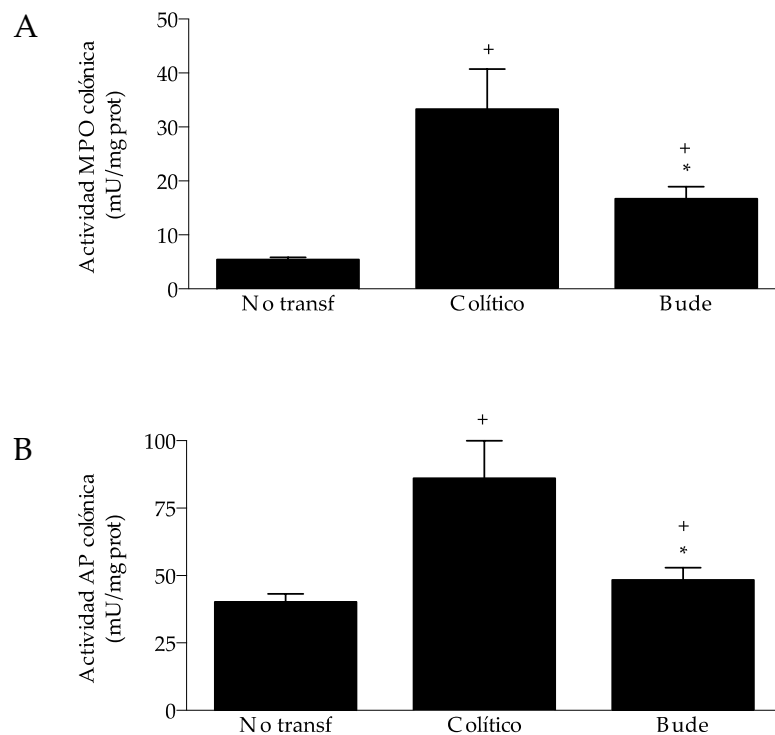
**Figura 53:** Determinación de DKK1 en plasma. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs Control; \*  $p < 0.05$  vs DSS. Bude=budesonida.

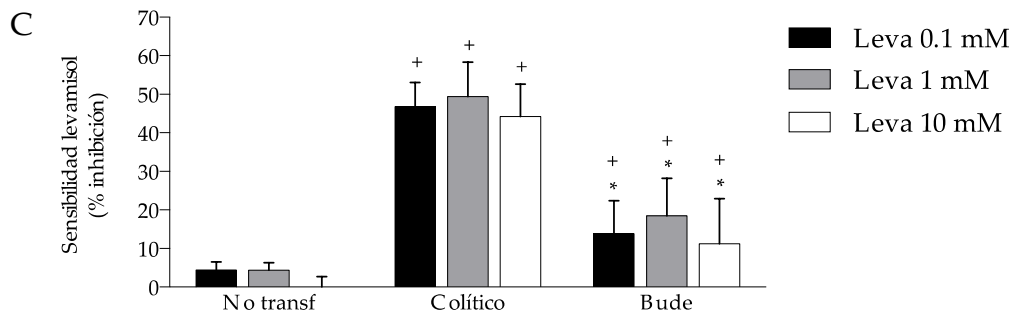
Del mismo modo que en el análisis de DSS2 y DSS-PGF, en este caso se cuantificó DKK1 en plasma, observándose un leve incremento del mismo como consecuencia del proceso inflamatorio que se vió potenciado de forma sutil por la budesonida ensayada a 12  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$  (Fig. 53).

#### 1.4. Efecto de la budesonida sobre la colitis experimental inducida mediante transferencia linfocitaria

Una vez definido el efecto de la budesonida sobre la colitis aguda inducida por DSS, siendo este contrapuesto con el que presenta cuando este GC es administrado siguiendo un protocolo de pre-tratamiento, decidimos comparar asimismo su efecto sobre un modelo no químico, de carácter crónico y más cercano a la fisiopatología real de la EII en humanos. En este sentido, el modelo disponible hoy en día que mejor recoge estas características es el de la colitis inducida por transferencia linfocitaria.

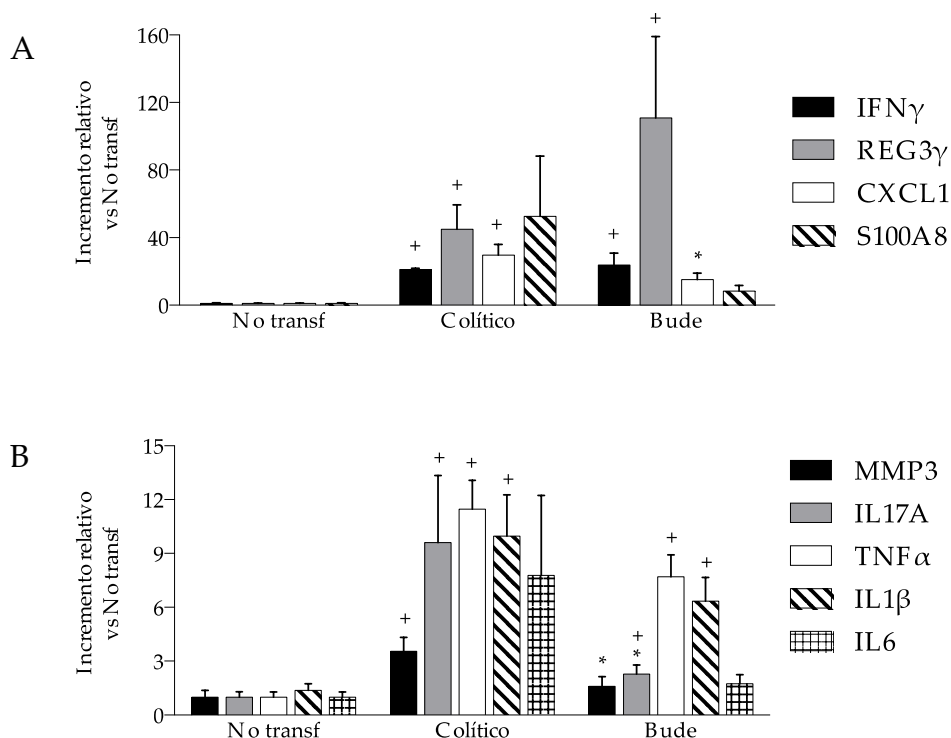
A modo de primera aproximación, se realizó un **estudio preliminar** acerca del efecto de la budesonida administrada vía oral durante **12 días** a una dosis elevada de **60 µg/ratón/día**. La administración de budesonida se asoció con una mejora del proceso inflamatorio establecido en los animales, que quedó claramente evidenciada por una ganancia de peso del  $6.7 \pm 2.5\%$  para el grupo tratado en el día 4 de tratamiento, mientras que los ratones colíticos no tratados sufrieron una caída del  $4.1 \pm 1.8\%$  durante el mismo intervalo de tiempo. Curiosamente, desde el día 6 en adelante la evolución del peso del grupo colítico tratado adquirió una pendiente negativa que lo hizo ir aproximándose paulatinamente a la línea seguida por el colítico no tratado. A pesar de tratarse de un experimento meramente orientativo sobre los efectos de la budesonida en este modelo experimental de colitis, se analizaron algunos parámetros inflamatorios que arrojan algo de luz sobre la eficacia antiinflamatoria del GC. En primer lugar, se realizó la determinación de las actividades enzimáticas MPO y AP en tejido colónico. Como queda reflejado en las figuras 54 A-C, la budesonida produjo un marcado descenso de las mismas que se vió acompañado de una significativa normalización de la sensibilidad de la actividad AP al inhibidor levamisol ensayada *in vitro*.





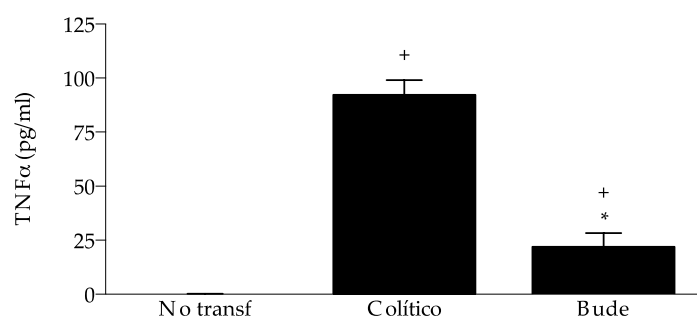
**Figura 54:** Determinación de actividades enzimáticas en el tejido colónico. (A) MPO (mU/mg prot); (B) AP (mU/mg prot); (C) sensibilidad de AP a levamisol (% de inhibición de la actividad AP). Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. +  $p<0.05$  vs No transf; \*  $p<0.05$  vs Colítico. Bude=budesonida, Leva=levamisol.

Asimismo, se estudió la inflamación en el propio tejido colónico mediante PCR a tiempo real. Como se puede observar en las figuras 55 A y B, se obtuvo un aumento estadísticamente significativo en el grupo colítico de todos los marcadores típicamente asociados a la inflamación intestinal si se compara con el grupo no transferido. Por su parte, la budesonida redujo de forma consistente la expresión de CXCL1, MMP3 e IL17A, mientras en el caso de  $TNF\alpha$ , S100A8, IL1 $\beta$  e IL6 produjo una notable reducción que no llegó a alcanzar la significancia estadística. Sorprendentemente, el tratamiento con el GC no modificó de forma sustancial la expresión de  $IFN\gamma$  o REG3 $\gamma$  en esta aproximación experimental.



**Figura 55:** Estudio de la expresión génica de marcadores inflamatorios en tejido colónico completo. (A)  $IFN\gamma$ , REG3 $\gamma$ , CXCL1 y S100A8; (B) MMP3, IL17A,  $TNF\alpha$ , IL1 $\beta$  e IL6. Los resultados se expresan en forma de incremento relativo respecto al grupo No transf y como media  $\pm$  SEM. +  $p<0.05$  vs No transf; \*  $p<0.05$  vs Colítico. Bude=budesonida.

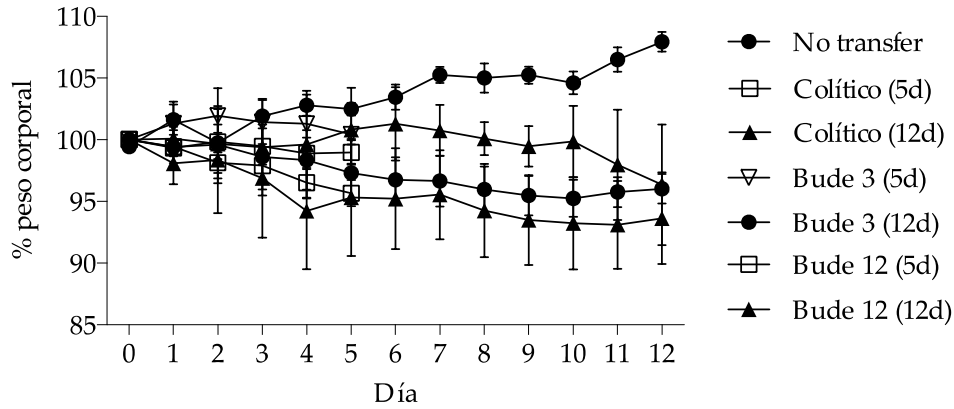
En el modelo experimental de colitis inducida por transferencia linfocitaria, el segmento intestinal que se encuentra más afectado es el colon, aunque los diferentes segmentos que componen el intestino delgado presentan también cierta afectación. Independientemente de la inflamación intestinal, clásicamente se produce una elevación de las citoquinas del sello Th1 a nivel sistémico, por lo que se decidió cuantificar el TNF $\alpha$  en plasma. A este nivel, la administración de budesonida redujo dramáticamente el incremento de dicha citoquina asociado al desarrollo del propio modelo (Fig 56).



**Figura 56:** Determinación de TNF $\alpha$  en plasma mediante ELISA. Los resultados se expresan en pg/ml y en forma de media  $\pm$  SEM. + p<0.05 vs No transf; \* p<0.05 vs Colítico. Bude=budesonida.

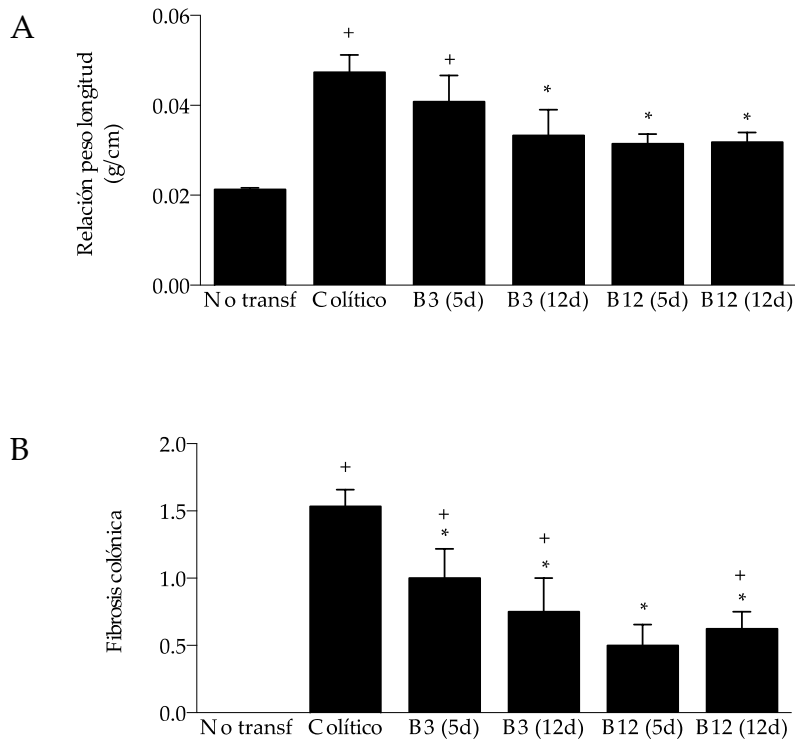
La aproximación preliminar anteriormente descrita, nos aportó evidencias consistentes que apuntaban a que el efecto antiinflamatorio de la budesonida en este modelo, que en cualquier caso era esperable, no se veía acompañado de efectos perjudiciales de índole similar a los descritos en capítulos anteriores cuando esta es administrada en el modelo de colitis aguda inducida por DSS. No obstante, nos parecía imprescindible realizar un estudio más completo del modo en que este GC modula la inflamación intestinal en este modelo experimental concreto, así como sus efectos sobre la función de barrera intestinal, de forma que se pudiera establecer una comparación completa con todas las evidencias arrojadas por el estudio anteriormente descrito sobre el modelo de DSS. Con objeto de facilitar la interpretación de los resultados y el establecimiento de conclusiones derivadas de la comparación de los efectos de la budesonida en ambos modelos, en el **experimento definitivo** de transferencia linfocitaria se usaron las mismas dosis aplicadas en DSS2 y DSS3, es decir, **3 y 12  $\mu$ g/ratón/día**, administradas cada una de ellas durante **5 y 12 días**.

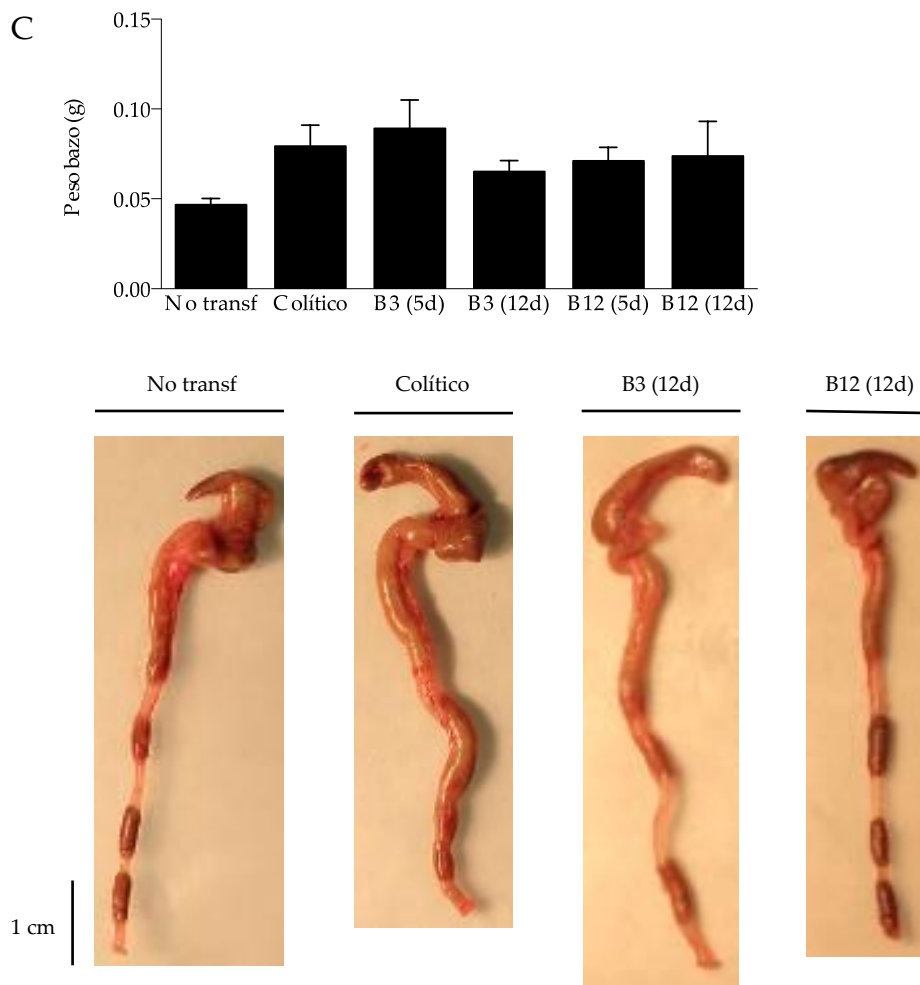
En primer lugar, resulta imprescindible hacer referencia a los efectos sobre la evolución del peso corporal de los animales incluidos en el experimento. Como se puede observar en la figura 57, este parámetro no arroja datos concluyentes en ningún sentido dado que las diferencias entre los grupos mutuamente comparables no superan el 5% en ningún caso. Además, no se observa una pérdida de peso consistente en el grupo colítico no tratado, probablemente debido al criterio de selección de animales colíticos utilizado que incluye como requisito una pérdida de peso mínima del 10% previa a la inclusión del animal en el experimento. Teniendo en cuenta que se trata de un modelo de inflamación crónica, este hecho dificulta la obtención de una pendiente negativa en la evolución del peso de este grupo durante el desarrollo de la fase experimental propiamente dicha. No obstante, si se compara el grupo colítico seguido durante 12 días con los tratados con budesonida durante ese período de tiempo, aquellos que recibieron el GC sufren una ligera pérdida de peso que en ningún caso resultó significativa desde el punto de vista estadístico. Es importante recordar que todas las determinaciones de tipo analítico realizadas en este experimento y que se detallan a continuación, consideran un único grupo colítico no tratado conjunto.



**Figura 57:** Evolución del peso corporal de los animales incluidos en el experimento de transferencia linfocitaria definitivo. Los resultados son expresados como % de peso tomando como referencia el día del comienzo del experimento y son representados en forma de media  $\pm$  SEM por grupo y día. (n=5-15). Bude=budesonida, d=días.

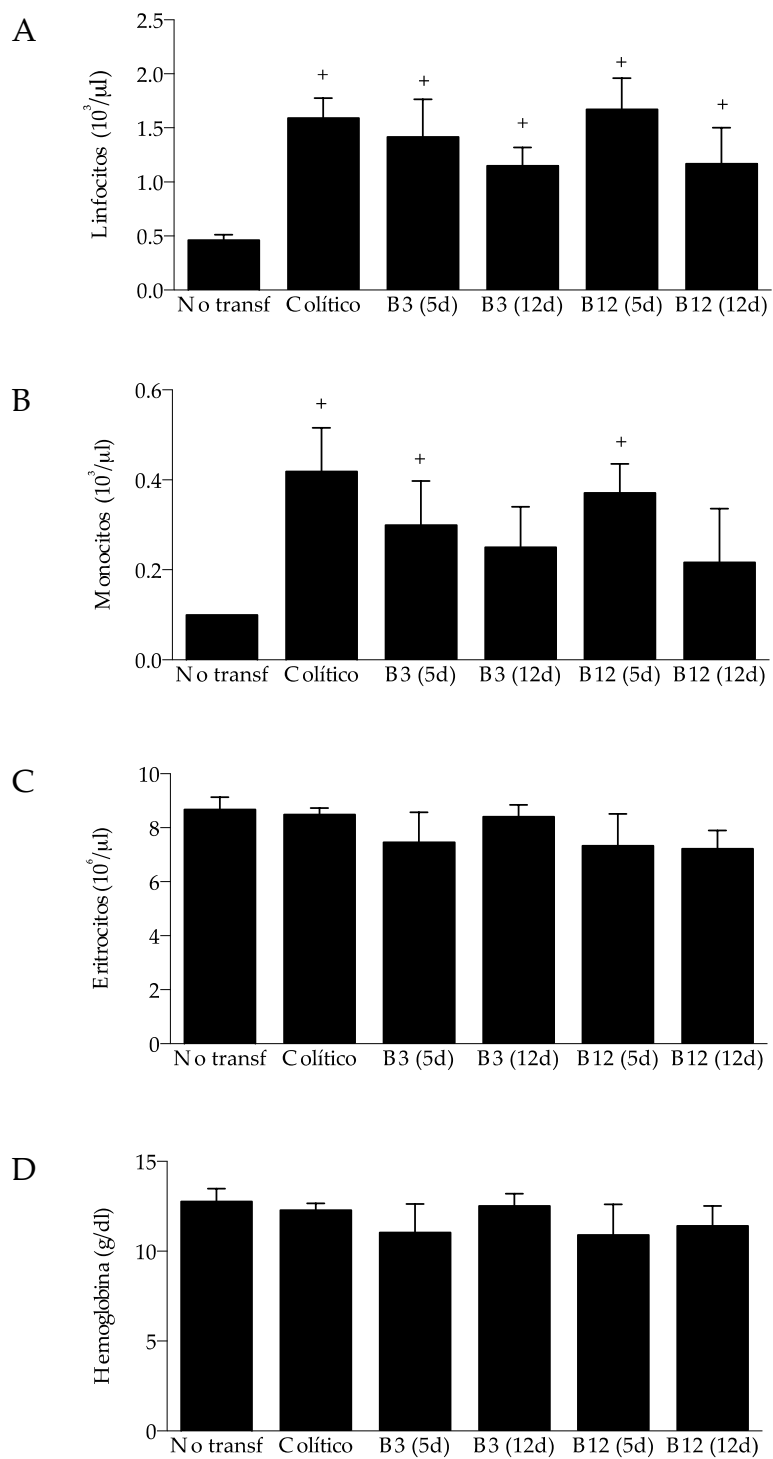
Nuestra primera intención fue la de corroborar mediante un estudio exhaustivo las evidencias antes descritas, las cuales apuntaban a un consistente efecto antiinflamatorio por parte de la budesonida en este modelo experimental. Dicho efecto queda puesto de manifiesto por la reducción de la relación peso/longitud y la fibrosis a nivel colónico macroscópicamente juzgada, la cual muestra un cierto patrón de tipo tiempo y dosis dependiente (Fig 58 A y B). Por su parte, el peso del bazo se incrementó como consecuencia del proceso inflamatorio, pero no se observó modulación del mismo por la administración del GC (Fig 58 C).

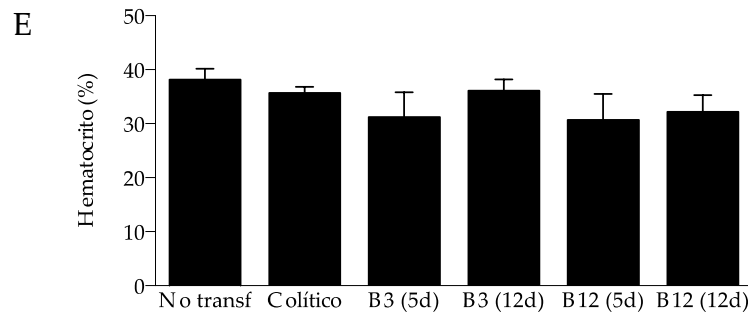




**Figura 58:** Marcadores inflamatorios de tipo macroscópico. (A) Relación peso/longitud colónica (g/cm); (B) fibrosis colónica (UA); (C) peso de bazo (g) (D) Imágenes representativas del colon durante la necropsia. Los datos son presentados en forma de media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs No transf; \*  $p < 0.05$  vs Colítico. B=budesonida, d=días, UA=unidades arbitrarias.

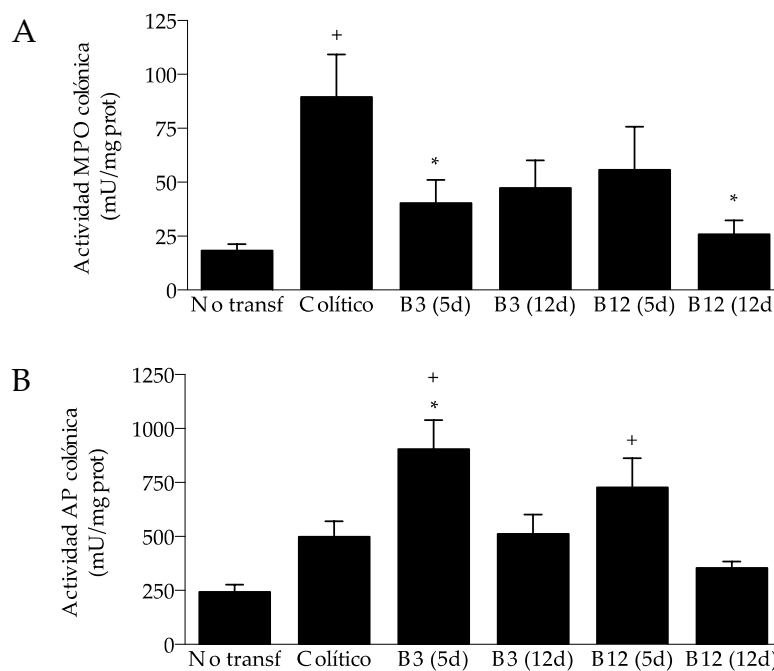
Siguiendo un protocolo de evaluación similar al utilizado en los experimentos *in vivo* referentes al modelo de DSS, se realizó un estudio hematológico centrado en los mismos parámetros analizados en ese caso. En esta ocasión, se produjo una elevación de la concentración de linfocitos y monocitos en sangre asociada al modelo inflamatorio, sin que esto se encontrara modulado significativamente por la budesonida (Fig 59 A y B). En lo referente a la concentración de hemoglobina y eritrocitos en sangre, así como al hematocrito, ni la inflamación ni la administración de budesonida generaron efecto alguno. Esto refleja que el sangrado rectal no ejerce un papel relevante en la evolución de los animales en este modelo, a diferencia de lo que sucede en la colitis inducida por DSS (Fig 59 C-E).



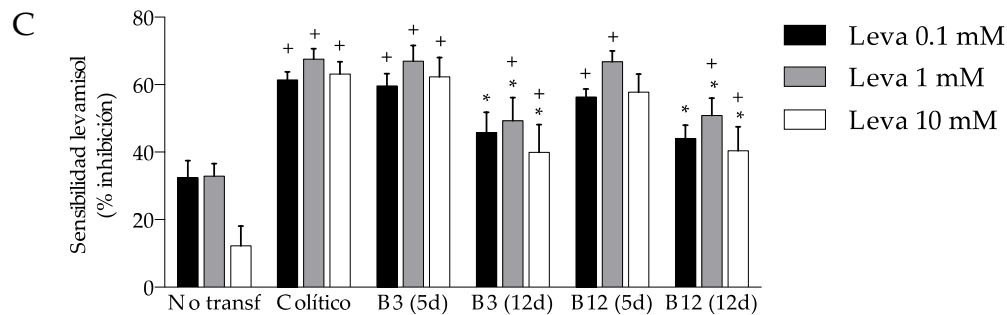


**Figura 59:** Estudio hematológico en sangre extraída el día del sacrificio de los animales. (A) Linfocitos ( $10^3/\mu\text{l}$ ); (B) monocitos ( $10^3/\mu\text{l}$ ); (C) eritrocitos ( $10^6/\mu\text{l}$ ); (D) hemoglobina (g/dl); (E) hematocrito (%). Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs No transf; \*  $p < 0.05$  vs Colítico. B=budesonida, d=días.

La determinación de la actividad enzimática MPO en tejido colónico reveló el esperable aumento de la misma en el grupo colítico no tratado, que al compararlo con la del grupo no transferido se encuentra incrementada alrededor de 4 veces. La administración de budesonida redujo drásticamente dicho fenómeno, siendo esta modulación significativa a nivel estadístico únicamente en los grupos B3(5d) y B12(12d) (Fig 60 A). Además se estudió la actividad AP colónica, obteniéndose en este caso un aumento relativamente sutil en el grupo colítico, que no se vió sustancialmente reducido por el GC en ninguna de las condiciones ensayadas. Esta fue incluso mayor en el caso del grupo B3(5d) (Fig 60 B). Curiosamente, el aumento de la sensibilidad al inhibidor levamisol que clásicamente se produce de forma asociada a la inflamación en la actividad AP intestinal, sí fue significativamente inhibido por la administración de budesonida a ambas dosis, aunque únicamente cuando se administró durante 12 días (Fig 60 C).

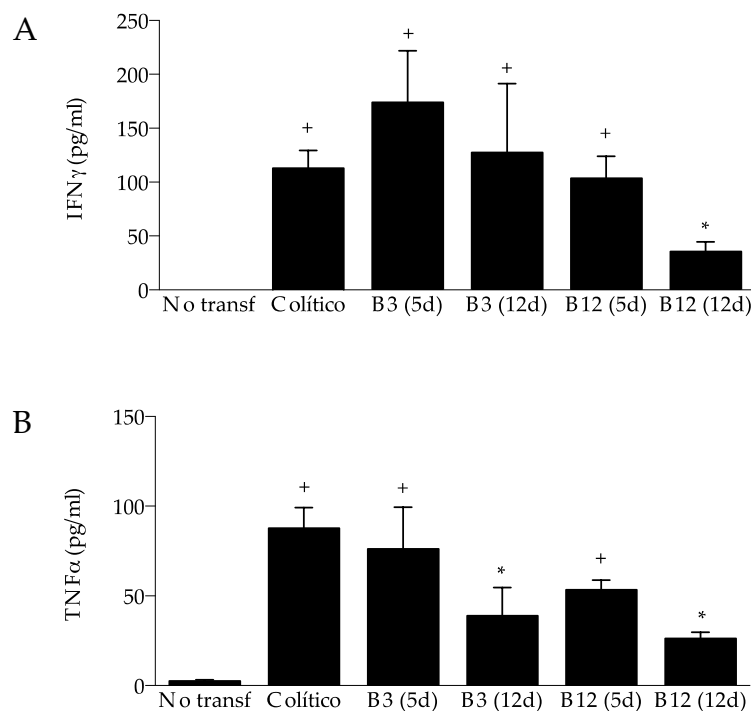






**Figura 60:** Determinación de actividades enzimáticas en el tejido colónico. (A) MPO (mU/mg prot); (B) AP (mU/mg prot); (C) sensibilidad de AP a levamisol (% de inhibición de la actividad AP). Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs No transf; \*  $p < 0.05$  vs Colítico. B=budesonida, d=días, Leva=levamisol.

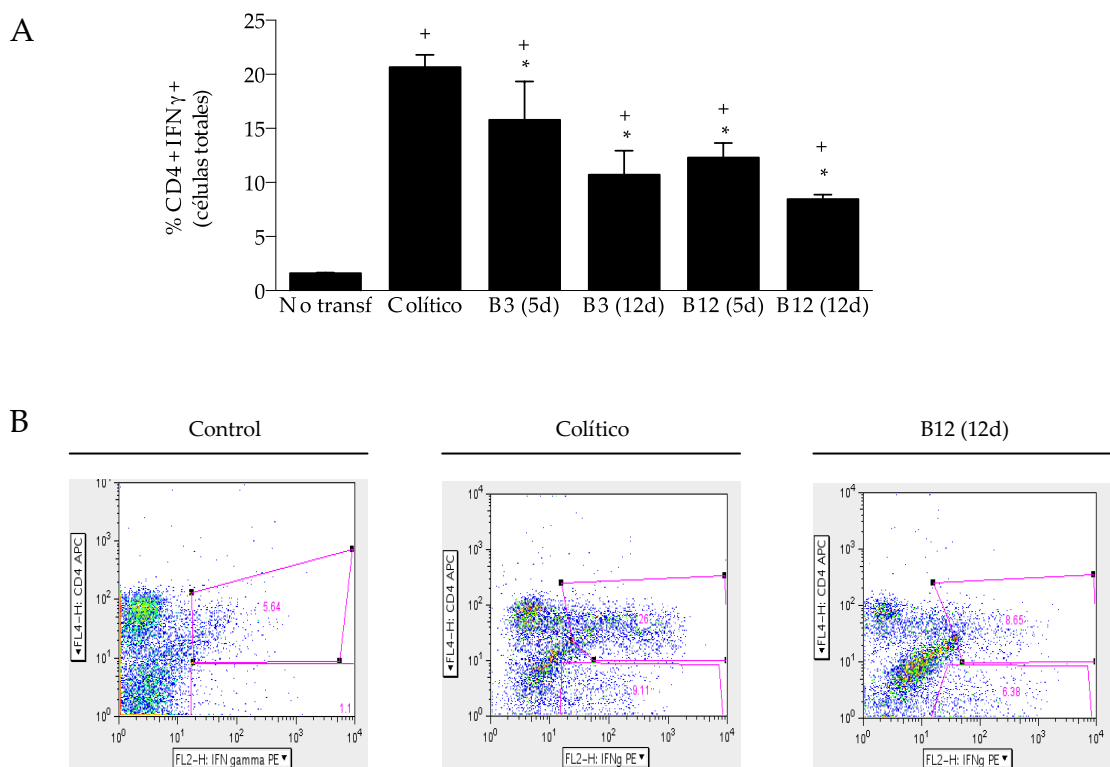
Con el objetivo de poner de manifiesto los efectos de la budesonida sobre el componente sistémico del proceso inflamatorio de origen intestinal, se cuantificaron dos citoquinas Th1 que clásicamente ven aumentada su concentración plasmática en este modelo,  $IFN\gamma$  y  $TNF\alpha$ . En ambos casos se observó una elevación de la concentración del analito en el grupo colítico no tratado, mientras que la administración del GC atenuó significativamente dicho incremento de un modo tiempo y dosis dependiente (Fig 61 A y B).



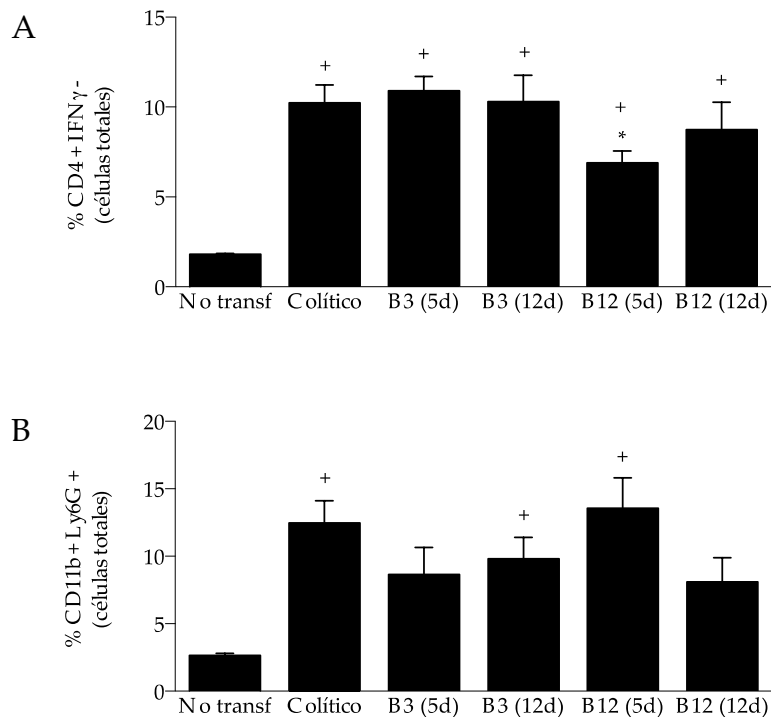
**Figura 61:** Cuantificación de citoquinas en plasma mediante ELISA. (A)  $IFN\gamma$  (pg/ml); (B)  $TNF\alpha$  (pg/ml). Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs No transf; \*  $p < 0.05$  vs Colítico. B=budesonida, d=días.

El modelo de colitis experimental por transferencia linfocitaria se encuentra a nivel fisiopatológico mediado por una respuesta de mixta tipo Th1 y Th17 asociada a células T inmunoactivas en el entorno intestinal. Por tanto, analizamos mediante citometría de flujo la

actividad inmunológica a nivel linfocitario, estudiando la proporción de células T CD4<sup>+</sup> productoras de IFN $\gamma$  dentro de una población celular purificada de los MLN. Como es lógico, se observó un aumento de unas 10 veces en el grupo colítico en comparación con el no transferido. Además, la administración de budesonida produjo un descenso de dicha proporción que alcanzó la significancia estadística en todas las condiciones experimentales ensayadas, reflejando de nuevo un perfil inmunosupresor de tipo tiempo y dosis dependiente sobre el tipo celular clásicamente considerado como conductor de la respuesta inflamatoria inherente a este modelo (Fig. 62 A y B). Además, se estudió también por citometría de flujo el efecto de la budesonida sobre la producción de IFN $\gamma$  por parte de fuentes alternativas a las células T CD4<sup>+</sup>. En este caso, se produce una elevación de la proporción de células productoras de la citoquina en el grupo colítico no tratado, mientras que la budesonida por lo general no moduló dicho fenómeno (Fig 63 A). Finalmente, se analizó la presencia de neutrófilos en los MLN derivados de procesos infiltrativos asociados a la respuesta inflamatoria, en virtud de su expresión concomitante de los marcadores de superficie Ly6G y CD11b. De la misma forma que en el caso anteriormente comentado, estos aumentaron con la inflamación, sin verse este fenómeno modificado por la administración de budesonida (Fig 63 B).

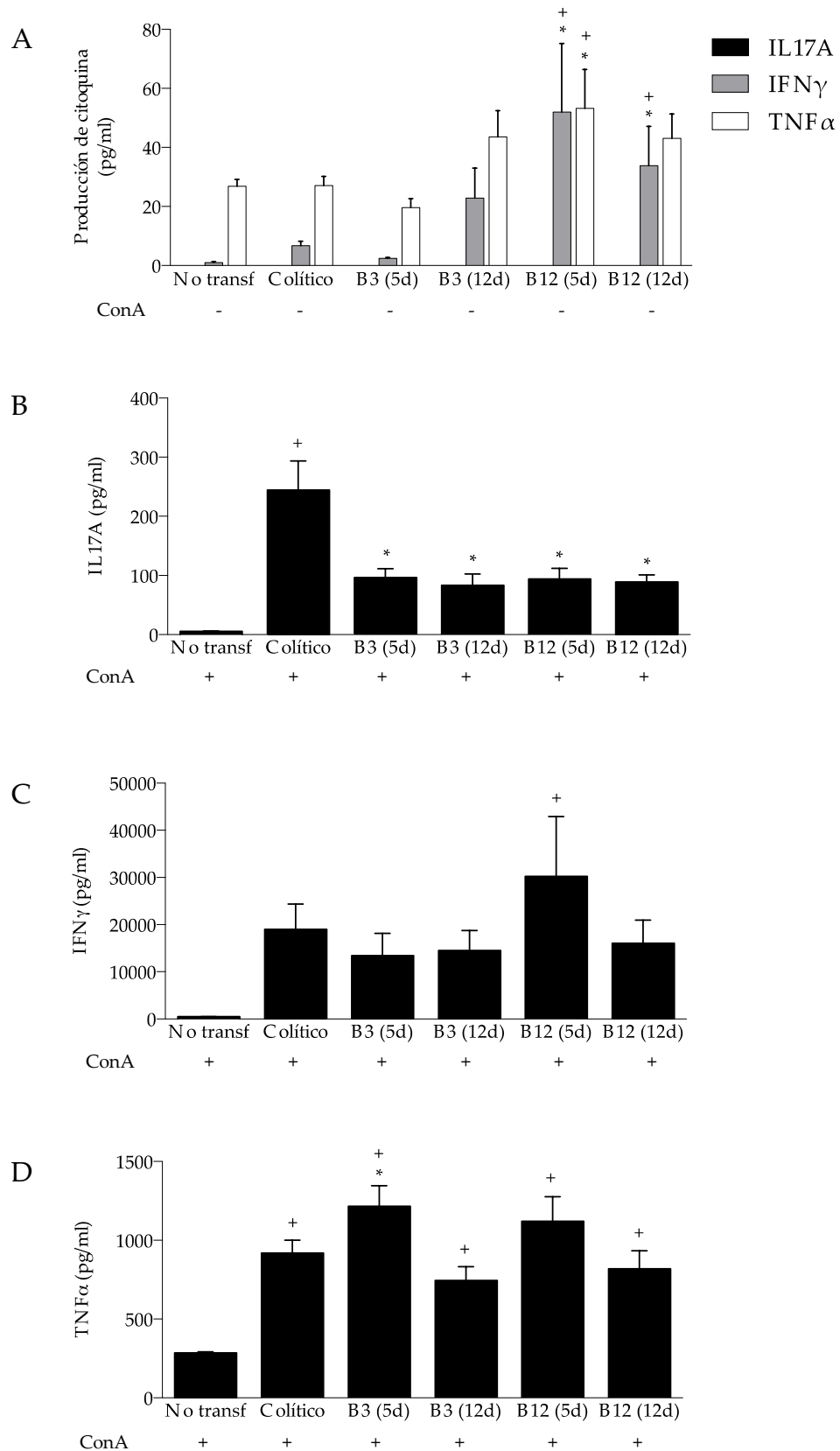


**Figura 62:** Análisis mediante citometría de flujo de la presencia relativa de células T productoras de IFN $\gamma$  en las células extraídas de los MLN. (A) % de células CD4<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> en el total de células extraídas de los MLN; (B) gráficas de puntos representativas del resultado presentado en A. Los resultados son expresados como media  $\pm$  SEM. + p<0.05 vs No transf; \* p<0.05 vs Colítico. B=budesonida, d=días.



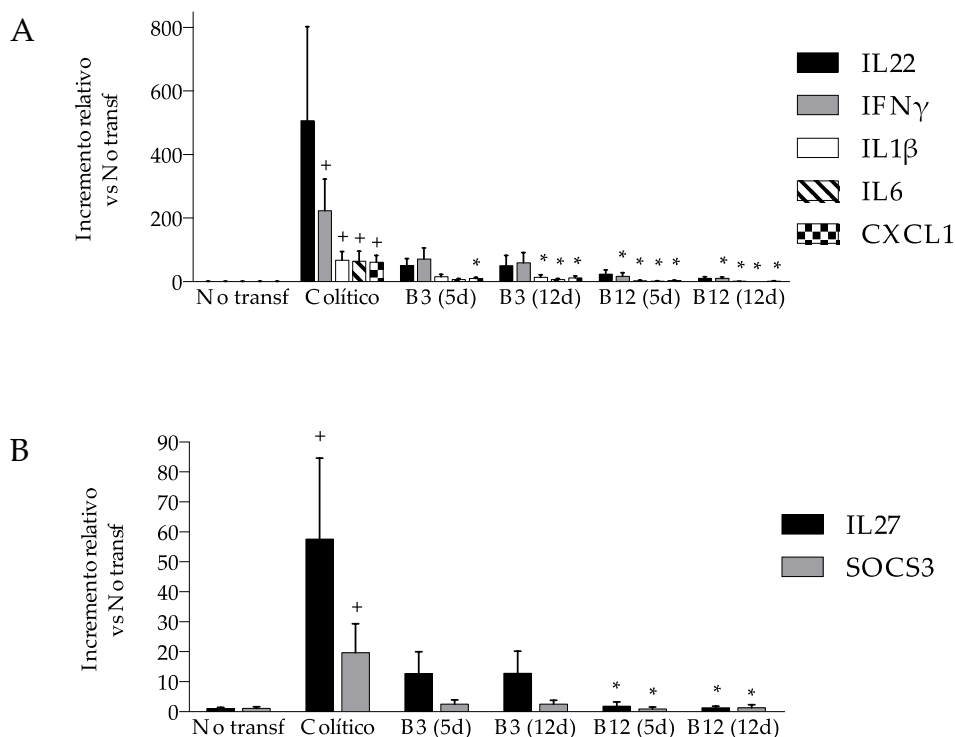
**Figura 63:** Análisis mediante citometría de flujo de las células purificadas de los MLN. (A) % de CD4-IFN $\gamma$ + en el total de células extraídas de los MLN; (B) % CD11b+ Ly6G+ en el total de células extraídas de los MLN. Los resultados son expresados como media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs No transf; \*  $p < 0.05$  vs Colítico. B=budesonida, d=días.

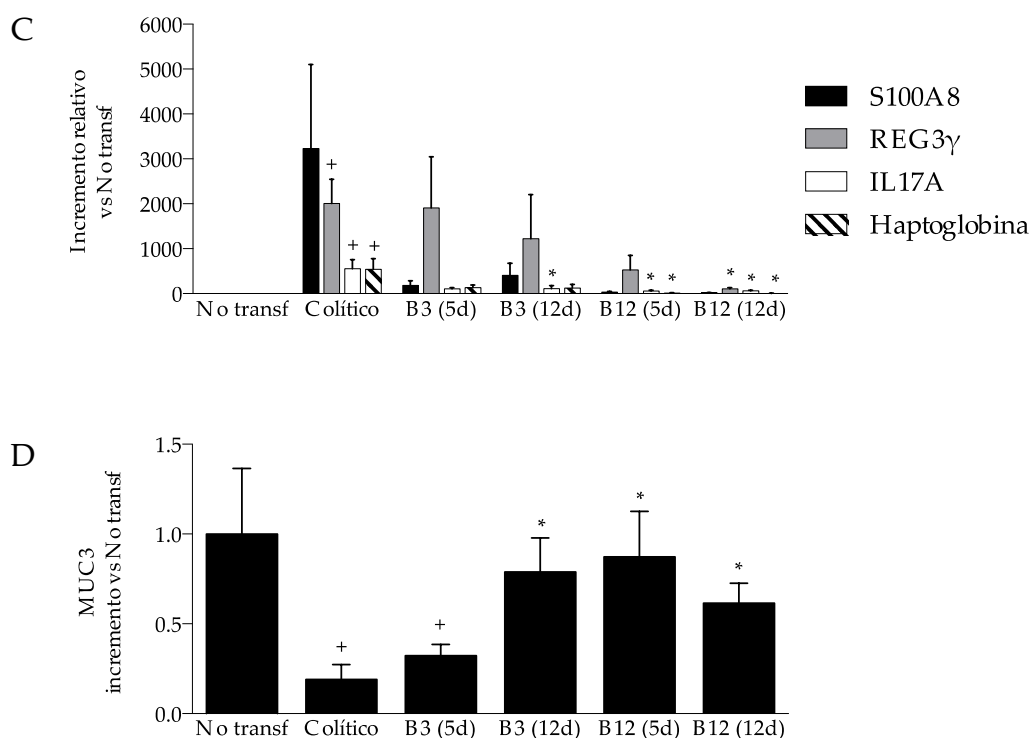
De forma paralela al estudio realizado mediante citometría de flujo, cultivamos *ex vivo* durante 48 horas y con una densidad celular constante de 1 millón/ml, las células extraídas del bazo de los ratones incluidos en este estudio. Además, este cultivo se dispuso bajo estimulación con la lectina concanavalina A (ConA) y en ausencia de estímulo alguno. En el sobrenadante de dichos cultivos se determinaron mediante ELISA, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  como representantes del sello Th1, mientras que la IL17A se incluyó como citoquina tipo Th17. En condiciones de ausencia de estimulación cuyos resultados aparecen representados en la figura 64 A, no se detectó IL17A en ninguna de las condiciones experimentales ensayadas, mientras que para TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  que sí aparecieron en concentración detectable, sorprendentemente no se produjo un incremento en el grupo colítico. Aún más sorprendente atendiendo a los resultados presentados hasta ahora, es el hecho de que las células obtenidas de los animales que recibieron budesonida a la dosis mayor fueron las únicas que vieron elevada su producción citoquímica por encima del grupo no transferido. En lo referente a los resultados obtenidos en condiciones de estimulación inespecífica de células T mediante ConA, la IL17A apareció consistentemente incrementada en el grupo colítico no tratado, mientras que la administración de budesonida inhibió drásticamente dicho fenómeno en todos los casos (Fig 64 B). Sin embargo, la determinación de TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  en estas condiciones volvió a arrojar resultados que no reflejan el marcado efecto antiinflamatorio sugerido por los datos mostrados hasta ahora, ya que en ninguna de las condiciones experimentales ensayadas se produjo una reversión significativa del incremento de la producción de estas citoquinas que mostró el grupo colítico no tratado (Fig. 64 C y D).



**Figura 64:** Cuantificación de IL17A, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  en cultivos *ex vivo* de células totales obtenidas de bazo. (A) Células no estimuladas; (B, C y D) células estimuladas con ConA (5  $\mu$ g/ml). Los resultados son expresados en todo caso en pg/ml y en forma de media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs No transf; \*  $p < 0.05$  vs Colítico. B=budesonida, d=días, ConA=concanavalina A.

Para finalizar el estudio sobre el efecto de tipo antiinflamatorio e inmunosupresor de la budesonida en el modelo de colitis experimental inducida por transferencia linfocitaria, estudiamos la expresión génica en tejido colónico completo de diferentes marcadores inflamatorios clásicamente incrementados en dicho modelo. Como se puede comprobar en la figura 65 A, de un modo inherente al desarrollo del modelo experimental se produjo un incremento de la expresión de IL22, IFN $\gamma$ , IL1 $\beta$ , IL6 y CXCL1. Dicho fenómeno fue revertido de forma significativa por la administración de budesonida independientemente de la dosis o la duración del tratamiento en cuestión. Resultados similares se obtuvieron al analizar la expresión de IL27 y SOCS3, pero a pesar de que el aumento de la misma asociado al modelo fue extensamente reducido por el GC, dicho efecto solo alcanzó la significancia estadística en el caso de la dosis de 12  $\mu$ g/ratón/día (Fig. 65 B). Otros genes cuya expresión aumenta notablemente a nivel colónico en este modelo son S100A8, REG3 $\gamma$ , IL17A y haptoglobina. Como se podía esperar, la expresión de los genes antes citados apareció muy aumentada en el grupo colítico no tratado, mientras que la administración exógena de budesonida la normalizó de forma notoria, siendo dicho efecto más intenso al aumentar la dosis y el tiempo de administración de la misma (Fig. 65 C). Además se analizó la expresión de MUC3 por su contribución a la función de barrera intestinal desde un punto de vista meramente físico, y el modo en que esta se encontró modulada por la budesonida en el experimento DSS1. La inflamación intestinal propia de este modelo genera un descenso de la expresión de esta mucina que ronda las 5 veces, siendo dicha inhibición revertida por la administración del GC siguiendo un perfil que refleja una clara dependencia de la dosis y el tiempo (Fig 65 D).

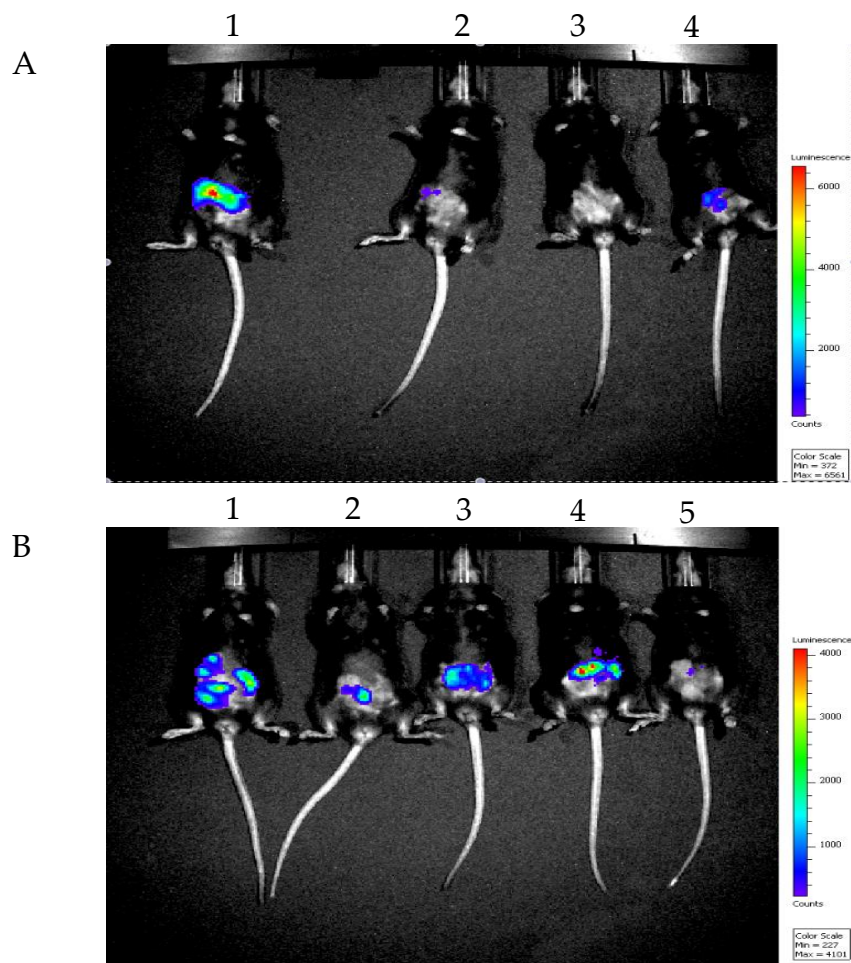




**Figura 65:** Estudio de la expresión génica de marcadores inflamatorios en tejido colónico completo. (A) IL22, IFN $\gamma$ , IL1 $\beta$ , IL6 y CXCL1; (B) IL27 y SOCS3; (C) S100A8, REG3 $\gamma$ , IL17A y haptoglobina; (D) MUC3. Los resultados son expresados como incremento relativo vs No transf y en forma de media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs No transf; \*  $p < 0.05$  vs Colítico. B=budesonida, d=días.

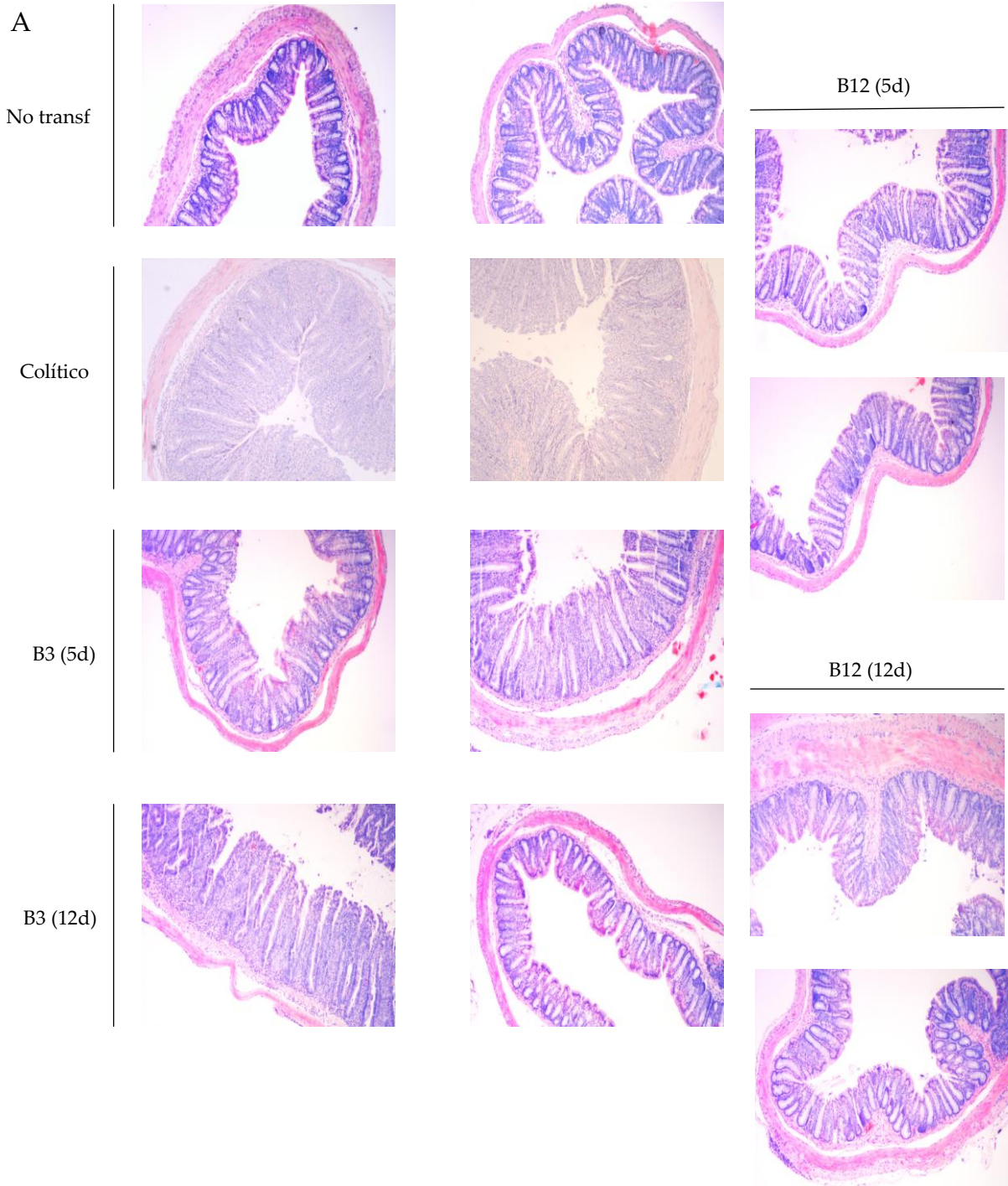
La eficacia antiinflamatoria de la budesonida en este modelo de colitis experimental ha sido puesta de manifiesto a lo largo de este apartado mediante diferentes enfoques técnicos. No obstante, decidimos obtener evidencias de tipo visual que ilustraran gráficamente los resultados anteriormente expuestos.

Para conseguir esto, haciendo uso del reactivo L012 Wako® y el dispositivo IVIS Spectrum atendiendo a las condiciones descritas en el apartado correspondiente de la sección de material y métodos, obtuvimos las capturas de imagen representadas en las figuras 66 A y B. En ellas, la señal de fluorescencia generada en el foco inflamatorio del animal, capturada por el dispositivo y representada en forma de gradiente de color por el software acoplado, es directamente proporcional a la presencia de especies reactivas de oxígeno que se acumulan en las zonas de inflamación. En este caso, se observa como los animales colíticos no tratados ofrecen una intensa señal localizada a nivel anatómico en el abdomen inferior que coincide con la ubicación del colon. Dicha señal, generalmente es bastante inferior en aquellos animales que recibieron budesonida, aunque paradójicamente esta inhibición parece ser algo más evidente en aquellos que recibieron la dosis de 3  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$ .

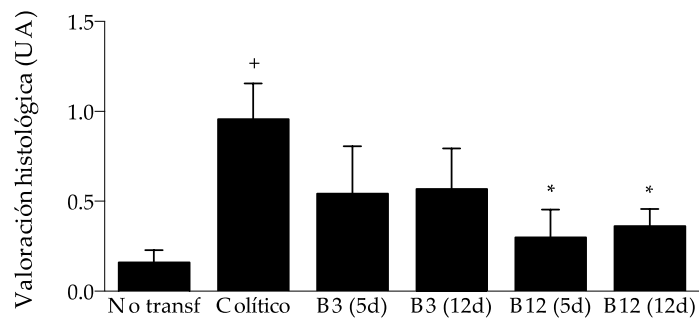


**Figura 66:** Imágenes representativas del análisis del estado inflamatorio de los animales incluidos en este experimento mediante captura de imagen *in vivo*. Este estudio fue realizado el día previo al sacrificio programado de los animales. (A) (1) Colítico no tratado, (2-4) B3 (12d); (B) (1) colítico no tratado, (2-5) B12 (12d). B=budesonida, d=días.

A modo de cloenda del estudio focalizado en el tejido colónico de los animales incluidos en este experimento, se analizaron detalladamente aquellos parámetros de tipo histológico que atendiendo a nuestra experiencia previa suelen estar afectados en este modelo de colitis experimental. Como se puede observar en la figura 67 A y B, la valoración histológica objetiva de las imágenes tomadas de los cortes transversales de tejido colónico teñido con hematoxilina & eosina revela una potente inflamación intestinal inherente al desarrollo del modelo, siendo la característica más evidente la masiva infiltración leucocitaria. A diferencia del modelo de colitis inducida por DSS, en este no se produce una erosión tan marcada del epitelio de la mucosa intestinal, pero aparece una significativa respuesta hiperplásica que conduce a un evidente engrosamiento de la capa epitelial. Al analizar conjuntamente los diferentes parámetros considerados, se observa una reducción de la afectación del daño inflamatorio en general y la infiltración leucocitaria en particular, que resulta especialmente evidente si se compara los animales colíticos no tratados con aquellos que recibieron el GC durante 12 días. Este hallazgo se encuentra en la misma línea que la mayoría de los resultados obtenidos sobre el efecto de la budesonida sobre la colitis por transferencia linfocitaria.

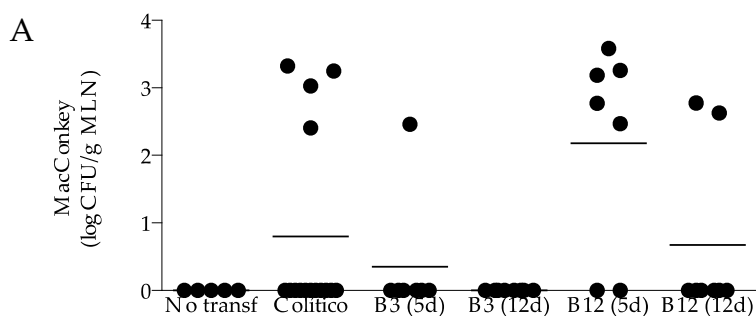


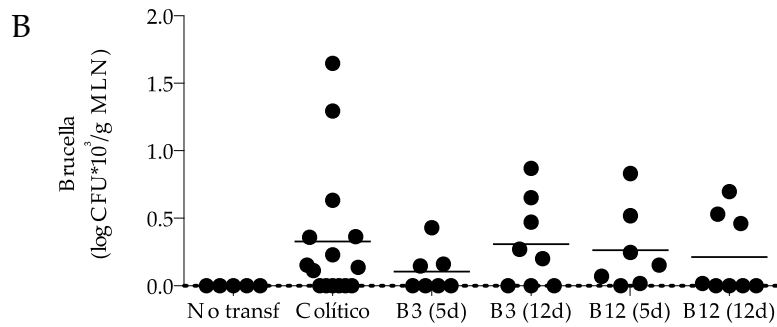




**Figura 67:** Estudio histológico del colon. (A) Imágenes histológicas (10X) de secciones transversales de tejido colónico sometidas a la tinción con hematoxilina & eosina; (B) valoración histológica objetiva expresada como media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs No transf; \*  $p < 0.05$  vs Colítico. B=budesonida, d=días, UA=unidades arbitrarias.

En capítulos anteriores, quedó demostrado que la aparición de un proceso séptico sistémico severo que se genera de un modo secundario al efecto de la budesonida a nivel intestinal cuando esta se administra durante la inducción de la colitis aguda inducida por DSS, es la razón fundamental que justifica el impacto negativo del GC sobre la evolución de los animales sometidos a dicho modelo experimental. Por tanto, nos pareció pertinente comprobar si dicho fenómeno aparecía en cierta medida cuando la budesonida se administra a ratones con inflamación intestinal inducida por transferencia linfocitaria. Para ello, se determinaron básicamente los mismos parámetros contemplados en el caso del modelo de DSS, comenzando por la detección de bacterias viables en el homogenado de los MLN y de hígado. En el caso de la translocación a MLN, de forma análoga a lo ocurrido en el modelo de DSS, la inflamación intestinal *per se* no genera una gran translocación bacteriana ya que la detección de bacterias viables en este órgano ocurre de forma meramente anecdótica entre los ratones colíticos no tratados. Sin embargo, mientras que la administración de budesonida durante la inflamación inducida por DSS generaba un dramático aumento de la translocación bacteriana a MLN, en este caso la detección de bacterias tanto aerobias como anaerobias en los animales tratados se mantuvo en valores comparables a los mostrados por los ratones colíticos no tratados (Fig. 68 A y B). Asimismo, se realizó el cultivo del homogenado hígado siendo este negativo en todos los casos, lo que resulta coherente con la determinación de LPS en dicho órgano que arrojó resultados por debajo de la curva de interpolación para todos los animales incluidos en el experimento.

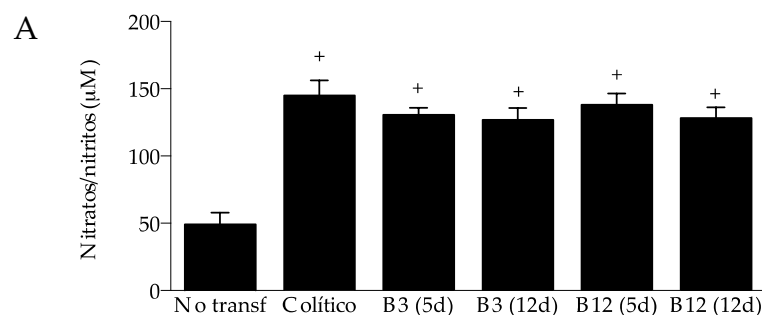


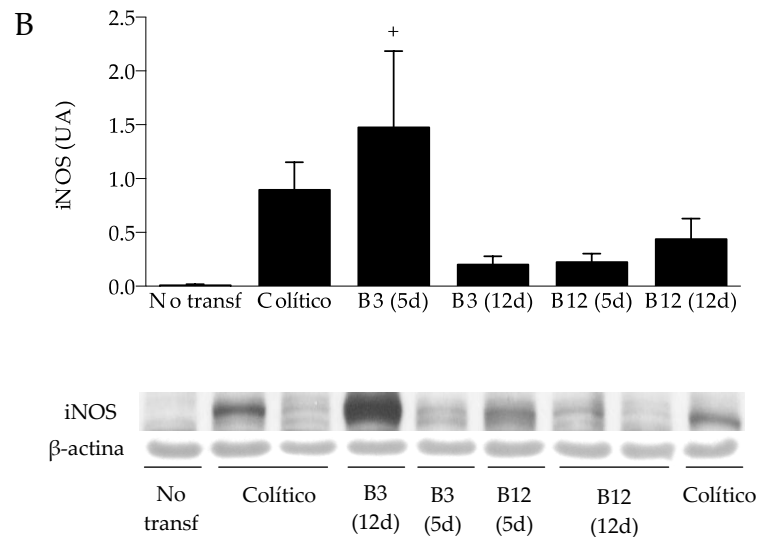


**Figura 68:** Estudio de la presencia de bacterias viables aerobias y anaerobias en los MLN. (A) Bacterias aerobias presentes en MLN cultivadas en un medio selectivo para enterobacterias (Agar MacConkey) (log CFU/g MLN); (B) Bacterias anerobias presentes en MLN cultivadas en un medio agar sangre comercial enriquecido que será denominado como Brucella (log CFU\*10<sup>3</sup>/g MLN). Los resultados son presentados como la media de cada grupo, apareciendo asimismo representado el valor individual de cada animal. + p<0.05 vs No transf; \* p<0.05 vs Colítico. B=budesonida, d=días.

En este experimento también se realizó la determinación de los nitratos/nitritos en plasma, lo que nos permitió confirmar por un lado que en el modelo de transferencia linfocitaria se produce una elevación de los mismos mucho más consistente que la que suele aparecer en la colitis inducida por DSS, y por el otro, que la administración de budesonida a los ratones manifiestamente colíticos en este modelo no genera modulación alguna de este parámetro independientemente de la dosis o pauta de administración considerada (Fig 69 A).

Para finalizar, se determinó por Western Blot la expresión proteica de iNOS en el tejido pulmonar de estos animales. En línea con los resultados detallados arriba y a diferencia de lo acontecido en el caso de la colitis inducida por DSS, la administración de budesonida no produjo un incremento significativo de este parámetro sino más bien una tendencia hacia el efecto contrario. Además, cabe destacar que en el grupo colítico no tratado se produce una robusta elevación de la expresión de esta proteína en comparación con el grupo no transferido (Fig 69 B). Este fenómeno se justifica por el descrito componente inflamatorio pulmonar que característicamente se asocia a este modelo experimental [843].





**Figura 69:** Evaluación de parámetros sistémicos asociados a la septicemia. (A) Concentración de nitratos/nitritos en plasma ( $\mu\text{M}$ ); (B) expresión proteica de iNOS en tejido pulmonar (UA). Los resultados son expresados como media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs No transf; \*  $p < 0.05$  vs Colítico. B=budesonida, d=días, UA=unidades arbitrarias.

## 2. ESTUDIOS *IN VITRO*

La realización de los estudios desarrollados *in vitro* que a continuación se describen, persigue como objetivo esencial la caracterización de las acciones moleculares de los GC sobre los diferentes tipos celulares que ejercen una contribución activa en la función de barrera intestinal, de modo que se pueda establecer una relación de los mismos con las consecuencias de la administración de budesonida a animales sometidos a colitis inducida por la administración de DSS. Aunque en la sección dedicada a los estudios *in vivo* se ha hecho uso únicamente de la budesonida por razones anteriormente aducidas, en la mayor parte de los experimentos que se describen en las siguientes páginas se han ensayado paralelamente dexametasona, prednisolona e hidrocortisona, además de la budesonida.

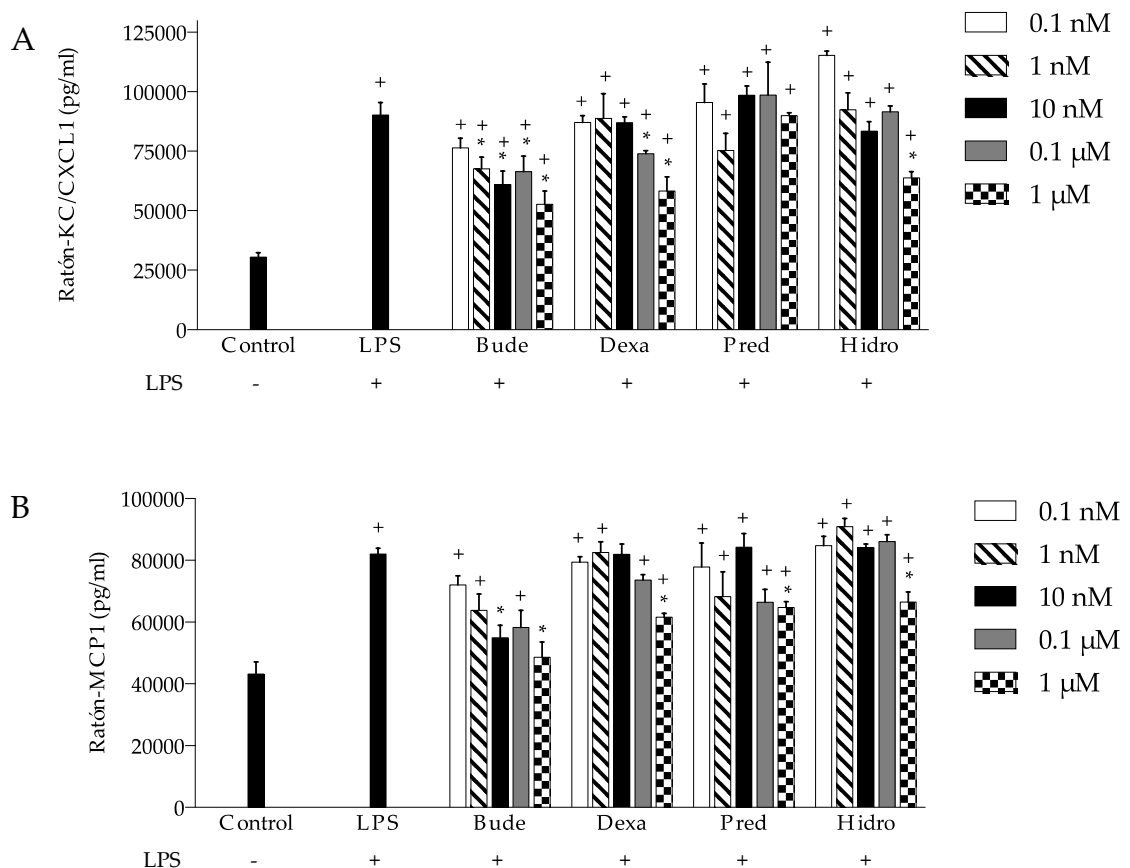
### 2.1. Estudios en células epiteliales intestinales

El tipo celular que probablemente presenta una implicación más relevante en la homeostasis intestinal es el formado por las células epiteliales intestinales. Además de ser esenciales en la conformación de la barrera epitelial desde un punto de vista meramente físico, su relevancia deriva de su capacidad para actuar como interlocutores induciendo tolerancia antigénica en el diálogo que se establece entre la microbiota intestinal y el sistema inmunitario gastrointestinal. Por esta razón, en primer lugar nos centramos en las acciones de los GC a nivel molecular sobre las células epiteliales intestinales.

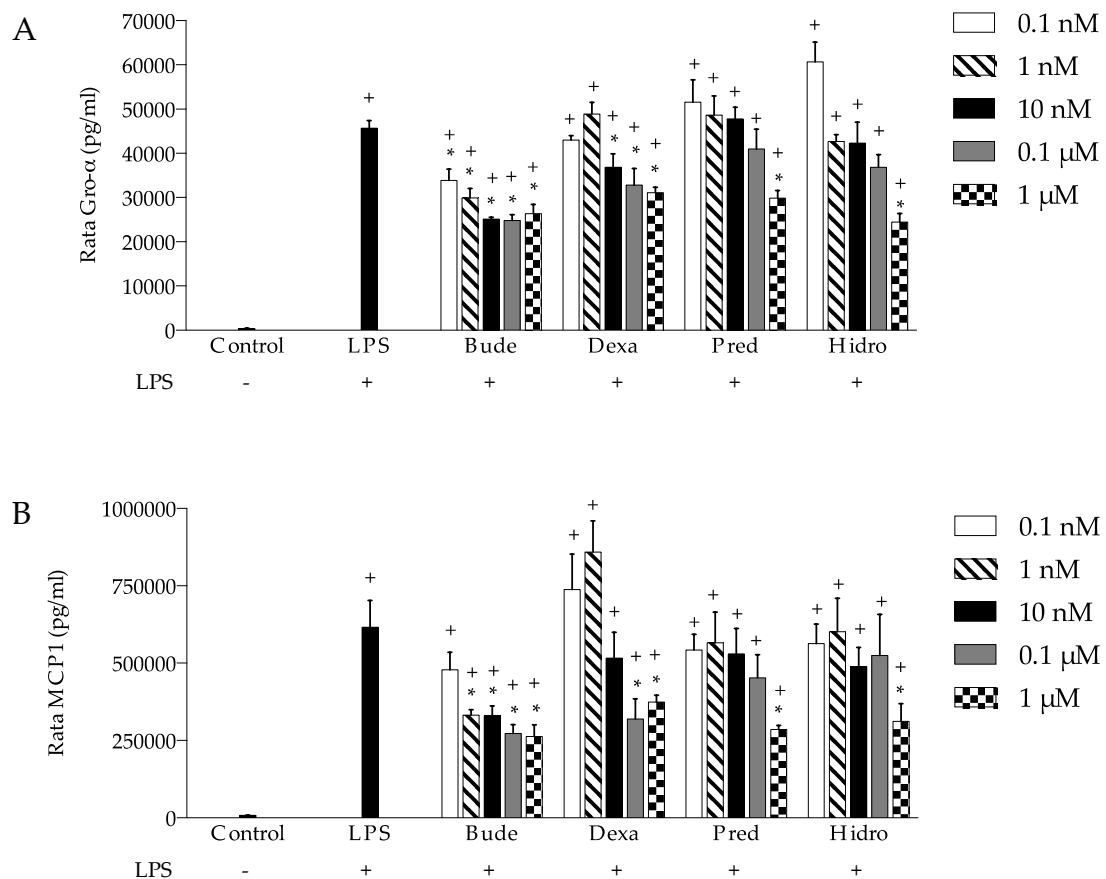
#### 2.1.1. Efecto de los glucocorticoides sobre la respuesta a PAMPs

En primer lugar, se analizó el efecto de los GC ensayados en una amplia curva de concentración (0.1 nM – 1  $\mu\text{M}$ ), sobre la respuesta de diferentes líneas celulares de epitelio intestinal (IEC4.1 e

IEC18) ante una concentración constante de LPS. Es importante destacar que dicha respuesta fue monitorizada mediante la cuantificación de la producción de CXCL1/KC/Gro y MCP1, dos quimioquinas cuya producción por parte de las células epiteliales intestinales se ve incrementada por diferentes estímulos inflamatorios. La presencia de LPS produjo un aumento de los niveles de estas quimioquinas en el sobrenadante que resultó estadísticamente significativo, mientras que la presencia de los GC redujo drásticamente dicho fenómeno. La conclusión que se puede extraer de las figuras 70 A y B, es que la exposición de las células IEC4.1 a los cuatro GC ensayados redujo la estimulación asociada al LPS de forma consistente. Sin embargo, la budesonida junto con la dexametasona resultan ser bastante más potentes que la prednisolona y la hidrocortisona, tal y como se puede deducir de la concentración que necesitan para alcanzar la significancia estadística. Por ejemplo, mientras que la budesonida lo hace a 1 nM, la hidrocortisona necesita de una concentración de 1  $\mu$ M para alcanzar un efecto comparable. Además, cabe reseñar que todos los GC estudiados en estos experimentos muestran un efecto que se ajusta a un perfil claramente dosis dependiente.



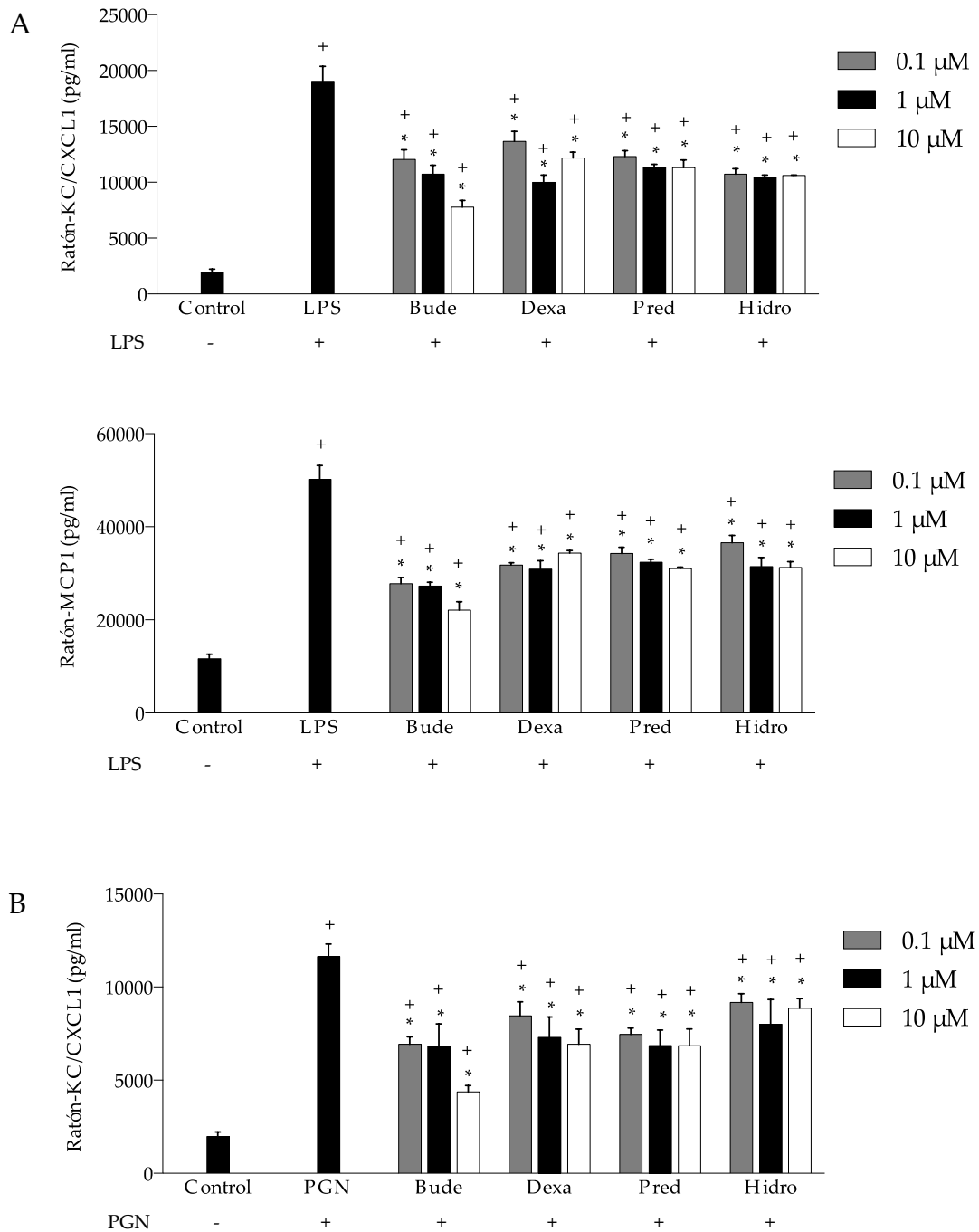
Un experimento totalmente análogo al anteriormente descrito para las células IEC4.1 se realizó en la línea celular de rata IEC18. Tal y como queda evidenciado en los resultados mostrados en las figuras 71 A y B, el perfil dosis dependiente del efecto de los GC aquí descrito queda confirmado. Asimismo, vuelve a resultar evidente que la budesonida parece ser el más potente de los cuatro en lo que se refiere al menos a los efectos sobre este tipo celular, y la dexametasona ejerce un efecto que en este caso resulta esencialmente similar al desarrollado por la prednisolona y la hidrocortisona si se comparan concentraciones equivalentes.

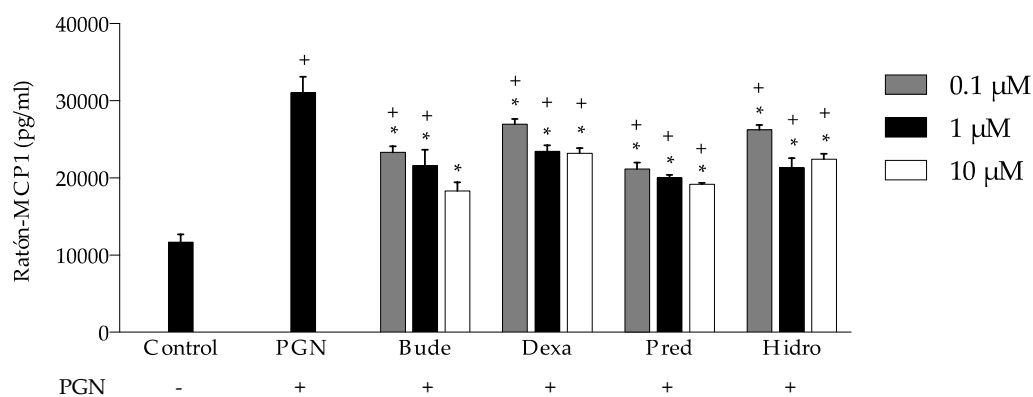


**Figura 71:** Curva dosis respuesta de los diferentes GC sobre la respuesta de células IEC18 a LPS (1 μg/ml) (n=4 por condición). (A) Gro-α (pg/ml) (B) MCP1 (pg/ml). Los resultados se expresan en forma de media ± SEM. + p<0.05 vs Control, \* p<0.05 vs LPS. Bude=budesonida, Dexa=dexametasona, Pred=prednisolona, Hidro=hidrocortisona.

A continuación, decidimos realizar un estudio comparativo del efecto de los cuatro GC ensayados sobre la respuesta de la línea celular IEC4.1 a LPS y PGN. En general, se aprecia un efecto inhibitorio muy consistente de la producción de ambas citoquinas por parte de los GC que alcanza la significancia estadística para todas las concentraciones ensayadas, siendo además evidente que la budesonida parece ser el más potente incluso por encima de la dexametasona. De esta forma, básicamente quedan confirmadas las conclusiones extraídas de los experimentos representados por las figuras 70 y 71, incluyendo además al PGN como otro PAMP de interés en la

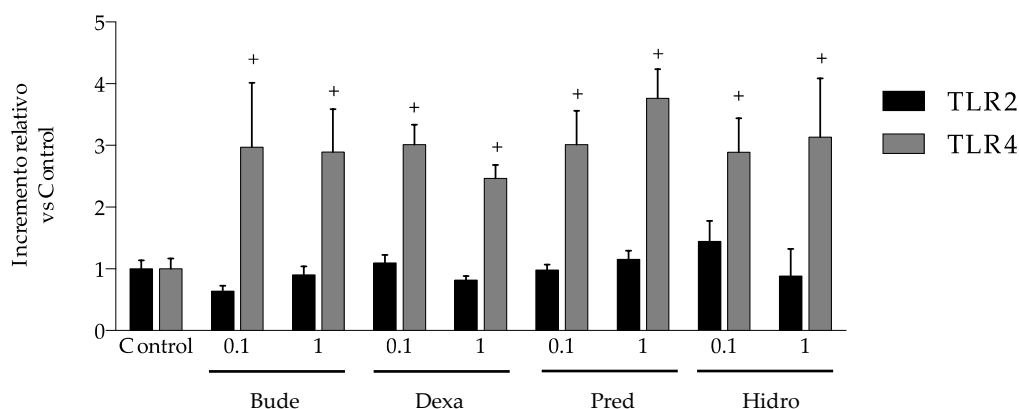
modulación ejercida por los GC sobre la inmunidad innata intestinal. No obstante, es interesante destacar que la budesonida es el único GC para el que la concentración de 10  $\mu\text{M}$  es capaz de generar mayor inhibición que la de 1  $\mu\text{M}$ , lo que resulta aún más llamativo teniendo en cuenta que parece ser el GC más potente si se tienen en cuenta los resultados a las concentraciones más bajas ensayadas.





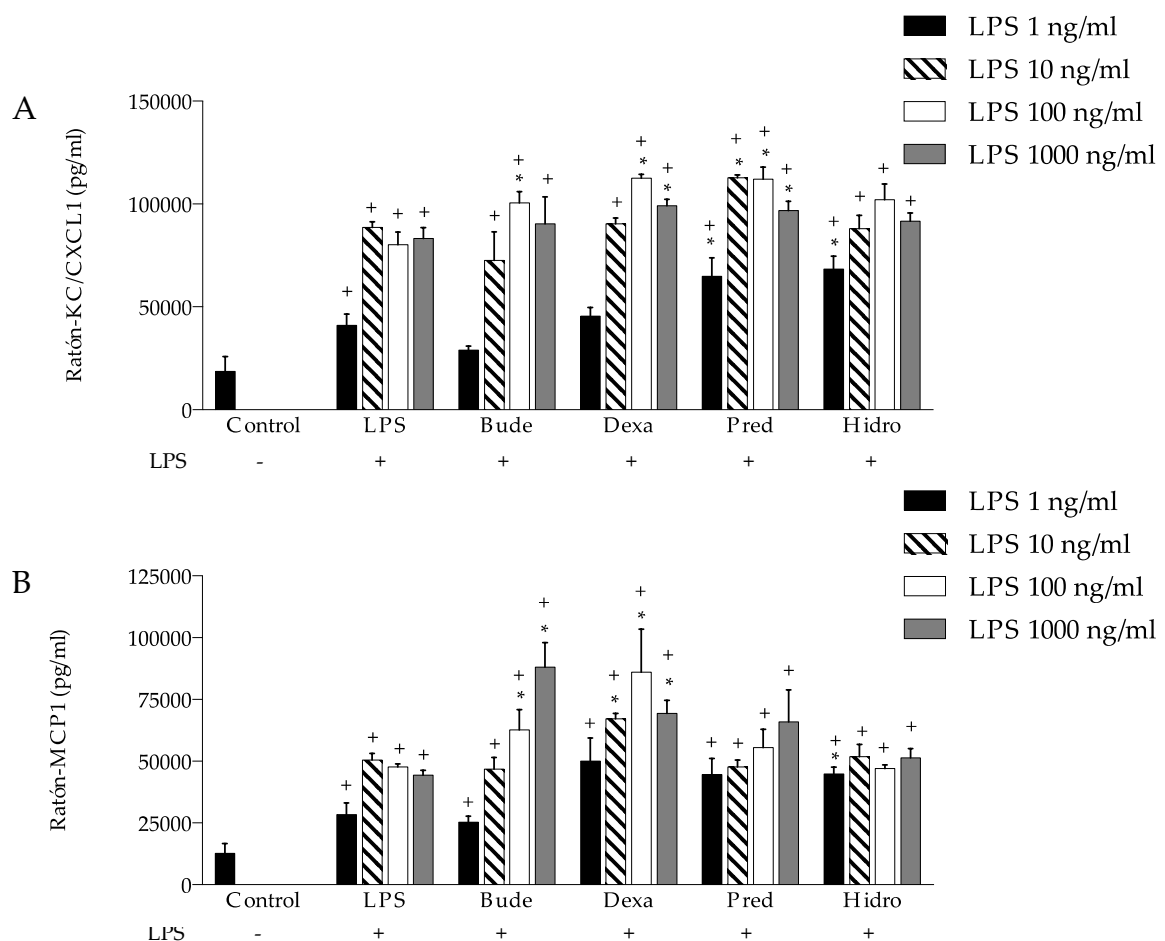
**Figura 72:** Efecto de los GC sobre la respuesta de células IEC4.1 a LPS y PGN ambos ensayados a 1 μg/ml. Representativo de dos experimentos independientes, (n=6 por condición). (A) Modulación sobre la respuesta a LPS monitorizada por la producción de KC/CXCL1 y MCP1 (pg/ml). (B) Modulación sobre la respuesta a PGN monitorizada por la producción de KC/CXCL1 y MCP1 (pg/ml). Los resultados se expresan en forma de media ± SEM. + p<0.05 vs Control, \* p<0.05 vs LPS o vs PGN. Bude=budesonida, Dexa=dexametasona, Pred=prednisolona, Hidro=hidrocortisona.

Atendiendo a los resultados expuestos en bibliografía ya comentada en repetidas ocasiones durante este texto, decidimos corroborar la modulación ejercida por los GC sobre la expresión de TLR2 y TLR4, cuya relevancia en la dinámica epitelial en la mucosa intestinal bajo la exposición a DSS ha sido comprobada durante los últimos años. Para ello se expusieron células IEC4.1 confluentes a diferentes GC durante cuatro días, para posteriormente evaluar por PCR a tiempo real la expresión de los receptores anteriormente citados. A pesar de que actualmente se encuentra descrito en bibliografía un aumento de la expresión de TLR2 dependiente de GC, nosotros no detectamos dicho fenómeno. Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales los GC produjeron un consistente incremento de la expresión de TLR4, de un modo esencialmente independiente del GC y la dosis considerada (Fig 73).



**Figura 73:** Efecto de la exposición durante cuatro días a GC, sobre la expresión de TLRs en células IEC4.1 (n=3 por condición). Los resultados son expresados como incremento relativo al grupo Control y en forma de media ± SEM. + p<0.05 vs Control. Bude=budesonida, Dexa=dexametasona, Pred=prednisolona, Hidro=hidrocortisona. Los números indicados en el eje x representan la concentración (μM) a la que se ensayó el GC en cada caso.

Con objeto de conocer si el aumento de la expresión de TLR4 inducido por los GC se traduce en un incremento en la sensibilidad y/o respuesta a LPS por parte de las células epiteliales intestinales, se realizó la siguiente aproximación experimental. En este caso, monocapas confluentes de células epiteliales intestinales IEC4.1 fueron expuestas durante cuatro días a los GC usados en este trabajo a una concentración de 1  $\mu$ M, para posteriormente estimularlas con LPS (1-1000 ng/ml) tras haber retirado previamente los GC lavando las células profusamente con PBS. La respuesta a LPS monitorizada en células IEC4.1 a través de su producción de las quimioquinas KC/CXCL1 y MCP1, se vió modulada positivamente por la exposición a GC tal y como permitían inferir los resultados anteriormente comentados, siendo dicho efecto algo más notorio en el caso de la dexametasona y prednisolona a pesar de que la modulación sobre la expresión de TLR4 ejercida por los cuatro GC ensayados es en general comparable. Además, merece la pena comentar que en general este efecto no parece asociarse al uso del LPS dentro de un determinado rango de concentración, dado que aparecen grupos tratados con GC que ven incrementada su respuesta a dicho estímulo siendo este último usado desde 1 hasta 1000 ng/ml (Fig 74 Ay B).

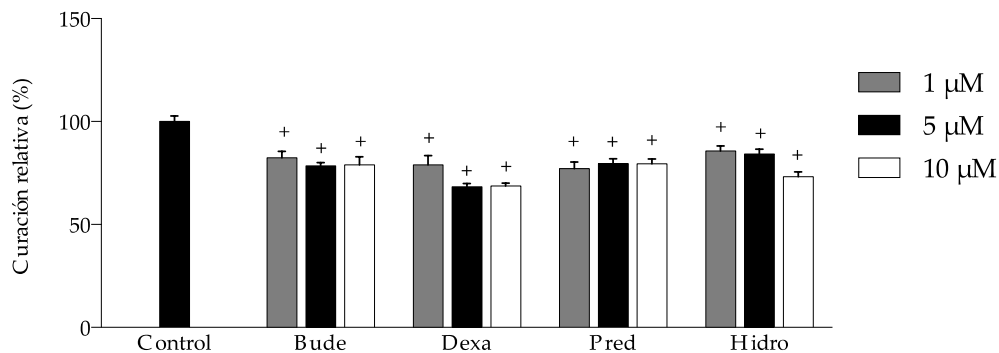


**Figura 74:** Modulación de la sensibilidad y/o respuesta de las células IEC4.1 a LPS por parte de los GC (n=3 por condición). (A) KC/CXCL1 (pg/ml); (B) MCP1 (pg/ml). Los GC son ensayados a 1  $\mu$ M y el LPS a 1-10-100 y 1000 ng/ml. Los resultados se expresan en forma de media  $\pm$  SEM. + p<0.05 vs Control, \* p<0.05 vs LPS. Bude=budesonida, Dexa=dexametasona, Pred=prednisolona, Hidro=hidrocortisona.

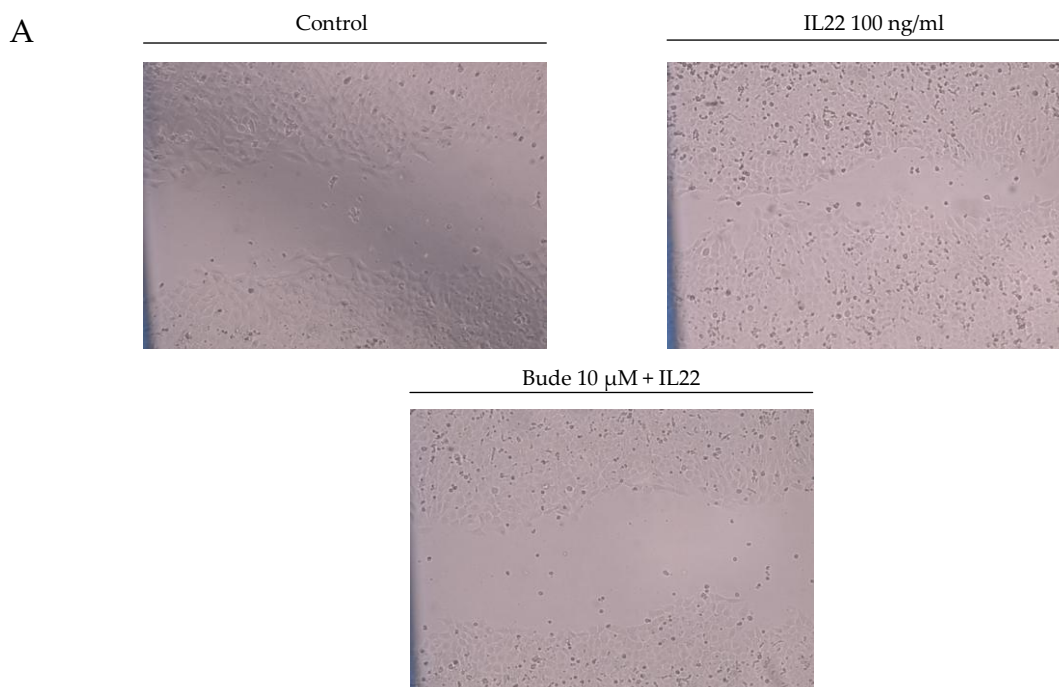


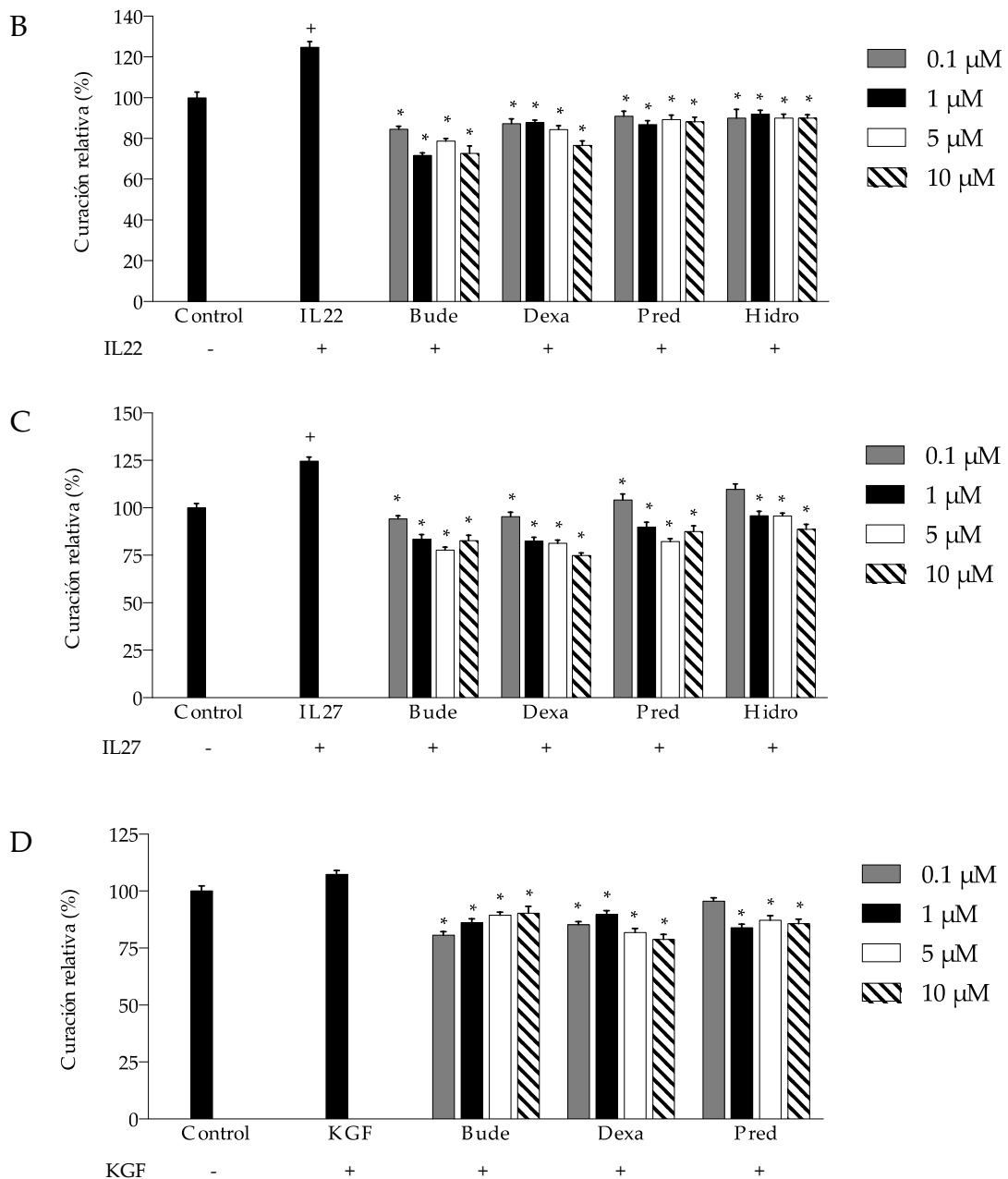
### 2.1.2. Efecto de los glucocorticoides sobre la restitución epitelial

Mediante el denominado “ensayo de curación de herida epitelial”, se evaluó *in vitro* el efecto de los GC sobre la capacidad de las células epiteliales intestinales para regenerar una monocapa dañada mediante un procedimiento físico (ver apartado correspondiente en material y métodos). Es interesante destacar que este experimento refleja aunque de un modo parcial, la situación de hiperplasia reactiva que se plantea en el epitelio de la mucosa intestinal cuando es sometido a una agresión continuada por parte del DSS (DSS1, DSS2, DSS3 y DSS-PGF, por ejemplo). En primer lugar, se estudió el efecto de los GC sobre la reepitelización producida por las células epiteliales intestinales IEC4.1 en ausencia de estímulo proliferativo adicional. La exposición de las células a GC antes y durante el proceso de curación de la herida, produjo una ralentización estadísticamente significativa de la misma para todos los GC y condiciones ensayadas. No obstante, la dexametasona mostró una potencia superior si se la compara con el resto de GC estudiados (Fig 75).



**Figura 75:** Efecto de los GC sobre la restitución de células IEC4.1 ensayada *in vitro* bajo condiciones basales (ausencia de estímulo proliferativo) (n=20 por condición). Los resultados son expresados de forma relativa al área de curación obtenida por el grupo Control y como media ± SEM. + p<0.05 vs Control. Bude=budesonida, Dexa=dexametasona, Pred=prednisolona, Hidro=hidrocortisona.





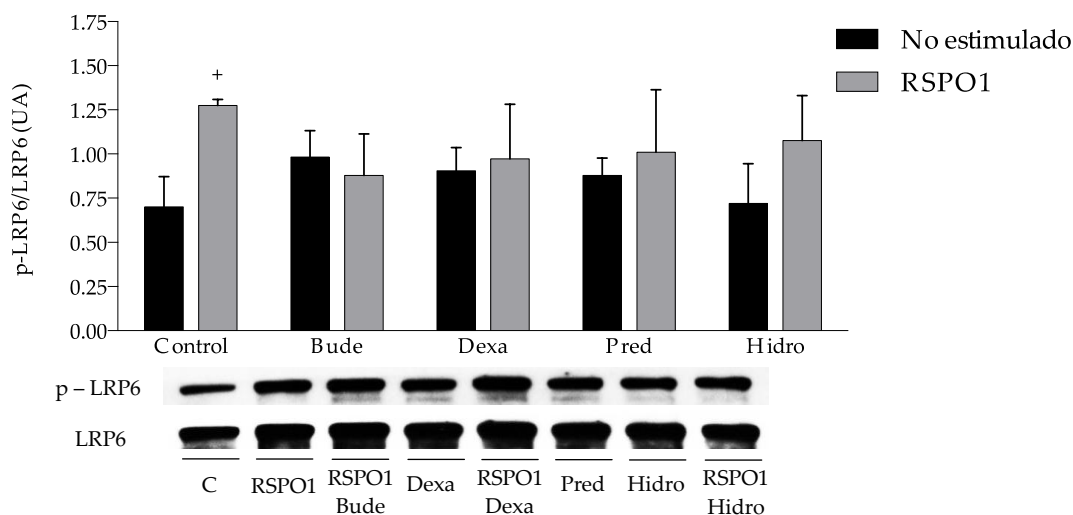
**Figura 76:** Efecto de los GC sobre la restitución de células IEC4.1 ensayada *in vitro* bajo condiciones de estimulación con (B) IL22 (100 ng/ml), (C) IL27 (50 ng/ml) y (D) KGF (50 ng/ml) (n=20 por condición). En el apartado (A), se presentan imágenes representativas de la curación epitelial en los grupos experimentales indicados. Los resultados son expresados de forma relativa al área de curación obtenida por el grupo Control y como media ± SEM. \*p<0.05 vs grupo estimulado. Bude=budesonida, Dexa=dexametasona, Pred=prednisolona, Hidro=hidrocortisona.

Además, se evaluó la influencia de la presencia de diferentes concentraciones de GC sobre la restitución epitelial de células IEC4.1 estando expuestas a IL22, IL27 o KGF. Como era esperable, la presencia de cualquiera de las proteínas con función inductora de la proliferación celular antes citadas, produjo un incremento de la velocidad de curación de la herida practicada sobre las monocapas celulares, aunque este efecto solo alcanzó la significancia estadística en el caso de la IL22 y la IL27. Por su parte, la adición de GC antes de la realización de la herida y durante el tiempo de curación, resultó en una reducción del área curada que alcanzó la significancia

estadística en todas las condiciones ensayadas excepto para la hidrocortisona 0.1  $\mu$ M cuando la estimulación se realizó con IL27 o KGF. Asimismo, resulta interesante destacar que la budesonida y la dexametasona mostraron un claro perfil dosis dependiente en su efecto inhibitor de la restitución epitelial, especialmente cuando esta fue ensayada estando la IL22 o la IL27 presentes (Fig 76 B-D).

### 2.1.3. Efecto de los glucocorticoides sobre la cascada de señalización Wnt/ $\beta$ -Catenina

La interpretación conjunta de los resultados *in vivo* anteriormente expuestos y los descritos *in vitro* arriba, nos invitaron a pensar que además del efecto inhibitor de la producción y el efecto sobre las células epiteliales intestinales de citoquinas citoprotectoras como IL22 e IL27, además del KGF, debía haber otros mecanismos reguladores de la proliferación, migración y diferenciación celular afectados por los GC en este tipo celular.



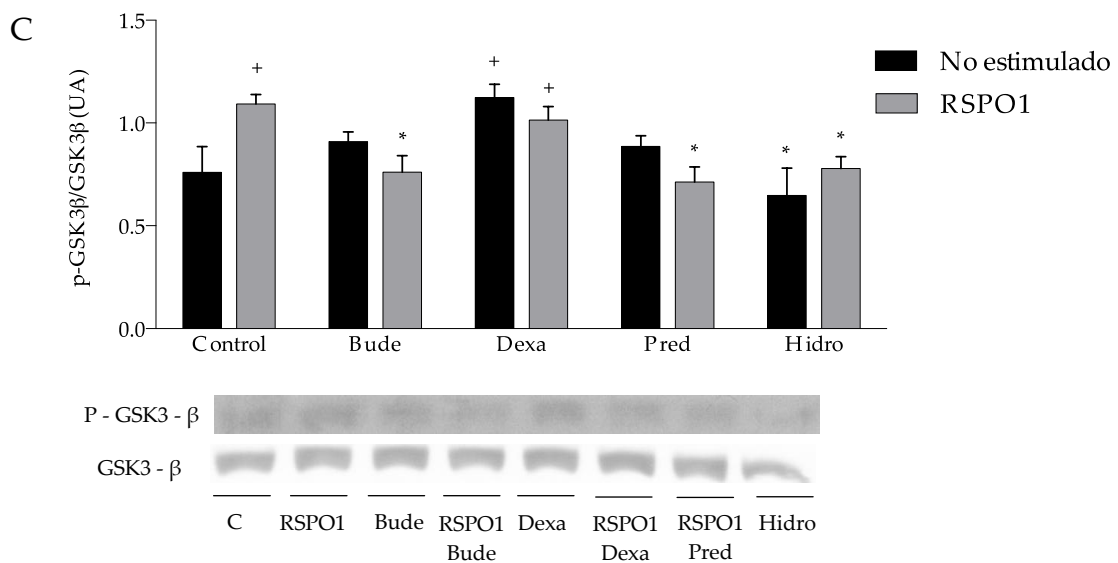
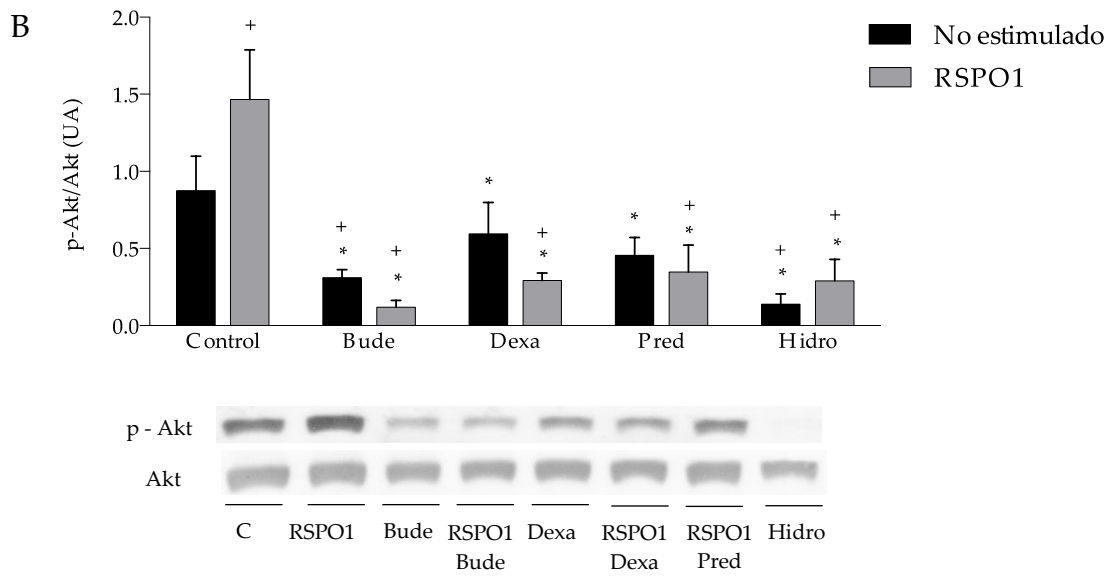
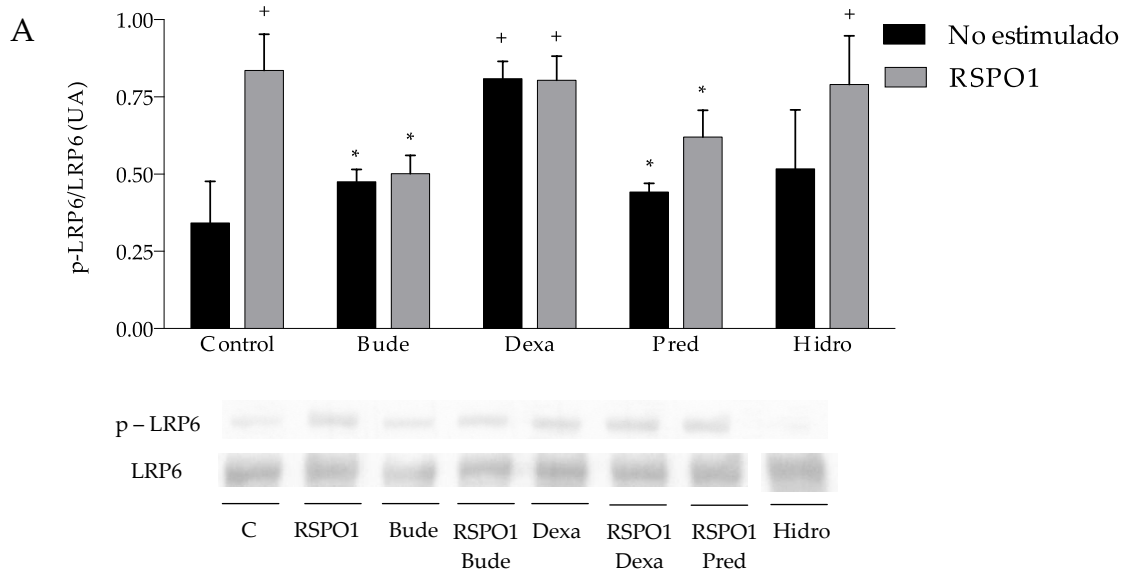
**Figura 77:** Efecto directo de los GC (1  $\mu$ M) sobre la estimulación por RSPO1 (100 ng/ml) del receptor LRP6 (relación p-LRP6/LRP6) en IEC4.1, (n=4 por condición). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias y en forma de media  $\pm$  SEM. + p<0.05 vs Control NS \*p<0.05 vs Control RSPO1. NS=no estimulado, Bude=budesonida, Dexa=dexametasona, Pred=prednisolona, Hidro=hidrocortisona, UA=unidades arbitrarias.

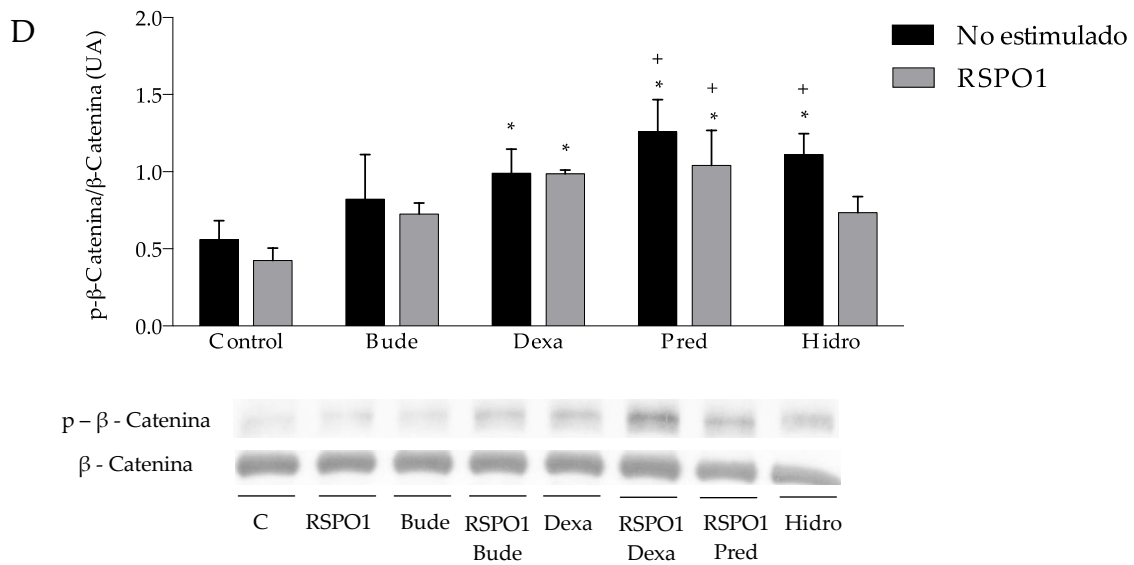
Teniendo en cuenta que existe mucha bibliografía acerca de la relevancia de la cascada de señalización de la  $\beta$ -Catenina en la homeostasis del epitelio de la mucosa intestinal [844], así como sobre la regulación negativa ejercida por los GC sobre la misma en osteoblastos de tejido óseo [845], decidimos testar el efecto directo de los GC sobre el funcionamiento de este sistema proteico de transducción de señal en las células IEC4.1. Como se describe en la sección de material y métodos, tras una pre-exposición a GC las células recibieron RSPO1 y se incubaron durante 24 horas manteniendo los GC. En estas células se analizó el grado de fosforilación de la proteína LRP6 mediante Western Blot, el cual indica su grado de estimulación por parte del agonista RSPO1. Como se puede observar en la figura 77, el RSPO1 activó la cascada de señalización en cuestión de un modo dependiente del receptor LRP6 evidenciado por el aumento de la relación p-LRP6/LRP6. Asimismo, se observa claramente que la presencia de los diferentes GC en el medio de cultivo durante la estimulación con RSPO1 no redujo significativamente en ningún caso la activación

receptorial, por lo que parece evidente que los GC directamente no ejercen ningún efecto relevante sobre la cascada de señalización Wnt/ $\beta$ -Catenina estimulada por RSPO1.

A pesar del resultado desalentador de los experimentos realizados considerando la presencia directa del GC en el medio de cultivo, en este punto del desarrollo experimental de esta tesis doctoral, ya contábamos con algunas evidencias preliminares *in vitro* no mostradas en este texto, y otras *in vivo* ya descritas, que apuntaban hacia un aumento de la expresión de DKK1 en las células epiteliales intestinales al ser expuestas a GC. Teniendo en cuenta que esta proteína actúa como antagonista soluble de los receptores de señales Wnt tipo LRP, encontramos pertinente evaluar la influencia indirecta de los GC sobre esta cascada de señalización mediante el procedimiento descrito detalladamente en la sección de material y métodos. Mediante dicho protocolo, obtuvimos medio condicionado por células IEC4.1 expuestas o no previamente a GC, siendo posteriormente usado dicho medio carente de GC como variable moduladora de la respuesta de células IEC4.1 a RSPO1 como estímulo. Los resultados expuestos en las figuras 78 A-D, reflejan que la exposición de las células epiteliales intestinales a los GC hacen que estas condicionen el medio con mediadores solubles que posteriormente reducen la respuesta a RSPO1. Este efecto queda evidenciado por una consistente reducción del incremento en la relación p-LRP6/LRP6, p-Akt/Akt y p-GSK3 $\beta$ /GSK3 $\beta$  inducido por la adición de RSPO1 que en general parece más intenso en el caso de la budesonida y la prednisolona. De forma coherente con lo anterior, se observa un aumento de la relación p- $\beta$ -Catenina/ $\beta$ -Catenina que curiosamente alcanza la significancia estadística solo en el caso de la dexametasona y la prednisolona (Fig. 78 A-D).

En definitiva, estos resultados demuestran que la exposición de las células IEC4.1 a GC, especialmente budesonida y prednisolona, hace que estas liberen mediadores solubles que interfieren de un modo inhibitorio sobre la cascada de señalización aquí estudiada, teniendo en este caso una contribución relevante la inhibición de la respuesta a nivel receptorial, a diferencia de los resultados recogidos en la figura 77 (Fig 78 A). Estos datos sugieren que al menos parte del efecto descrito está asociado a algún mediador soluble que interfiere con el receptor LRP6, lo que resulta coherente con las sospechas previas sobre DKK1. Por tanto, el medio condicionado Control, así como los condicionados tras exposición a los diferentes GC fueron sometidos a la cuantificación de DKK1 por ELISA, pero desafortunadamente no se pudo detectar la presencia de dicho mediador en ninguno de los medios citados a pesar de usar el kit comercial más sensible disponible en el mercado capaz de detectar desde 13.4 pg/ml. Este hecho no implica necesariamente que DKK1 no ejerza ninguna contribución en este fenómeno (probablemente junto con otros mediadores por determinar), pero al mismo tiempo esta es una hipótesis que siendo realmente plausible, no hemos podido confirmar hasta la fecha.



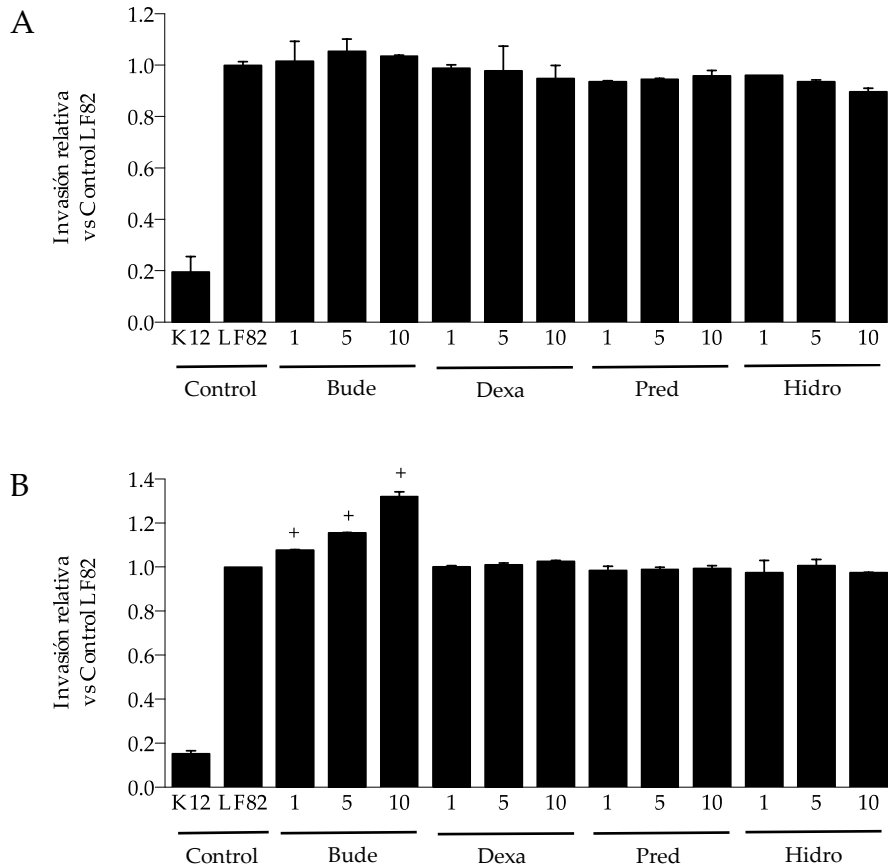


**Figura 78:** Efecto indirecto de los GC (1  $\mu$ M) sobre la señalización Wnt/ $\beta$ -Catenina estimulada por RSPO1 (100 ng/ml) en IEC4.1. (n=4 por condición) (A) Relación p-LRP6/LRP6; (B) relación p-Akt/Akt; (C) relación p-GSK3 $\beta$ /GSK3 $\beta$ ; (D) relación p- $\beta$ -Catenina/ $\beta$ -Catenina. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias y en forma de media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs Control NS \* $p < 0.05$  vs Control RSPO1. NS=no estimulado Bude=budesonida, Dexa=dexametasona, Pred=prednisolona, Hidro=hidrocortisona, UA=unidades arbitrarias.

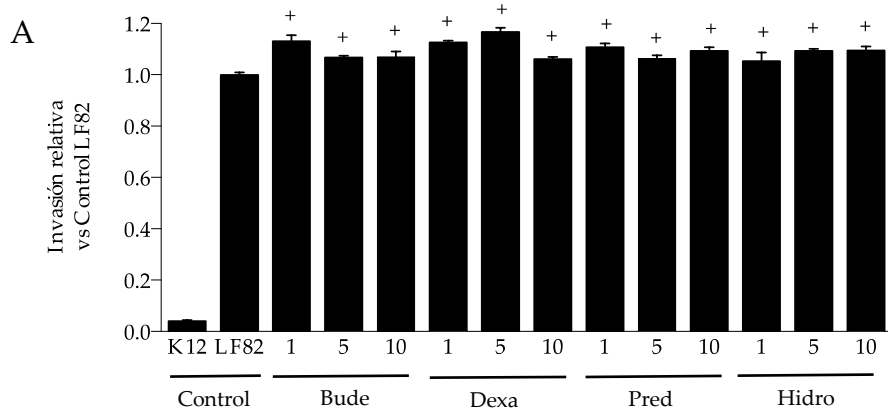
### 2.1.4. Efecto de los glucocorticoides sobre la resistencia de las células epiteliales intestinales a la invasión bacteriana

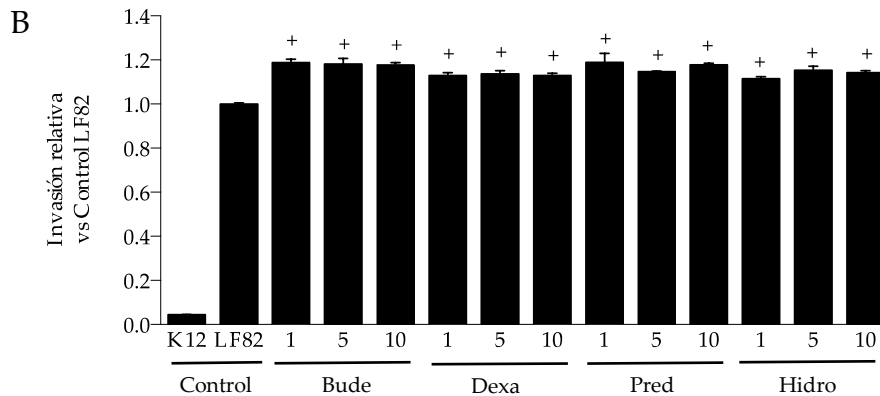
Haciendo uso de un método parcialmente desarrollado en nuestro laboratorio, se evaluó el efecto de los GC sobre la resistencia de las células epiteliales intestinales a la invasión por parte de un tipo bacteriano con fenotipo enteroinvasivo (*E. coli* LF82). Este tipo de experimentos se realizaron paralelamente en células IEC4.1 e IEC18 por ser la más manejables en la práctica en este procedimiento. Además, los resultados mostrados reflejan la influencia de los GC cuando las células fueron expuestas a ellos durante 24 o 48 horas, previamente a entrar en contacto las bacterias.

En el caso de las IEC4.1, mientras que la adición de GC durante 24 horas previamente al contacto con las bacterias no generó efecto alguno, cuando esto se hizo durante 48 horas, curiosamente la budesonida de forma exclusiva y dosis dependiente produjo un incremento en la invasión epitelial por parte de las bacterias que resultó estadísticamente significativa para las tres dosis ensayadas (Fig 79 A y B). Sorprendentemente, los resultados obtenidos con las células IEC18 ensayadas manteniendo escrupulosamente las mismas condiciones experimentales que con la línea celular anteriormente citada, fueron sustancialmente diferentes. En este caso, la administración de los GC produjo un notable incremento de la invasión bacteriana que se manifestó por igual tras 24 o 48 horas de exposición a GC, y que fue esencialmente comparable en términos cuantitativos independientemente del GC o la dosis ensayada (Fig 80 A y B). La razón que subyace en la interesante especificidad de la budesonida en el efecto favorecedor de la invasión por parte de la cepa LF82 de *E. coli* sobre las células IEC4.1 no ha sido dilucidada hasta la fecha, pero resulta sin duda estimulante de cara a futuros estudios complementarios en ese sentido.



**Figura 79:** Efecto de los GC sobre la resistencia de las células IEC4.1 a la invasión bacteriana *E. coli* LF82 (n=10 por condición). (A) Células expuestas a GC (1, 5 y 10 μM) durante 24 horas; (B) células expuestas a GC (1, 5 y 10 μM) durante 48 horas. Los resultados se expresan de forma relativa a la invasión de LF82 en el grupo Control y como media ± SEM. + p<0.05 vs Control LF82. Bude=budesonida, Dexa=dexametasona, Pred=prednisolona, Hidro=hidrocortisona, K12=cepa no enteroinvasiva, LF82=cepa enteroinvasiva.





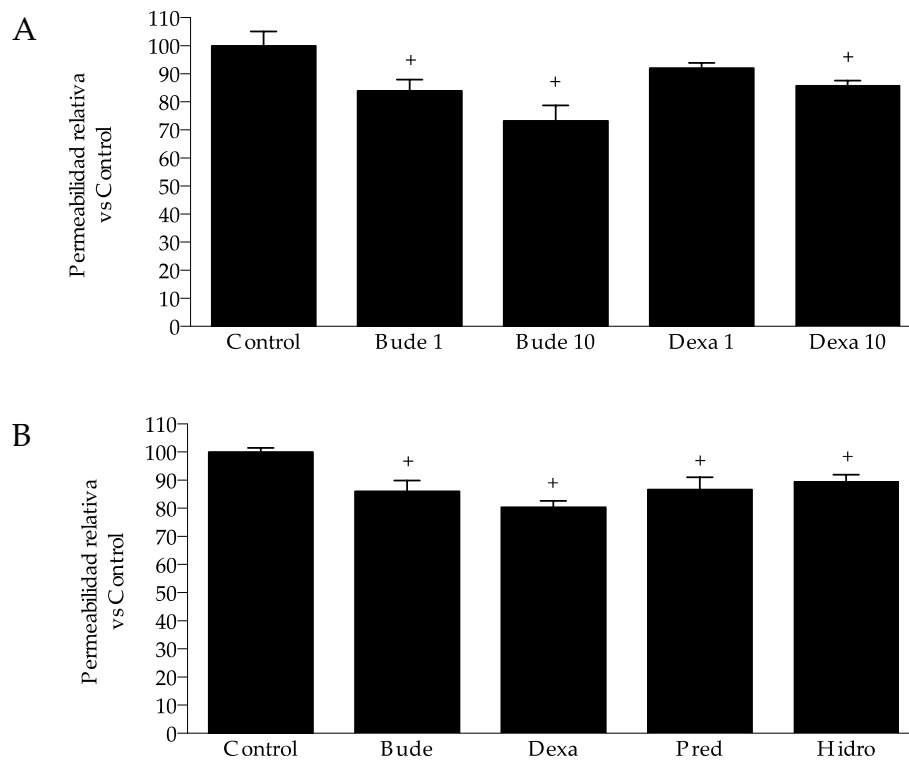
**Figura 80:** Efecto de los GC sobre la resistencia de las células IEC18 a la invasión bacteriana *E. coli* LF82 (n=10 por condición). (A) Células expuestas a GC (1, 5 y 10  $\mu$ M) durante 24 horas; (B) células expuestas a GC (1, 5 y 10  $\mu$ M) durante 48 horas. Los resultados se expresan de forma relativa a la invasión de LF82 en el grupo Control y como media  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs Control LF82. Bude=budesonida, Dexa=dexametasona, Pred=prednisolona, Hidro=hidrocortisona, K12=cepa no enteroinvasiva, LF82=cepa enteroinvasiva.

### 2.1.5. Efecto de los glucocorticoides sobre la función de barrera epitelial ensayada *in vitro*

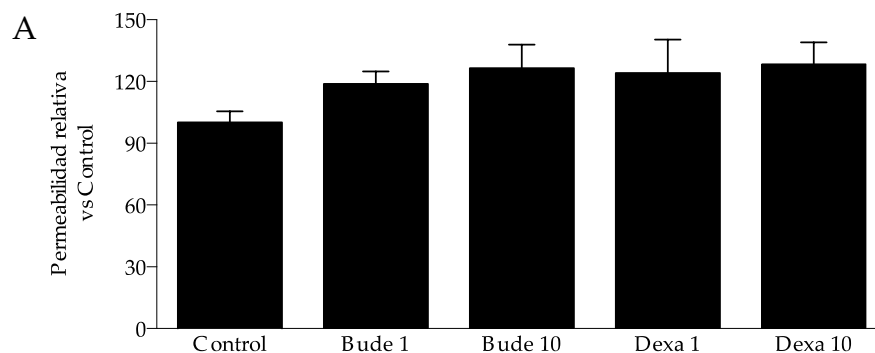
Con la intención de aportar información adicional que arroje más luz sobre el papel de los GC en la función de barrera intestinal y concretamente sobre la permeabilidad intestinal de tipo paracelular más allá de los resultados *in vivo* anteriormente expuestos, se decidió estudiar *in vitro* la permeabilidad a FITC-dextrano (4 Kda) en células IEC4.1, IEC18 y CACO-2. Las células fueron sembradas en insertos de policarbonato (Transwell®) hasta confluencia en el caso de las células IEC4.1 e IEC18, mientras que en el caso de las CACO-2 se realizó del mismo modo y permitiendo la maduración de las mismas mediante su cultivo en condiciones de sobreconfluencia durante dos semanas. Llegado este punto se siguió el protocolo que aparece descrito detalladamente en la sección de material y métodos. Como se puede observar en la figura 81 A, la exposición de las células IEC4.1 a budesonida o dexametasona de forma previa a la adición apical del fluoróforo, se tradujo en una reducción de la presencia de este último en el compartimento basolateral. Esta mejora de la función de barrera asociada a los GC, en este caso puede justificarse por un aumento del grado de maduración de este tipo celular que se caracteriza por un fenotipo inmaduro [846]. Además, cabe destacar que dicho efecto parece algo más destacable en el caso de la budesonida. Asimismo, los resultados obtenidos haciendo uso de las células IEC18 mostraron una tendencia muy similar, siendo en este caso testados también prednisolona e hidrocortisona y en todo caso a 1  $\mu$ M (Fig. 81 B). Es destacable que en este caso concreto la dexametasona es sin duda el más potente. En el caso de las células CACO-2, teniendo en cuenta su naturaleza humana y su conocida capacidad para diferenciarse adquiriendo características propias de células epiteliales intestinales diferenciadas (mi grupo de investigación tiene amplia experiencia en este campo), decidimos evaluar de forma paralela el efecto de la budesonida y dexametasona sobre la permeabilidad paracelular incluyendo la variable de la diferenciación celular. Comparando el efecto de los GC antes citados al ser aplicados sobre estas células, sorprendentemente se observa que al contrario de lo sucedido en las dos líneas celulares de naturaleza murina ya comentadas, la exposición a GC genera un aumento de la permeabilidad paracelular. Además, si se comparan los resultados en

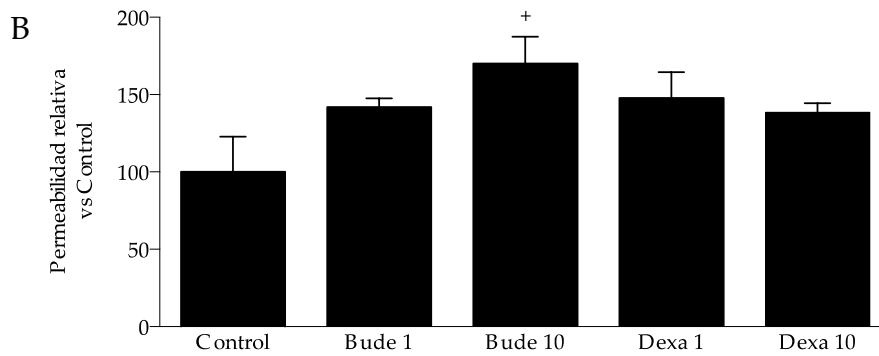


estado no diferenciado (Fig. 82 A) y diferenciado (Fig. 82 B), se puede observar que aunque en ambas condiciones la tendencia es similar, el efecto es bastante más consistente en el segundo caso y que la budesonida es claramente el GC más potente de los dos testados. El hecho de que la diferenciación celular sensibilice a estas células a este efecto no es sorprendente, dado que es bien conocido que una de las características inherentes a la diferenciación de esta línea celular es un incremento de la expresión del GR.



**Figura 81:** Ensayo de permeabilidad *in vitro* a FITC-dextrano (4 KDa) en células epiteliales intestinales de origen murino. Los GC fueron ensayados a 1 y 10  $\mu$ M en el caso de las células IEC4.1 y únicamente a 1  $\mu$ M en las células IEC18 tal y como se indica donde corresponde (n=6 por condición). (A) Permeabilidad relativa a FITC-dextrano en células IEC4.1; (B) permeabilidad relativa a FITC-dextrano en células IEC18. Los resultados son expresados de forma relativa a la señal de fluorescencia obtenida en el compartimento basolateral del grupo Control y se presentan como media  $\pm$  SEM +  $p < 0.05$  vs Control. Bude=budesonida, Dexa=dexametasona, Pred=prednisolona, Hidro=hidrocortisona.



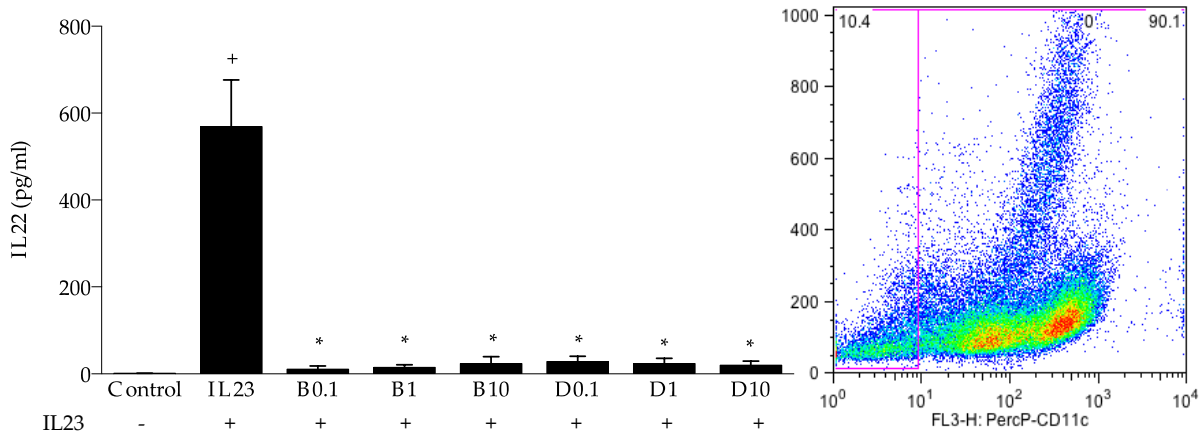


**Figura 82:** Ensayo de permeabilidad *in vitro* a FITC-dextrano (4 KDa) en células epiteliales intestinales de origen humano CACO-2. Los GC fueron ensayados a 1 y 10  $\mu$ M tal y como se indica donde corresponde. (A) Permeabilidad relativa a FITC-dextrano en células CACO-2 no diferenciadas (n=9, representativo de tres experimentos independientes); (B) permeabilidad relativa a FITC-dextrano en células CACO-2 parcialmente diferenciadas (n=3). Los resultados son expresados de forma relativa a la señal de fluorescencia obtenida en el compartimento basolateral del grupo Control y se presentan como media  $\pm$  SEM + p<0.05 vs Control. Bude=budesonida, Dexa=dexametasona.

## 2.2. Estudios en células presentadoras de antígenos y células T CD4

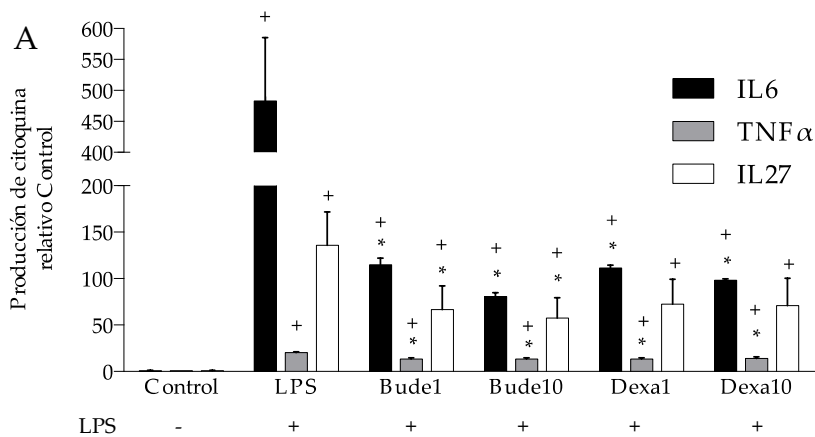
Uno de los componentes que justifican, al menos parcialmente, el impacto negativo de la administración de budesonida en el modelo de colitis aguda inducida por DSS, es la inhibición de la producción de citoquinas inflamatorias y al mismo tiempo citoprotectoras en su señalización sobre las células epiteliales intestinales. Entre ellas destacan IL22 e IL27, cuyo efecto sobre su tipo celular diana se encuentra asimismo significativamente reducido por la presencia de budesonida y otros GC independientemente de su concentración tal y como se demuestra en el ensayo de curación de herida epitelial anteriormente descrito. Por tanto, decidimos evaluar el efecto de diferentes GC sobre la producción principalmente de estas citoquinas, así como de otras de tipo inflamatorio, por parte de algunos de los tipos celulares reconocidos como fuente de las mismas destacando las células dendríticas y las células T CD4 bajo diferentes condiciones de estimulación.

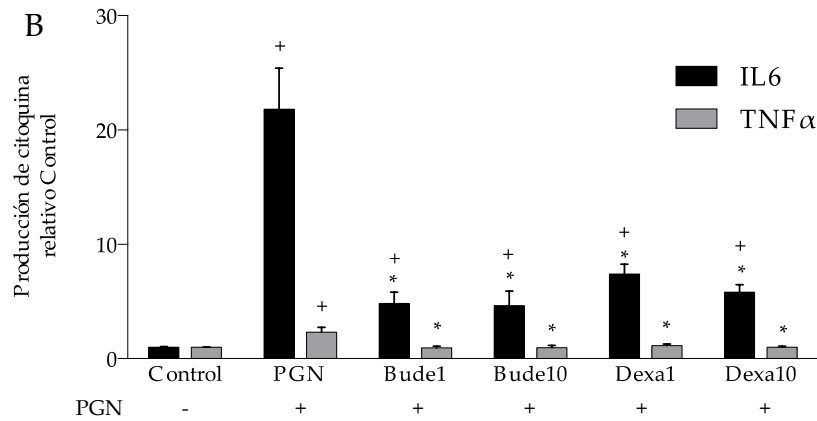
En primer lugar, estudiamos el efecto de la budesonida y dexametasona sobre la producción de IL22 e IL27 por parte de una población purificada (> 90%) de células dendríticas procedentes del bazo de ratones sanos, sometidas a estimulación con IL23. Desafortunadamente, no obtuvimos una producción de IL27 cuantificable mediante ELISA, pero en el caso de la IL22 se obtuvo un marcado incremento de la misma como consecuencia de la estimulación antes descrita, el cual fue totalmente inhibido por la presencia de los dos GC ensayados independientemente de la concentración ensayada (0.1 – 10  $\mu$ M) (Fig. 83). Paralelamente a dicho estudio, se analizó el mismo fenómeno pero haciendo uso de otra de las fuentes reconocidas de IL22 e IL27 como son los macrófagos, los cuales obtuvimos y purificamos del bazo de animales sanos siguiendo un protocolo similar al aplicado en el caso de las células dendríticas. Lamentablemente, no conseguimos obtener concentraciones mensurables de ninguna de ellas tras la realización del cultivo pertinente.



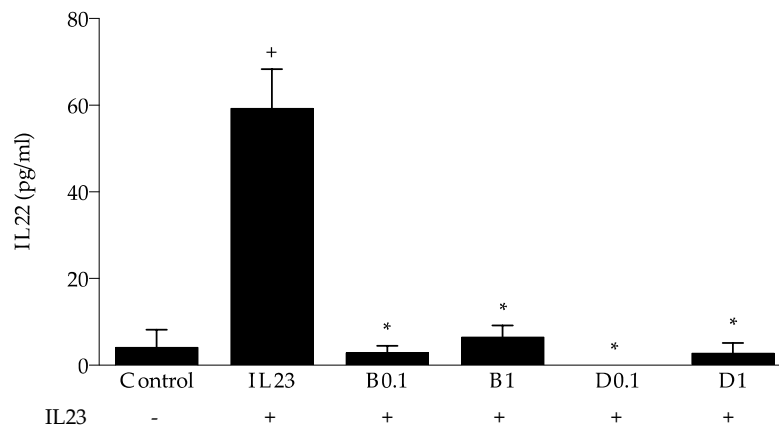
**Figura 83:** Efecto de los GC sobre la producción de IL22 por parte de células dendríticas bajo estimulación con IL23 (100 ng/ml) (n=6, por condición). La IL22 fue detectada mediante ELISA y los GC ensayados a 0.1, 1 y 10  $\mu$ M . Los resultados son expresados en pg/ml y en forma de media  $\pm$  SEM. + p<0.05 vs Control, \* p<0.05 vs IL23. B=budesonida, D=dexametasona.

Con objeto de definir mejor este fenómeno, decidimos estudiar la modulación ejercida por los GC sobre la respuesta de células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDCs) a LPS o PGN. Como queda patente en las figuras 84 A y B, la adición de LPS al cultivo produjo un marcado incremento de la producción de IL6, TNF $\alpha$  e IL27. En el caso de las dos primeras, el efecto inhibitorio de los GC resultó significativo para la budesonida y dexametasona en todas las condiciones ensayadas, mientras que en el caso de la IL27 únicamente ocurrió lo propio cuando el GC empleado en el cultivo fue la budesonida. Además, se realizó un estudio exactamente igual pero utilizando como estímulo el PGN, cuyos resultados quedan reflejados en la figura 84 B. En este caso no pudimos detectar señal para la IL27, pero el perfil mostrado por las gráficas referidas a la IL6 y TNF $\alpha$  reflejan una intensa inhibición de la estimulación del PGN por parte de budesonida y dexametasona.



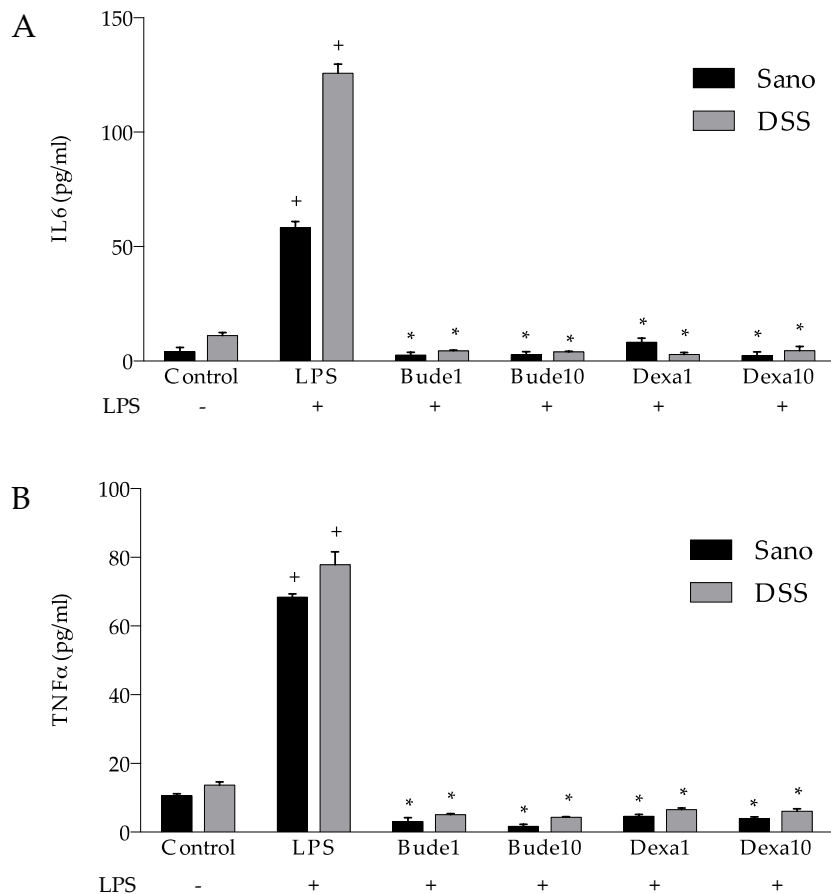


**Figura 84:** Efecto de los GC (1 y 10  $\mu$ M) sobre la producción de IL6, TNF $\alpha$  e IL27 por parte de BMDCs. (A) Estimulación con LPS (1  $\mu$ g/ml), (B) estimulación con PGN (1  $\mu$ g/ml). Los resultados son expresados de forma relativa al valor obtenido para el grupo Control y como media  $\pm$  SEM (n=6 por condición). + p<0.05 vs Control, \* p<0.05 vs LPS o PGN. B=budesonida, D=dexametasona. Los valores de concentración de citoquina del grupo control expresados en pg/ml en cada caso son los siguientes; IL6 (45.5),TNF $\alpha$  (76.7), IL27 (1.59). Bude=budesonida, Dexa=dexametasona.



**Figura 85:** Efecto de los GC (0.1 y 1  $\mu$ M) sobre la producción de IL22 por parte de células T CD4. La IL22 fue detectada mediante ELISA. Los resultados son expresados en pg/ml y en forma de media  $\pm$  SEM (n=6 por condición). + p<0.05 vs Control, \* p<0.05 vs IL23. B=budesonida, D=dexametasona.

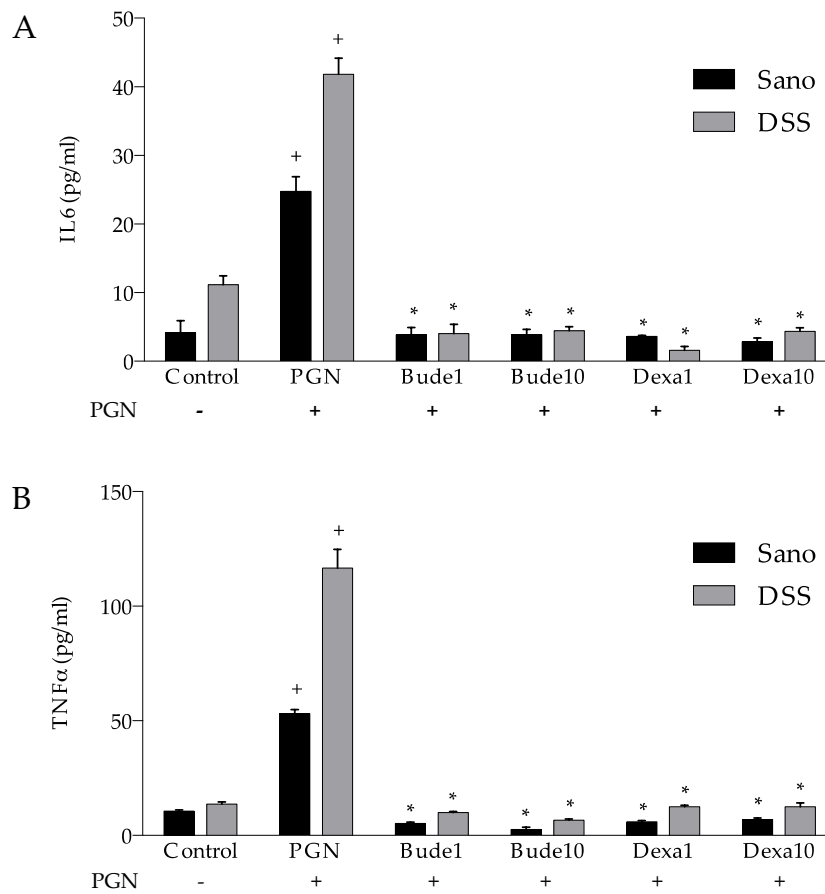
Otra de las fuentes de IL22 e IL27 más estudiadas y citadas por la bibliografía es la compuesta por las células T CD4. Por esa razón, decidimos purificar este subtipo celular linfocitario y someterlo a estimulación con IL23 bajo la modulación ejercida por la budesonida y la dexametasona. Los resultados presentados en la figura 85 hacen referencia únicamente a la producción de IL22, debido a que no obtuvimos una señal suficientemente consistente para IL27 como para obtener conclusiones fiables. Como se puede comprobar en dicha figura, la estimulación con IL23 aumentó drásticamente la producción de IL22 por parte de este tipo celular, fenómeno que fue totalmente inhibido por la inclusión en el cultivo de los GC a cualquiera de las concentraciones ensayadas.



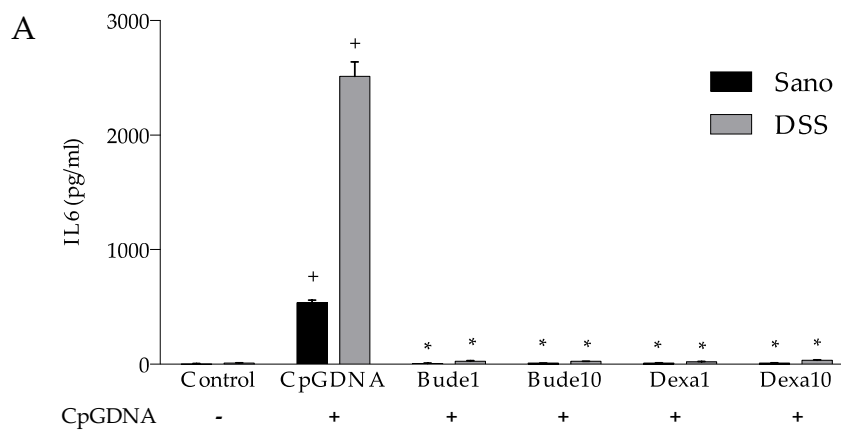
**Figura 86:** Efecto de los GC (1 y 10  $\mu$ M) sobre la respuesta a LPS (1  $\mu$ g/ml) de esplenocitos procedentes de animales sanos y expuestos a DSS. (A) IL6 (pg/ml); (B) TNF $\alpha$  (pg/ml). Los resultados son expresados en pg/ml y en forma de media  $\pm$  SEM (n=6 por condición). + p<0.05 vs Control, \* p<0.05 vs LPS. Bude=budesonida, Dexa=dexametasona.

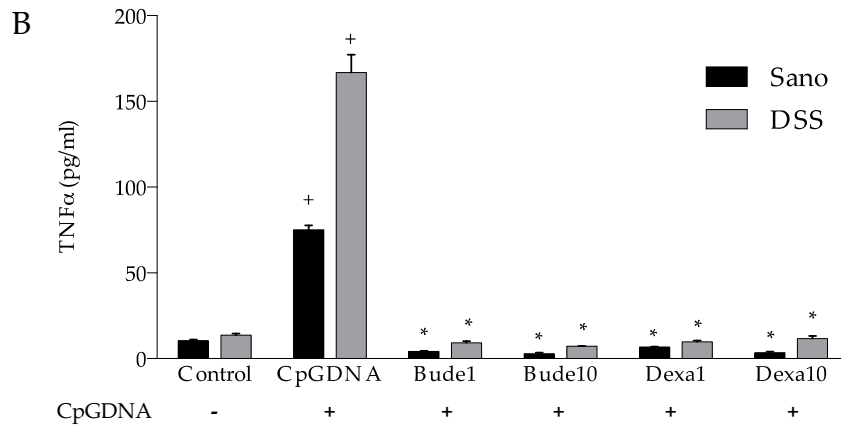
Una vez puesto de manifiesto detalladamente el efecto de los GC sobre la producción de las citoquinas citoprotectoras sobre el epitelio intestinal por parte de sus fuentes más relevantes descritas en bibliografía, con la intención de aproximarnos *in vitro* a la situación acontecida *in vivo* en los experimentos DSS1 y DSS2, decidimos determinar mediante la monitorización de la producción de IL6 y TNF $\alpha$  el efecto antiinflamatorio general de los GC sobre una población celular heterogénea obtenida del bazo de animales sanos o que recibieron DSS durante 5 días. Los esplenocitos obtenidos de estos animales fueron procesados y sometidos a estimulación *in vitro* con LPS, PGN o CpGDNA. Los resultados recogidos en las figuras 86, 87 y 88, reflejan un incremento de la producción de las dos citoquinas antes citadas ante los diferentes estímulos empleados, que tal y como se esperaba fue claramente superior en las células procedentes de aquellos animales que recibieron DSS. La presencia de budesonida o dexametasona en el cultivo produjo una reducción drástica de la producción de IL6 y TNF $\alpha$ , la cual resultó estadísticamente significativa ante todas las condiciones de estimulación y todas las concentraciones de GC ensayadas. Todo este conjunto de resultados *in vitro* sirve como confirmación del efecto antiinflamatorio de los GC sobre los diferentes tipo celulares inmunocompetentes ensayados, quedando especialmente puesto de manifiesto la inhibición ejercida sobre la producción de IL22 e IL27 cuya relevancia en la

conducción del proceso de restitución del epitelio intestinal tras la agresión ejercida por el DSS ha sido profundamente descrita en los últimos años.



**Figura 87:** Efecto de los GC (1 y 10  $\mu$ M) sobre la respuesta a PGN (1  $\mu$ g/ml) de esplenocitos procedentes de animales sanos y expuestos a DSS. (A) IL6 (pg/ml); (B) TNF $\alpha$  (pg/ml). Los resultados son expresados en pg/ml y en forma de media  $\pm$  SEM (n=6 por condición). + p<0.05 vs Control, \* p<0.05 vs LPS. Bude=budesonida, Dexa=dexametasona.





**Figura 88:** Efecto de los GC (1 y 10  $\mu$ M) sobre la respuesta a CpGDNA (1  $\mu$ M) de esplenocitos procedentes de animales sanos y expuestos a DSS. (A) IL6 (pg/ml); (B) TNF $\alpha$  (pg/ml). Los resultados son expresados en pg/ml y en forma de media  $\pm$  SEM (n=6 por condición). + p<0.05 vs Control, \* p<0.05 vs LPS. Bude=budesonida, Dexa=dexametasona

# DISCUSIÓN





La presente tesis doctoral se enmarca en el contexto de un proyecto de investigación financiado por el MINECO, titulado "Importancia fisiopatológica de la mucosa intestinal como interfase transporte iónico-respuesta inmunológica. Modulación por agentes farmacológicos" (SAF-2011 22922), cuyo planteamiento experimental incluye varias líneas de investigación orientadas a dilucidar el papel que desempeñan diferentes transportadores iónicos y agentes farmacológicos en la homeostasis de la mucosa intestinal en condiciones basales y en inflamación. Una de dichas líneas está centrada en el estudio de los efectos de los GC sobre la homeostasis de la mucosa intestinal, y su relación con el impacto negativo de su administración a animales con colitis experimental. Son precisamente estos resultados los que conforman en esencia el cuerpo fundamental de las resultados mostrados en esta tesis doctoral.

Nuestro grupo de investigación cuenta con una dilatada experiencia en la realización de estudios preclínicos en el campo de la inflamación intestinal. Como es bien sabido, los modelos preclínicos de EII reproducen solo parcialmente el fenotipo de la inflamación que se desarrolla en humanos, pero indudablemente una de las características que se espera de estos modelos es que respondan adecuadamente a la medicación que se aplica en el manejo clínico de los pacientes. Por tanto, clásicamente hemos usado como control positivo de eficacia antiinflamatoria en muchos de nuestros ensayos fármacos como la sulfasalazina, el 5-ASA o GC (prednisolona, budesonida). A lo largo de los años hemos observado que, ante la aplicación de GC (principalmente budesonida), obteníamos la esperada atenuación de la respuesta inflamatoria, pero también un deterioro significativo y consistente del estado general de los animales. Así, se observaba pérdida de peso, agudización de la anorexia asociada a la inflamación intestinal y aumento de la mortalidad. En un principio, pensamos que este sorprendente comportamiento debía estar asociado a características específicas del modelo utilizado, típicamente el de colitis inducida por TNBS en rata, o bien a defectos en el protocolo de aplicación relacionados con la dosis utilizada o el momento de administración del fármaco dentro de la evolución del proceso colítico. En estos experimentos, realizados siempre en rata, la budesonida fue administrada a dosis de 1 y 2 mg/kg/día, que provienen de la adaptación de la clásicamente usada en humanos (9 mg/día) con base en el criterio de la superficie corporal. No obstante, es importante reseñar que, dado que la budesonida ejerce un efecto local, este criterio podría no ser el más adecuado a la hora de realizar la estimación de la dosis a utilizar para este GC en concreto (ver más adelante). Tal y como refleja un artículo publicado por el grupo de investigación al que pertenezco en el año 2012, en el que participé activamente, la administración de budesonida a una dosis de 1 mg/kg/día a ratas sometidas a colitis aguda inducida por TNBS produjo un incremento notable de la translocación bacteriana a hígado a pesar de resultar extraordinariamente eficaz desde el punto de vista antiinflamatorio en el tejido colónico [847]. Este resultado, aunque de carácter hasta cierto punto preliminar, sugería que los efectos de la budesonida a nivel intestinal debían generar un defecto en la función de barrera a nivel físico-inmunológico, que en último término podía dar lugar a efectos nocivos en el animal tratado.

Los efectos perjudiciales de los GC en la colitis experimental han sido constatados por distintos grupos de investigación en los últimos 15 años utilizando budesonida o dexametasona, aplicando estos GC en el modelo de colitis aguda inducida por DSS en ratón. Así, en el año 2000 Ziljstra *et al.* publicaron un ensayo en el que describieron que la administración de dexametasona a una dosis de 60 µg/ratón/día (3 mg/kg/día), equivalente a 2,1 mg/kg/día en rata, 5 días antes y durante la adición

de DSS al agua de bebida, lejos de mejorar la evolución del modelo de colitis experimental produjo un agravamiento significativo del mismo. Este efecto se caracterizó por un incremento sustancial de la pérdida de peso e incluso, sorprendentemente, una elevación de algunos parámetros macroscópicos e histológicos colónicos asociados al proceso inflamatorio. No se realizó un análisis en profundidad de este efecto [838]. Por otro lado, en el año 2013 Sann *et al.* publicaron un estudio en el que compararon sistemáticamente la eficacia de diferentes agentes farmacológicos en relación con la evolución de la colitis aguda inducida por DSS. Entre los fármacos ensayados se incluyeron diferentes agentes clásicamente utilizados en el manejo clínico de la EII, destacando la budesonida, que fue administrada a una dosis de 0,5 mg/kg/día (aproximadamente 30 µg/ratón/día) desde el día del comienzo de la inducción de la colitis hasta la conclusión del experimento. En consonancia con los resultados anteriormente descritos para la dexametasona, la budesonida produjo un agravamiento de la colitis caracterizado por un incremento en la pérdida de peso y un deterioro del estado general de los animales que resultó significativo desde el segundo día de administración del GC, así como por una elevación de las proteínas de fase aguda en plasma. Este fenómeno se vio acompañado de una importante mejora del estado inflamatorio del animal a nivel intestinal, evidenciada por un consistente descenso de la actividad MPO colónica y del peso del bazo [837]. Aunque este último trabajo es probablemente el más completo de los publicados a día de hoy acerca del efecto de los GC sobre la colitis aguda inducida por DSS, existen otros artículos cuyas conclusiones son muy similares, poniendo de manifiesto resultados variables pero fundamentalmente negativos derivados de la aplicación de diferentes GC en este modelo experimental de colitis [834-836, 848]. En otro estudio en el que se utilizó budesonida como fármaco de referencia y en el que no se mencionan efectos nocivos del GC no se incluyeron datos relativos a la evolución del peso de los ratones o al índice de actividad de la enfermedad, limitándose a informar acerca de la actividad antiinflamatoria sobre el tejido intestinal, la cual como hemos visto aparece de forma incontrovertible [849]. Por otra parte, existen múltiples estudios en los que la dexametasona o la budesonida han sido usadas como control de eficacia antiinflamatoria administrándolas vía intrarrectal a ratas sometidas a colitis aguda inducida por TNBS. En este sentido, tal y como se ha comentado en referencia al artículo anterior, únicamente se hace referencia al efecto antiinflamatorio intestinal y no se aporta información sobre el estado general de los animales o la evolución del peso corporal [850, 851]. Análogamente, en un estudio sobre el efecto protector del *glucagon-like peptide-2* (GLP-2) en la colitis aguda inducida por DSS, el cual se asocia a una mejora en la función de barrera derivada de un efecto favorecedor de la proliferación y restitución epiteliales [852, 853], la administración de metilprednisolona hizo desaparecer completamente dicho efecto [854].

En contraposición a los resultados descritos en referencia a la colitis aguda inducida por DSS, se ha descrito que cuando los GC son aplicados en la variante crónica de este modelo experimental el efecto es muy diferente, mostrando un impacto positivo aunque sutil sobre su evolución, que en todo caso no cursó con ninguno de los efectos sistémicos negativos recogidos en esta tesis doctoral [855]. Por otra parte, es interesante considerar que la delección genética de CRH que secundariamente disminuye la corticosterona en plasma hasta niveles indetectables, hace que los ratones sean mucho más sensibles a la colitis aguda inducida por DSS (ver más adelante) [848]. La tendencia general en el conjunto de los artículos que de un modo más o menos tangencial describen el efecto nocivo de los GC sobre la colitis aguda inducida por DSS es no conceder demasiada importancia a los efectos perjudiciales, a pesar de tratarse de un fenómeno consistente,

limitándose los autores en todos los casos a especular superficialmente sobre las posibles causas de dicho comportamiento en principio sorprendente. Una frase bastante ilustrativa recogida de forma literal de la discusión realizada por Sann *et al.* dice: “*Variable mainly negative results of corticosteroids in the DSS-colitis mouse model have been published, which may be explained by the adverse events and the limited therapeutic window in mice*” [837].

Partiendo de esta base, iniciamos nuestros estudios con un experimento dirigido a la caracterización de la relación dosis–respuesta en el modelo de colitis aguda por DSS en ratones, con especial interés en los efectos tanto sobre la inflamación intestinal como sobre parámetros relacionados con el efecto sobre el animal en un sentido global. En esta primera aproximación experimental *in vivo* (experimento DSS1) se ensayó un amplio rango de dosis del GC, concretamente 5 dosis que comprenden desde 1 hasta 60  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$ . Dicho intervalo de dosis se seleccionó teniendo como referencia la dosis terapéutica que se usa en clínica (9 mg/día). Ajustando en función de la superficie corporal, se obtiene una dosis terapéutica teórica de unos 23  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$  (1,15 mg/kg/día). Por tanto, las dosis seleccionadas cubren un intervalo amplio a ambos lados de la dosis que podría considerarse idónea *a priori*. Los resultados obtenidos en este experimento reflejan nítidamente el impacto negativo de la administración del GC, que fue dosis-dependiente, ya que la pérdida de peso y el aspecto enfermizo de los animales aumentó con la dosis administrada. Es interesante destacar el incremento en el índice de actividad de la enfermedad, que alcanzó dimensiones espectaculares en el caso de las dosis más elevadas de budesonida y que nos obligó a modificar el protocolo experimental, por razones tanto éticas como puramente prácticas (es decir, para evitar la previsible muerte prematura de la mayor parte de los ratones tratados con las dosis de 6, 12 y 60  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$ ). Así, los animales que recibieron la dosis de 60  $\mu\text{g}$  fueron sacrificados tras 6 días de inducción de inflamación (dos días antes de lo previsto), mientras que los grupos con dosis de 6 y 12  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$  fueron sacrificados el día 7, y únicamente los que recibieron las dosis de 1 y 3  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$  pudieron ser sacrificados al mismo tiempo que el grupo colítico no tratado en el día previsto inicialmente, en este caso el día 8. En contraste con este efecto nocivo global, y en consonancia con lo manifestado en la bibliografía descrita y con el perfil de eficacia clínica de la budesonida, el GC tuvo un efecto antiinflamatorio colónico considerable, manifestado por el descenso consistente y dosis dependiente de diversos parámetros inflamatorios, que resultó notable incluso con la menor dosis ensayada. Entre estos parámetros destacan la actividad MPO colónica, la relación peso/longitud del colon, la fibrosis macroscópica, la valoración histológica y algunos marcadores clásicos evaluados por PCR a tiempo real, que no han sido recogidos en los resultados por ser de carácter preliminar. A pesar de ello, se puso de manifiesto un incremento en el sangrado rectal en los grupos que recibieron dosis elevadas de budesonida. De hecho, la determinación de sangre oculta en heces mostró una respuesta bifásica, de forma que las dosis de 1 y 3  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$  produjeron un descenso, mientras que desde la dosis de 6  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$  en adelante se registró un aumento progresivo. Los ratones tratados con budesonida a 60  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$ , presentaron sangrado rectal patente con sangre fresca visible acompañando a las heces del animal. En consonancia con lo anterior, se produjo un marcado descenso de los eritrocitos y hemoglobina en sangre, así como del hematocrito en los ratones tratados con la dosis superior (60  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$ ).

Los resultados de este experimento confirmaron nuestras observaciones iniciales y las de otros autores, y además nos permitieron establecer que no existe una separación clara entre los efectos

beneficiosos (limitación de la inflamación intestinal) y perjudiciales (deterioro del estado global de los animales). De hecho, ambos efectos parecen ser dosis dependientes, y únicamente las dosis de 1 y 3  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$ , que son 7-23 veces inferiores a la dosis considerada equivalente a la eficaz en el ámbito clínico ajustada en función de la superficie corporal, se asocian a una aparición moderada de los efectos nocivos, aunque por otra parte tampoco son tan eficaces como las dosis superiores en cuanto al control de la colitis. Esta última consideración se ve sustentada por la ausencia de efecto antiinflamatorio en la expresión colónica de IL22, o la producción de IL22, IL27 y GM-CSF por parte de explantes del mismo tejido. Además, es interesante constatar que si se ajusta la dosis de budesonida en función del tamaño relativo (peso) del colon, la dosis de 9 mg/día corresponde aproximadamente a 2-3  $\mu\text{g}/\text{día}$  en el ratón. Esta aproximación podría ser más válida que la basada en tamaño corporal, dado que el efecto de la budesonida es netamente local.

En cualquier caso, la asociación que se observa entre los efectos beneficiosos y perjudiciales sugiere que los mecanismos responsables pueden ser en gran medida coincidentes o, si se prefiere, indisociables. El seguimiento diario de los animales mostró un debilitamiento progresivo, acompañado en los casos más pronunciados de pérdida de sangre, lo que, en vista del efecto antiinflamatorio intestinal, puede considerarse como un problema derivado de la alteración de la función de barrera intestinal por el GC, afectando presumiblemente a los fenómenos de curación epitelial y mucosal. En este caso, cabría esperar un incremento de la translocación de elementos de la microbiota al interior de la mucosa y en último término a sangre, lo que contribuiría lógicamente al deterioro global de los animales produciendo un *shock* séptico. Efectivamente, los ratones colíticos tratados con budesonida mostraron una elevación de nitratos/nitritos en plasma de entre 3 y 7 veces para las dosis de 1, 3 y 6  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$ . Los nitratos plasmáticos son un marcador indirecto de la presencia de óxido nítrico en plasma. Este último desempeña un papel esencial en la fisiopatología de la septicemia, en la medida en que contribuye decisivamente a la hipoperfusión periférica característica de esta afección, al favorecer la disfunción endotelial y la vasodilatación [856]. Por tanto, la elevación de este parámetro, que resulta patente desde dosis de GC tan bajas como la de 1  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$ , sugiere que el fenómeno sistémico que concurre en estos animales es efectivamente la sepsis. Paradójicamente, los niveles descendieron con dosis superiores de budesonida, lo que puede justificarse atendiendo al efecto inhibitor del GC sobre las fuentes periféricas productoras de óxido nítrico, efecto que aparece precisamente en estas dosis elevadas debido a que son las únicas que generan cierta distribución sistémica del GC (ver más adelante).

A pesar de este efecto sistémico, se observó en el grupo tratado con budesonida a la dosis de 60  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$  un drástico incremento de la expresión en tejido pulmonar de iNOS y de la relación p-eNOS/eNOS, así como de la actividad MPO, todos ellos marcadores clásicos de septicemia que desafortunadamente se caracterizan por su escasa sensibilidad, lo que probablemente justifica que se vean incrementadas exclusivamente con la dosis de 60  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$ . Además, se analizó mediante PCR a tiempo real la expresión de IL6 e IL1 $\beta$  en tejido pulmonar, que siguió una tendencia análoga a los resultados anteriormente comentados. Asimismo, los animales tratados con budesonida, independientemente de la dosis utilizada, presentaron resultados positivos de translocación bacteriana al hígado, puesta de manifiesto mediante cultivo en LB agar. Estos resultados no han sido mostrados por tener carácter preliminar y porque la técnica se perfeccionó posteriormente siendo aplicada con éxito en el experimento DSS2. Globalmente, por tanto, nuestros

datos apuntan a un fallo en la contención de la microbiota intestinal por parte del colon inflamado expuesto a la acción de la budesonida.

Otro de los aspectos que queríamos dilucidar mediante el experimento DSS1 fue la distribución sistémica relativa de GC generada por cada una de las dosis ensayadas. Para ello, se evaluó la concentración de corticosterona endógena en plasma. Dicha determinación también se realizó en el experimento DSS2, en este caso acompañada de la evaluación de la expresión génica por PCR a tiempo real de G6Pasa y PEPCCK en tejido hepático. La conclusión que se puede extraer de los resultados obtenidos en DSS1 y DSS2 es que únicamente la dosis de 60 µg/ratón/día genera una distribución sistémica biológicamente relevante, mientras que la de 12 µg/ratón/día se encuentra situada en el límite de contención del efecto de primer paso hepático y probablemente genere cierta llegada de GC al torrente sanguíneo general, pero probablemente no significativa en términos biológicos.

Con la intención de estudiar más detalladamente los efectos intestinales y sistémicos asociados al uso de la budesonida en la colitis aguda inducida por DSS, así como en el generado por este GC al ser administrado a animales sanos, se seleccionaron las dosis de 3 y 12 µg/ratón/día por considerarse que siguen abarcando un espectro suficientemente amplio de dosificación sin producir una supresión clara del eje HHA. Estas dosis fueron administradas a animales sanos o sometidos a colitis aguda inducida por DSS, obteniéndose un resultado comparable al descrito para DSS1 en los animales colíticos, ya que estos experimentaron una patente mejoría del estado inflamatorio del tejido colónico evaluado por PCR a tiempo real. Este efecto se acompañó de un incremento en las células Treg en los MLN, coherente con el conocido incremento de la expresión de GILZ asociado al tratamiento con GC [857, 858]. Nuevamente, este efecto protector se vio acompañado de un incremento notable de la pérdida de peso y con un deterioro global de los animales. Además, de forma coherente con los resultados de DSS1, en este experimento se observó un descenso de los eritrocitos, hemoglobina y hematocrito sanguíneos que, aunque no alcanzó significancia estadística, se aproximó sustancialmente en el grupo tratado con la dosis de 12 µg/ratón/día (valores de p de 0.11, 0.07 y 0.055, respectivamente). No se observaron en general efectos nocivos de la budesonida en animales sanos, con excepción de una leve pérdida de peso (5%), significativa desde el punto de vista estadístico a partir del día 4 de administración en el grupo tratado con 12 µg/ratón/día de GC.

Uno de los principales objetivos de este experimento fue el de realizar un estudio más detallado sobre la translocación bacteriana y septicemia secundaria al tratamiento con budesonida. En este caso, la determinación de nitratos/nitritos en plasma arrojó un resultado comparable al obtenido en DSS1 en el que estaban incluidas esas mismas dosis, pero además nos permitió comprobar que este parámetro no se encuentra alterado por el GC cuando este se administra en ausencia de inflamación. Por otro lado, se evaluó la translocación bacteriana mediante el cultivo directo de bacterias viables, tanto en hígado como en MLN, dada la relevancia de la vía linfática en este fenómeno, al menos en comparación con la vía venosa portal [859, 860]. En consonancia con la bibliografía [861], a pesar de que la colitis aguda inducida por DSS cursa con un compromiso sustancial de la función de barrera intestinal, la detección de bacterias viables en los dos tejidos considerados resultó meramente anecdótica en los animales colíticos no tratados [862]. Por su parte, la budesonida no produjo efecto alguno en ese sentido cuando se administró a animales sanos, pero sí en los colíticos, en los que se observó un espectacular aumento de la presencia de

bacterias viables aerobias y anaerobias en los MLN y de aerobias en hígado asociado a las dos dosis ensayadas. Con objeto de conseguir una mejor definición de la pérdida de competencia en la contención de la microbiota intestinal generada por la budesonida, se cuantificó la presencia de LPS en hígado. En consonancia con lo anteriormente expuesto, se observó una acumulación de este PAMP de forma dosis dependiente en los ratones colíticos expuestos a budesonida. Notablemente, este parámetro se vio asimismo incrementado en los ratones sanos tratados con el GC, a pesar de no detectarse apenas bacterias viables en tejidos extraintestinales, aunque en mucha menor medida que en los ratones colíticos. Finalmente, se decidió corroborar a otro nivel la concurrencia de un proceso séptico en los animales colíticos tratados con budesonida, en este caso mediante la determinación de IL18 en plasma. Esta citoquina es considerada uno de los mejores exponentes de la “tormenta de citoquinas” que se desencadena a nivel sistémico en los animales que desarrollan una septicemia. De forma coherente con el resto de resultados, se observó un incremento significativo y dosis dependiente en los ratones tratados con budesonida durante la inducción de la colitis aguda con DSS [863]. La evaluación mediante PCR a tiempo real de parámetros relacionados con la señalización y/o detoxificación de LPS en el hígado (TNAP, CD14, LBP, TLR4) muestra un aumento significativo de los mismos en los animales colíticos no tratados, excepto en el caso de la TNAP. Este incremento tiende a verse inhibido por la administración de budesonida, mientras que el GC no ejerce ninguna modulación en este sentido al ser administrado a animales sanos. Estos datos pueden indicar una respuesta hepática a una mayor carga de LPS inducida por la administración de budesonida, o bien una respuesta global asociada únicamente a la inflamación intestinal, que a su vez se encuentra modulada negativamente por el GC.

El conjunto de resultados discutidos hasta este punto sugiere que la administración de budesonida durante la inducción de la colitis aguda por DSS provoca un debilitamiento de la función de barrera intestinal que se caracteriza por un notorio aumento del sangrado rectal y una menor capacidad de contención en la luz intestinal de los elementos bacterianos viables de la microbiota intestinal y sus antígenos. Este efecto no se produce sustancialmente en ausencia de inflamación, aunque nuestros datos (presencia de LPS en hígado) apuntan a una cierta alteración de la función de barrera aun en este caso.

Con objeto de examinar detalladamente diferentes componentes implicados en la función de barrera intestinal, realizamos un estudio de fragmentos de tejido colónico distal completo en cámara de Ussing. De acuerdo con resultados publicados por nuestro grupo de investigación y por otros autores, en condiciones inflamatorias se produjo una inhibición prácticamente total del transporte hidroelectrolítico electrogénico intestinal, evidenciada por la disminución de los valores de  $I_{sc}$  (corriente de cortocircuito) basal, que además se acompañó de una desaparición de la respuesta secretora al secretagogo carbacol. Por su parte, la budesonida a la dosis de 12  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$  fue capaz de revertir parcialmente este efecto sobre la  $I_{sc}$  basal, lo que resulta coherente con los efectos descritos para los GC a este nivel, pero no llegó a modificar en ningún sentido la respuesta a carbacol. Asimismo, se recogieron datos referentes a la conductancia del tejido intestinal, a cuyo respecto cabe reseñar que la administración de budesonida tanto en condiciones basales como inflamatorias se asoció a un incremento sutil de la misma, aparentemente dependiente de la dosis (datos no mostrados). Además, se ensayó la permeabilidad paracelular a FITC-dextrano del tejido colónico distal montado en cámara de Ussing con objeto de determinar si la budesonida perjudicaba de algún modo la función de barrera intestinal en su

vertiente meramente física, lo que parecería coherente con muchos de los resultados antes expuestos. Sorprendentemente, la administración del GC no solo no produjo este efecto, sino que en el tejido de los animales que recibieron budesonida se observó una cierta tendencia hacia una reducción de la permeabilidad al fluoróforo, que en cualquier caso anduvo lejos de la significancia estadística, en lo que las características inherentes a la técnica utilizada pudieron contribuir. De la interpretación de estos resultados se puede concluir que de forma asociada al efecto antiinflamatorio directo del GC sobre el propio epitelio de la mucosa intestinal, la administración de budesonida parece mejorar ligeramente la función de barrera epitelial desde el punto de vista exclusivamente físico-paracelular al menos, por lo que la modulación ejercida sobre la misma no justifica el severo compromiso de la función de barrera intestinal inducido por el tratamiento aquí ensayado. Estas consideraciones se encuentran también apoyadas por el similar efecto observado *in vitro* en el caso de las líneas celulares murinas IEC4.1 e IEC18, aunque en este último caso las condiciones experimentales dispuestas fueran mucho más reduccionistas, dado que por ejemplo el componente inflamatorio y la infiltración leucocitaria no ejercen influencia alguna a diferencia de lo que ocurre en el tejido colónico completo expuesto a DSS.

Los resultados correspondientes a los experimentos DSS1 y DSS2 sugieren que el debilitamiento de la función de barrera intestinal generado por la budesonida en animales con colitis aguda inducida por DSS, así como la sepsis resultante, están implicadas en el deterioro del estado de los animales. Además, podemos afirmar que este fenómeno coexiste con el efecto antiinflamatorio, es más, presumiblemente ambos se encuentran asociados a los mismos mecanismos de actuación. Nuestros resultados indican también que la budesonida inhibe de un modo potente y dosis dependiente la hiperplasia epitelial que aparece ante la agresión del DSS y que forma parte de la respuesta adaptativa regeneradora (ver más adelante).

Con objeto de dilucidar el papel ejercido por la microbiota en los efectos observados de la budesonida nos planteamos llevar a cabo un experimento en el que redujimos hasta niveles indetectables la carga bacteriana intestinal mediante el uso de un cóctel de antibióticos, tal y como se describe en la sección de material y métodos. Como era de esperar, en este experimento se registró una total ausencia de translocación bacteriana a tejidos extraintestinales, así como de LPS hacia hígado. En otros experimentos realizados por nuestro grupo de investigación, hemos podido observar cómo la respuesta inflamatoria asociada a la administración de DSS en agua de bebida se encuentra radicalmente disminuida tanto en este tipo de animales que podemos denominar pseudoestériles, como en los ratones criados en esterilidad total o GF [864]. Paradójicamente, en estos animales la administración de DSS, a pesar de no desencadenar un proceso inflamatorio evidente, produce un marcado deterioro del estado general del animal que fundamentalmente consideramos asociado a una pérdida masiva de sangre vía intestinal. Del mismo modo, en el experimento denominado DSS-PGF en la presente tesis doctoral tampoco se observó una inflamación intestinal sustancial, pero en cambio el estado general del animal empeoró claramente como consecuencia de un severo sangrado rectal, que queda evidenciado en el índice de actividad de la enfermedad, lo que a su vez resulta consistente con resultados similares previamente publicados [234]. La ausencia de inflamación marcada en estas condiciones está justificada por la depleción de la microbiota, frente a la que reacciona el sistema inmunológico en este y otros modelos. El deterioro de los animales se asocia por tanto a mecanismos alternativos, concretamente al sangrado rectal asociado a una desorganización masiva del epitelio. Este fenómeno se vio



agudizado como consecuencia de la administración de budesonida a una dosis baja (3 µg/ratón/día), lo que se ve reflejado en los resultados relativos a la cuantificación de sangre en heces, que aumentó de forma drástica y que resultó evidente con la simple observación de los ratones, dado que presentaban incluso hemorragia intraperitoneal, cosa que no ocurrió en ningún caso en los animales no expuestos conjuntamente a DSS y el GC. En consonancia con lo anterior, los valores de eritrocitos, hemoglobina y hematocrito en sangre se vieron muy reducidos en el grupo DSS-PGF tratado con el GC. Al mismo tiempo, se produjo un incremento de la permeabilidad a FITC-dextrano ensayada *in vivo* de un orden comparable. Además, de forma coherente con este resultado, se observó un notable incremento de la concentración de DKK1 en plasma y una reducción de la expresión de Cyclin D1 en colon, que permiten inferir un severo retraso en la restitución epitelial. Estas alteraciones en el epitelio de la mucosa intestinal se vieron asociadas a una tendencia al aumento de los niveles de nitratos/nitritos en plasma. Es preciso tener en cuenta que el protocolo de depleción bacteriana seguido en este caso no genera una eliminación absoluta de la microbiota, de forma que no se puede descartar que se pueda producir un cierto grado de translocación de antígenos bacterianos no detectable por cuestiones de sensibilidad, el cual podría justificar esta ligera tendencia. No obstante, resulta evidente que el deterioro del estado de los animales expuestos a budesonida se debe a la pérdida de sangre y no a una respuesta de tipo séptico, extremo que es apoyado por las observaciones realizadas en el tejido pulmonar, donde no se observó un incremento de la expresión proteica de iNOS, la relación p-eNOS/eNOS o la actividad enzimática MPO en el grupo que recibió el GC (aunque debe recordarse que estos parámetros no son suficientemente sensibles, ya que en el experimento DSS1 únicamente se vieron alterados con la dosis de 60 µg/ratón/día).

La pérdida de sangre a nivel intestinal parece por tanto estar muy relacionada con los efectos nocivos de la budesonida, y se potencian en ausencia de la microbiota normal. Un mecanismo que puede ser relevante en este contexto es el efecto de los GC sobre la angiogénesis. Los GC son considerados antiangiogénicos. Este efecto deriva en primer lugar de su efecto antiinflamatorio, que produce un descenso en la producción de mediadores inflamatorios solubles como la IL6 de forma tanto directa como indirecta (al reducir la infiltración leucocitaria), que entre otros efectos tienen capacidad de estimular la angiogénesis [865]. Este mecanismo sería poco relevante en el experimento DSS-PGF, puesto que la inflamación asociada al modelo es escasa. Por otra parte, los GC reducen la producción de VEGF (principal mediador pro-angiogénico) en células epiteliales, además de su capacidad para inhibir de forma directa la respuesta de las células endoteliales al propio VEGF (mediante su característica interacción por "*tethering*" o atadura con el factor de transcripción STAT3) y a otros factores de crecimiento angiogénicos como RSPO3 [672, 866-868]. Clásicamente se ha asumido que los procesos angiogénicos durante la inflamación intestinal juegan un papel perjudicial en la progresión de la patología, especialmente en los modelos que se asemejan a la CU [869]. Se piensa que factores como el VEGF o el *platelet derived growth factor* (PDGF), que se ven normalmente aumentados en condiciones inflamatorias tanto a nivel clínico como experimental, producen un desequilibrio de la proliferación endotelial en la microvasculatura de la mucosa intestinal que participa activamente en la fisiopatología de la inflamación y en el daño tisular [870, 871]. Tanto es así, que a proteínas antiangiogénicas como la endostatina o la angiostatina, que deben dicha acción principalmente a su acción antagonista respecto al VEGF, se les atribuye un potencial papel beneficioso en la EII [872]. Sin embargo, debido a la erosión del epitelio intestinal inherente al modelo de colitis por DSS, se produce una

destrucción sustancial de la microvasculatura de la mucosa que justifica el profuso sangrado rectal que caracteriza al modelo. Por tanto, es posible que la angiogénesis en este caso específico resulte beneficiosa, en la medida que pudiera favorecer la restitución y la integridad de la arquitectura normal en la microvasculatura de la mucosa intestinal. De ser así, este mecanismo justificaría al menos en parte el mayor sangrado rectal y el deterioro resultante del estado del animal asociados al tratamiento de los ratones colíticos con budesonida. Desafortunadamente este mecanismo no ha sido explorado en la presente tesis doctoral, y queda pendiente de estudio en un futuro.

Los experimentos DSS1 y DSS2 han servido para poner de manifiesto los efectos de la budesonida sobre la colitis aguda inducida por DSS cuando esta se administra de forma concomitante con el DSS. Los resultados obtenidos pueden estar asociados a los efectos desarrollados por los GC a distintos niveles, incluyendo los efectos locales de carácter antiangiogénico, antiproliferativo, inmunosupresor y antiinflamatorio, y los efectos a nivel sistémico en algunos casos. Es posible que algunas de estas acciones puedan ser analizadas separadamente en función de su secuencia temporal, en particular en el caso de las acciones sobre el sistema inmunológico. En este sentido, se ha descrito que el debilitamiento del sistema inmunológico, por ejemplo mediante la reducción del número o capacidad funcional de los macrófagos o células dendríticas de lamina propia, aumenta la respuesta inflamatoria en la colitis aguda experimental inducida por DSS, aunque los datos son controvertidos [181, 873, 874]. Con objeto de examinar el efecto exclusivo del pre-tratamiento con el GC llevamos a cabo el experimento DSS3, en el que la budesonida fue administrada durante 5 días previamente a la inducción de colitis por DSS en el segundo de los dos ciclos a los que fueron sometidos los animales. En este caso además se utilizó un modelo de colitis crónica, dado que los animales habían sido expuestos anteriormente a otro ciclo de DSS con recuperación de dos semanas entre ambos. Por tanto, los animales empezaron a recibir el GC cuando ya estaban plenamente recuperados de la lesión epitelial e inflamatoria inicialmente inducida. Este período se fijó con base en estudios publicados y en experimentos de puesta a punto propios. Con dicho protocolo experimental se pretendió mimetizar hasta cierto punto las condiciones de recurrencia de la colitis en humanos. Para facilitar la comparación con los ensayos anteriores, se decidió emplear las dosis de 3 y 12  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$ . Los resultados obtenidos reflejan un efecto protector real asociado a la budesonida, pero moderado en comparación con los experimentos DSS1 y 2, como reflejan parámetros como la relación peso/longitud, actividad AP colónica y la concentración de monocitos en sangre. Este efecto fue dosis dependiente y se asoció a una mejora del estado general de los animales, con reducción del índice de actividad de la enfermedad y del peso corporal, a diferencia de los experimentos anteriores. De forma coherente con este resultado, todos los parámetros que en anteriores experimentos nos permitieron poner de manifiesto la disfunción de barrera, translocación bacteriana y sepsis subsiguiente arrojaron en este caso resultados negativos, independientemente de la dosis utilizada. Teniendo en cuenta la hipótesis de partida que nos hizo plantearnos este enfoque experimental, estos resultados en un principio nos parecieron extraordinariamente sorprendentes teniendo en cuenta que supone un comportamiento radicalmente divergente al mostrado por los animales cuando la budesonida es administrada durante la inducción de la colitis. Sin embargo, en el fondo son perfectamente consistentes con el principio de que las acciones protectoras y perjudiciales de la budesonida coexisten, en el sentido de que las segundas necesitan de las primeras para aparecer. De hecho, en este caso observamos un efecto antiinflamatorio reducido de la budesonida, con total ausencia de manifestaciones negativas

sistémicas, producto de un efecto meramente residual del GC que se ve sustancialmente atenuado en el tiempo. Por otra parte, estos resultados no apoyan en principio la hipótesis de que el tratamiento con GC pueda condicionar el riesgo de recidiva en el ámbito clínico, aunque la separación en el tiempo del principio de la colitis y del tratamiento con budesonida, entre los que transcurren 14 días, permite la total recuperación de la integridad de la mucosa intestinal, lo que supone una considerable limitación a este tipo de interpretación. Una interpretación alternativa sería que los efectos de la budesonida en este experimento varían por las características específicas del modelo crónico de colitis por DSS; sin embargo, para poder validar esta hipótesis sería necesario repetir el ensayo manteniendo el tratamiento con el GC de la misma forma que en el protocolo utilizado en colitis aguda.

Por otra parte, un posible mecanismo operativo en este experimento es la modificación de la microbiota por el GC, según un estudio publicado recientemente por Huang *et al* [875]. Efectivamente, los GC producen una modulación sustancial de la composición cualitativa de la microbiota intestinal, constatándose concretamente cuando la administración de dexametasona se realiza vía intraperitoneal entre 10 días y 4 semanas, y a dosis que oscilan entre 1 y 5 mg/kg/día. Desafortunadamente no se describe el mecanismo exacto que genera dicho efecto, aunque debe estar relacionado con efectos indirectos secundarios a las acciones sistémicas de la dexametasona. En este trabajo tampoco queda claramente definida la contribución relativa de las acciones directas de los GC sobre las células epiteliales intestinales, aunque se puede inferir que su estimulación de la producción de mucinas (también descrita en esta tesis doctoral) puede ser importante en ese sentido. La constatación de la generación de una microbiota menos colitogénica se ha realizado mediante un trasplante fecal a animales IL10 KO GF. En nuestros estudios no hemos evaluado este posible mecanismo, pero teniendo en cuenta las dosis utilizadas, la vía de administración y el tiempo de aplicación, consideramos que no es descartable en absoluto. Dado que los cambios en la microbiota subsistirían probablemente a la retirada del GC, es un mecanismo cuya contribución sería especialmente plausible en el experimento DSS3 pero, en ese caso, su importancia cuantitativa sería muy reducida teniendo en cuenta el efecto terapéutico observado.

En el modelo de colitis inducida por DSS la alteración de la barrera epitelial intestinal es la causa desencadenante del proceso inflamatorio, lo que no se corresponde en general con el mecanismo colitogénico en humanos. Por el contrario, el modelo de colitis inducida por transferencia linfocitaria presenta un mecanismo inflamatorio dependiente de la expansión y diferenciación de los linfocitos T vírgenes administrados hacia los subtipos Th1 y Th17, lo que no solo le confiere un carácter crónico, sino también un origen fisiopatológico *desde el interior*, características que lo aproximan notablemente a la EII en humanos. Es especialmente relevante para nosotros que en este modelo el grado de erosión epitelial, y por ende el compromiso en la función de barrera en la mucosa intestinal, es muy inferior al que aparece en la colitis inducida por DSS, lo que nos permite evaluar el impacto adicional de la budesonida sobre la función de barrera. En contraste con lo observado en los experimentos DSS1 y 2, y de forma similar al experimento DSS3, pero con resultados mucho más pronunciados, la budesonida mejoró extraordinariamente la inflamación tanto a nivel intestinal, como revelan tanto los resultados obtenidos por PCR a tiempo real en tejido colónico completo, como a nivel sistémico, tal y como queda reflejado en los resultados de detección de citoquinas Th1 por ELISA en plasma, que reflejan un descenso dosis y tiempo dependiente de la concentración de las mismas. No aparecieron indicios de deterioro global

de los animales, de pérdida de sangre o de sepsis. Los animales con colitis por transferencia linfocitaria no tratados presentaron translocación bacteriana positiva a MLN, pero notablemente inferior (unas 100 veces) a la obtenida en el modelo del DSS, lo que concuerda con el menor grado de afectación de la función de barrera propio de este modelo. El recuento de bacterias anaerobias no reflejó diferencias entre ninguno de los grupos colíticos, independientemente de que recibieran o no GC. Sin embargo, en el caso de las bacterias aerobias se observó una ligera tendencia al alza en el grupo tratado con 12 µg/ratón/día de budesonida, sin alcanzar significancia estadística. De forma coherente con la menor translocación bacteriana, no se detectaron bacterias viables en el hígado de estos animales.

La interpretación más sencilla y directa de nuestros resultados es que la budesonida, y por extensión los GC, tienden a debilitar la función de barrera intestinal al tiempo que producen efectos antiinflamatorios en el intestino. Esta alteración de la barrera es perjudicial, pero no es relevante si no hay factores adicionales que concurran, como una erosión directa del epitelio y/o la ausencia de microbiota intestinal. En ausencia de dichos factores, predomina el efecto protector de carácter antiinflamatorio, como el que se observa en el modelo de colitis por transferencia linfocitaria. En este sentido, es interesante especular sobre el tipo de respuesta que se produce en un momento dado en seres humanos. Claramente, los GC son útiles en el manejo de los brotes inflamatorios de EII, pero no está claro en qué medida pueden influir las alteraciones de la función de barrera que presentan estos pacientes, incluso con anterioridad al desarrollo de la enfermedad clínicamente activa. Es posible por tanto que estas puedan incidir en el efecto global de los GC, limitando tal vez su utilidad clínica.

El GR se encuentra distribuido en la práctica totalidad de las células del organismo, y en ese sentido las células epiteliales intestinales no suponen una excepción. Por tanto, es factible que los GC presenten efectos significativos sobre el epitelio intestinal que resulten determinantes en el efecto global de estos fármacos sobre la inflamación intestinal. Dado que nuestros resultados indican alteraciones sustanciales en la función de barrera intestinal asociadas a la administración de budesonida en animales sometidos a colitis aguda inducida por DSS, decidimos profundizar en el estudio de las acciones de los GC sobre el epitelio. Además, dada la ausencia de estudios comparativos entre varios GC a este nivel, abordamos estos experimentos trabajando con cuatro GC en paralelo: budesonida, dexametasona, que es considerado el GC más potente, hidrocortisona y prednisolona, que, a diferencia de la prednisona, no requiere activación metabólica para ejercer su efecto. Dado que la realización de cultivos primarios de células epiteliales intestinales es sumamente difícil, y generalmente no se puede extender más allá de unas pocas horas, estos experimentos *in vitro* han sido desarrollados haciendo uso de varias líneas celulares de epitelio intestinal clásicamente utilizadas por nuestro grupo de investigación. No obstante, recientemente hemos incorporado la técnica emergente de cultivo de enterocitos como organoides *in vitro*, lo que permitirá extender nuestras observaciones en un futuro cercano.

Con la intención de estudiar el efecto de los GC sobre la invasión bacteriana, desarrollamos para esta tesis doctoral un método basado en el co-cultivo de líneas celulares murinas de epitelio intestinal y bacterias *E. coli* modificadas con un vector inductor de la expresión de la proteína verde fluorescente. Este nos ha permitido detectar mediante citometría de flujo la invasión de las células epiteliales intestinales por parte de bacterias *E. coli* LF82 (cepa enteroinvasiva). Como control, utilizamos una cepa de *E. coli* (K12) de carácter no invasivo. La exposición de la línea celular de

ratón IEC4.1 durante 48 horas (aunque no durante 24 horas) a la budesonida, pero no a los demás GC, produjo un incremento consistente de la susceptibilidad a la invasión bacteriana, de manera dependiente de la concentración. Por otro lado, en las células IEC18 de rata este efecto se observó igualmente, pero en este caso de forma global, es decir, con los 4 GC, y tanto a 24 h como a 48 h. A diferencia de lo ocurrido en las células IEC4.1, en este caso no se observó dependencia de la concentración, es decir, este efecto parece estar saturado a 1  $\mu\text{M}$ . Estos datos indican que los GC, y particularmente la budesonida, incrementan la invasión bacteriana sobre las células epiteliales intestinales murinas, lo que está en consonancia con resultados previos obtenidos por otros autores [787]. Es probable que esta acción esté implicada en el efecto amplificador de la translocación bacteriana de la budesonida. La cepa LF82 de *E. coli* es capaz de adherirse e invadir las células enteroabsortivas (además de otras células como los macrófagos) que componen mayoritariamente el epitelio intestinal, lo que justifica su denominación como *adherent-invasive E. coli* (AIEC). A pesar de que esta especie bacteriana en concreto no transloca en todos los casos hacia el compartimento basolateral, la detección de estas bacterias en los granulomas de pacientes con EC no es infrecuente. Dicha translocación se produce con mayor frecuencia, cuando la interacción se produce con células M del epitelio que limita las placas de Peyer [281]. En general, el paso de bacterias a través de la mucosa intestinal es una realidad incluso en condiciones homeostáticas. Este fenómeno se produce por vía transcelular, incluso cuando la barrera epitelial está formada por enterocitos morfológicamente intactos, lo que necesariamente requiere de la invasión epitelial, que según nuestros resultados parece ser facilitada por la exposición de las células epiteliales a GC. Desafortunadamente, hasta la fecha no hemos podido definir el mecanismo concreto que subyace en este efecto [876]. La vía paracelular, por su parte, puede verse facilitada por un debilitamiento de las uniones estrechas entre enterocitos.

Con la intención de evaluar los efectos de los GC sobre la permeabilidad paracelular de monocapas de células epiteliales intestinales, diseñamos una serie de experimentos orientados a determinar la permeabilidad de las mismas al fluoróforo FITC-dextrano. Para ello, las células epiteliales intestinales murinas (IEC4.1 e IEC18) y las humanas CACO-2 fueron cultivadas en Transwells® hasta su total confluencia, generando unas monocapas cuya integridad fue comprobada mediante la determinación de su TEER. Tanto la budesonida como la dexametasona generan, al ser aplicados a células IEC4.1, un cierto reforzamiento de la función de barrera, evidenciado por un descenso del paso de FITC-dextrano a través de las monocapas, sobre todo a la concentración más alta ensayada (10  $\mu\text{M}$ ). En este sentido, es imprescindible hacer referencia a que las células IEC4.1 tienen un fenotipo muy indiferenciado, tal y como se indicó en el apartado de resultados, por lo que los conocidos efectos pro-diferenciadores de los GC sobre las células epiteliales pueden justificar esta mejora en la contención del fluoróforo por un aumento de la expresión de algunas de las proteínas que componen las uniones estrechas. En la línea celular IEC18 los resultados son básicamente comparables a los arriba descritos en IEC4.1, dado que los 4 GC ensayados en ese caso a 1  $\mu\text{M}$  generan un descenso estadísticamente significativo de la permeabilidad a FITC-dextrano. En CACO-2 no diferenciadas, nuestros resultados representativos de tres experimentos independientes sugieren un efecto de los GC opuesto al descrito en las líneas celulares murinas, aunque no se alcanzó la significancia estadística en ningún caso. En el caso de las células CACO-2 diferenciadas, esta tendencia se encuentra acrecentada, apareciendo un incremento de la permeabilidad paracelular asociado a la exposición a GC que alcanzó la significancia estadística para la budesonida ensayada a 10  $\mu\text{M}$ . El comportamiento divergente de

las líneas celulares murinas y humana es de difícil interpretación, aunque la escasa diferenciación basal de las mismas podría interpretarse como una justificación, tal y como se describe arriba. Por otro lado, merece comentario el hecho de que el incremento de la permeabilidad paracelular generado por los GC en CACO-2 sea más notorio cuando éstas se encuentran diferenciadas. Este fenómeno puede estar relacionado con la expresión relativamente baja del GR en esta línea celular humana en ausencia de diferenciación, así como sobre el incremento progresivo de la misma con el transcurso de los días de cultivo en condiciones de confluencia [79].

Los daños directamente inducidos por el DSS sobre la barrera intestinal derivan fundamentalmente de una erosión sustancial del epitelio mucosal. Evidentemente, este fenómeno se encuentra directamente relacionado con el aumento de la permeabilidad intestinal y de la translocación bacteriana que se produce en este modelo. Una de las características fundamentales de la fisiología del epitelio intestinal es su capacidad para recuperarse de una lesión, mediante respuestas restitutivas robustas dependientes en parte del incremento de la proliferación epitelial. Por tanto, encontramos pertinente evaluar *in vitro* las acciones ejercidas por los GC sobre la proliferación de células epiteliales, con la intención de sustentar algunos de los hallazgos derivados de los experimentos *in vivo* ya comentados. Haciendo uso de un modelo clásico de lesión epitelial hemos podido constatar que los cuatro GC ensayados retrasan la recuperación epitelial post-lesión de monocapas de células IEC4.1, tanto en condiciones basales como en presencia de agentes inductores de proliferación epitelial como IL22, IL27 y KGF. Es importante destacar que en general no se aprecia una clara relación entre la concentración de GC ensayada y el efecto inhibitor, excepto en los experimentos realizados en presencia de IL27, en los que se apreció una reducción del efecto de los cuatro GC a la concentración de 0.1  $\mu$ M. Este hecho implica que para los GC incluidos en este estudio y las condiciones experimentales dispuestas, el efecto inhibitor de la restitución epitelial de los GC se encuentra básicamente saturado a una concentración relativamente baja (0.1  $\mu$ M). *In vivo*, la budesonida produjo un efecto antiproliferativo comparable, a juzgar por los resultados relativos a la incorporación epitelial de BrdU y a la expresión de Cyclin D1, c-Myc y c-Jun en el tejido colónico completo de los animales incluidos en el experimento DSS2. Es importante destacar que el efecto mencionado en la frase anterior se manifiesta desde dosis de budesonida tan bajas como las de 1 y 3  $\mu$ g/ratón/día, aunque asimismo en general siguió un claro perfil dosis dependiente

Este efecto inhibitor de la reepitelización es coherente con la acción de los GC sobre STAT3, implicado en la transducción de señal de IL22, IL27 y KGF, mediante un mecanismo de *tethering* [626]. De hecho, nuestros datos indican una drástica reducción de la expresión del gen codificante de SOCS3 (diana de STAT3) en el tejido colónico de los animales incluidos en el experimento DSS2. Por supuesto, *in vivo* se produce además una reducción de los niveles de estas citoquinas por los GC; en nuestro caso, este efecto es patente en el experimento DSS2 y en el de transferencia linfocitaria. Por tanto, ambos mecanismos dan lugar a una disminución de la señalización por STAT3 en la mucosa inflamada. Es importante reseñar que alteraciones de la señalización de STAT3 se han asociado con un aumento del riesgo de desarrollar EII [877-879], así como con un aumento de la gravedad de la colitis experimental. De hecho, la delección específica de STAT3 en las células epiteliales intestinales genera un fenotipo caracterizado por una menor capacidad de restitución epitelial ante la agresión del DSS, que lógicamente se traduce en un notable incremento de la severidad del modelo y en un retraso en la curación epitelial, que fue monitorizada durante

28 días tras la retirada del DSS. En este trabajo se pone claramente de manifiesto el papel decisivo de citoquinas como la IL22 o la IL27 a este nivel [443, 450]. Ambas citoquinas tienen efectos protectores en la colitis aguda por DSS, a juzgar por el aumento de la severidad del proceso inflamatorio en ratones con delección genética para las mismas [82-84, 880, 881]. La implicación en la homeostasis intestinal parece extenderse a la inflamación secundaria a infección, como en la colitis inducida por *Citrobacter rodentium* [882, 883].

Dada la importancia de este mecanismo, nos propusimos estudiar el efecto *in vitro* de los GC sobre dos tipos celulares implicados en la producción de estas citoquinas, concretamente células dendríticas de bazo y células T CD4+, purificadas mediante separación celular magnética. Nuestros resultados muestran una inhibición casi total de la producción de IL22 por la budesonida y la dexametasona. Desafortunadamente, en el sobrenadante de estos cultivos no se consiguió detectar IL27. Con la intención de perfilar mejor esta vertiente de nuestros resultados, se utilizaron BMDC, pero en nuestras condiciones experimentales estas no respondieron a IL23. Sí lo hicieron en cambio a LPS y PGN, con aumento de la producción de IL27, además de IL6, y TNF $\alpha$ . Esta respuesta se vio asimismo inhibida por GC tanto a 1 como a 10  $\mu$ M.

De un modo más general, los efectos nocivos de los GC en la colitis pueden estar relacionados con acciones inmunomoduladoras características de este grupo farmacológico que en el intestino pueden tener consecuencias específicas. Es el caso por ejemplo de la IL17A, cuyos niveles están muy reducidos por el tratamiento con budesonida, según nuestros resultados obtenidos por PCR a tiempo real y mediante cultivo de tejido colónico *ex vivo* (experimentos DSS1 y DSS2). Los ratones con delección genética de esta citoquina presentan una respuesta exacerbada al DSS, debido esencialmente a un defecto en el componente inmunológico de la función de barrera intestinal, aunque existen algunos trabajos que presentan resultados ligeramente discordantes en ese sentido [884]. Asimismo, se ha relacionado la enteropatía asociada a pacientes VIH+, que cursa con aumento en la permeabilidad intestinal, con la reducción del número y funcionalidad de las células T CD4+, en especial aquellas comprometidas con el sello Th17 [151, 885, 886]. El efecto tan contundente observado en nuestros experimentos contrasta con la refractariedad parcial a la respuesta a GC que se ha constatado en las células T CD4 Th17 obtenidas de pacientes con EII [887].

Otra diana a considerar es el GMCSF, cuyos niveles colónicos están asimismo reducidos en los ratones tratados, como muestran los datos de cultivo de tejido colónico *ex vivo* en el experimento DSS2. Esta citoquina tiene, entre otros, efectos sobre la proliferación epitelial, según puso de manifiesto un estudio con delección restringida al epitelio intestinal [89]. Del mismo modo, la IL1 $\beta$  producida por células hematopoyéticas, a diferencia de la IL1 $\alpha$  de origen epitelial, presenta un efecto predominantemente protector en la colitis inducida por DSS, lo que se atribuye al favorecimiento de la proliferación de las células epiteliales intestinales y consecuentemente la restitución de la barrera epitelial [90]. Dado el efecto supresor de la budesonida sobre esta citoquina, se trata de otro mecanismo que se puede considerar que participa en el efecto que hemos observado. Hay que considerar asimismo la contribución de la IL6, suprimida por los GC como queda de manifiesto en los resultados de cultivo de explantes colónicos *ex vivo* en el experimento DSS2 y en los resultados *in vitro* referentes a esplenocitos totales y BMDC. Esta citoquina tiene efectos protectores frente a la agresión generada por el DSS [60]. Por último, nuestros resultados obtenidos *in vivo*, pero sobre todo *in vitro* mediante el cultivo de esplenocitos totales obtenidos de

ratones expuestos a DSS o BMDC que fueron estimulados con diversos PAMP, muestran una inhibición de la producción de TNF $\alpha$ . En este sentido, cabe recordar que los animales con delección genética de la citoquina o del receptor TNFR1 desarrollan un incremento de su susceptibilidad a la colitis por DSS [888, 889]. Este hecho contrasta con el uso clínico bien conocido de los fármacos anti-TNF $\alpha$  en la EII, aunque cabe recordar que el mecanismo de estos agentes no está totalmente aclarado [855, 890, 891]. En este sentido, aunque hasta la fecha no se ha establecido una relación formal, no se puede descartar que el comportamiento de los animales TNF $\alpha$  KO en la colitis por DSS se deba al menos en parte a un impedimento de la inducción de la esteroidogénesis local en las células epiteliales intestinales de la base de las criptas [817, 826].

Dada la importancia de las células epiteliales en la función de barrera y su implicación en los efectos nocivos de los GC, decidimos explorar en detalle sus efectos sobre la respuesta de las mismas a diferentes PAMP. Es bien conocido que las células epiteliales intestinales se ven estimuladas de forma continua por PAMPs y otros componentes de la microbiota, lo que contribuye al funcionamiento del sistema inmune innato de la mucosa intestinal. Los PAMP estimulan receptores PRR, entre los que destacan por su relevancia funcional los TLR, cuya transducción de señal a nivel intracelular está mediada principalmente por la cascada canónica de NF- $\kappa$ B y las MAPKs, como se ha comentado con anterioridad. De la señalización en la que están implicadas estas proteínas dependen efectos como la estimulación de la producción de citoquinas inflamatorias, la inhibición de la apoptosis y el incremento de la proliferación celular. Como era de esperar, se observó una notable disminución de la respuesta pro-inflamatoria (producción de citoquinas) al LPS por parte de células epiteliales intestinales cultivadas *in vitro*, cuando el cultivo se realizó en presencia de los GC. Este efecto se debe al bloqueo de la vía NF- $\kappa$ B, así como de las vías de señalización dependientes de MAPKs por inducción de MKP1 [892]. Sin embargo, paradójicamente, se ha descrito que los GC incrementan la expresión de TLR2 en células epiteliales intestinales, aunque no se han publicado aún resultados en el mismo sentido considerando el TLR4 [787]. Nuestros resultados *in vitro* revelan una inducción de TLR4 en células IEC4.1 expuestas a los diferentes GC durante 4 días, mientras que *in vivo* obtuvimos resultados coincidentes que lo publicamos anteriormente citada en relación a la expresión de TLR2. Por tanto, decidimos comprobar si esto generaba un aumento de la sensibilidad de las células epiteliales intestinales a LPS (ligando agonista de TLR4). Nuestros resultados muestran que efectivamente la exposición de las células IEC4.1 a budesonida, dexametasona y prednisolona a una concentración de 1  $\mu$ M produce un incremento sutil, pero estadísticamente significativo, de la respuesta a LPS. Este efecto parece más evidente en el caso de los dos primeros GC y cuando la concentración de LPS ensayada fue de 100 o 1000 ng/ml, mientras que la hidrocortisona en general no produjo efecto alguno en este sentido. Este efecto por consiguiente parece ser real, y puede estar implicado en la fase temprana de la exposición al GC *in vivo* y por tanto en el experimento DSS3. Sin embargo, el efecto inhibitorio sobre la señalización de los TLR predomina claramente *in vitro*. En la medida en que la inhibición predomine igualmente *in vivo*, cabría esperar consecuencias perjudiciales en términos de restitución epitelial, al ser también una acción dependiente de TLR. Así, los animales TLR2 KO y TLR4 KO presentan una mayor susceptibilidad a la colitis aguda inducida por DSS, al tiempo que están sustancialmente protegidos ante la generación de adenocarcinomas en el modelo de DSS-azoximetano [5, 6, 74, 180, 893-895]. Es más, como se comentó extensamente en la introducción, la delección genética de genes codificantes de proteínas como MyD88 o TAK1, decisivas en la



señalización de los TLR, se traduce en un fenotipo más sensible a la colitis por DSS o incluso en el desarrollo espontáneo de inflamación intestinal.

La dinámica epitelial intestinal depende también en gran medida de la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -Catenina. El papel de estas señales sobre la proliferación y diferenciación de las células epiteliales intestinales tanto en condiciones basales como durante la restitución epitelial reactiva en la colitis aguda inducida por DSS están plenamente caracterizadas, así como el efecto inhibitorio ejercido por DKK1 [485, 896-898]. Esta vía está inhibida por los GC en osteoblastos (ver introducción), lo que colabora en la aparición de la osteoporosis característica de pacientes tratados crónicamente con estos fármacos. Por tanto, evaluamos el efecto directo de los GC sobre la respuesta de células IEC4.1 a RSPO1. Nuestros datos indican sin embargo que los GC no dan lugar a una inhibición sustancial de la activación del receptor LRP6 por RSPO1. Teniendo en cuenta que los resultados *in vivo* correspondientes a los experimentos DSS2 y DSS-PGF mostraban un incremento de la expresión colónica de DKK1 y de su presencia en plasma como consecuencia de la administración de budesonida, decidimos examinar si se producía este efecto en líneas celulares de epitelio intestinal. Efectivamente, la exposición de células IEC4.1 a GC durante cuatro días generó un incremento notable, aunque algo heterogéneo al comparar los diferentes GC entre sí, de la expresión de DKK1 evaluada por PCR a tiempo real. DKK1 se induce también en tejido óseo en los pacientes tratados con GC, al igual que la esclerostina, otro antagonista de receptores tipo LRP, lo que apoya su relevancia funcional *in vivo*. Con objeto de verificar una modulación autocrina/paracrina de este tipo por los GC, realizamos un experimento con medio condicionado obtenido de células IEC4.1 expuestas a GC. Nuestros resultados indican que en estas condiciones se produce una inhibición de la señalización desencadenada por RSPO1 sobre LRP6, lo que sugiere que las células epiteliales liberan DKK1, que a su vez produciría el efecto modulador. Sin embargo, no hemos podido detectar mediante ELISA la presencia de dicha proteína en el medio condicionado. Por tanto, la evidencia disponible señala a un antagonista distinto, aunque no podemos descartar del todo la presencia de DKK1, que podría haber quedado oculta por problemas de sensibilidad analítica o de otro tipo. Nuestros resultados son coherentes con los datos obtenidos *in vivo* de disminución de la expresión colónica de IAP y LGR5 (genes diana de  $\beta$ -Catenina) en el experimento DSS2.

En relación con el efecto de los GC sobre la apoptosis, no disponemos de datos *in vitro*, pero los que hemos obtenido en el modelo de colitis aguda por DSS no son consistentes con un incremento de la apoptosis en la mucosa intestinal de los animales que recibieron budesonida. El efecto resultó ser el opuesto, especialmente cuando se ensayaron dosis mayores de 6  $\mu$ g/ratón/día, tal y como reflejan los resultados a nivel proteico de caspasa-3, caspasa-7 y la ratio Bax/bcl-2 analizados en el tejido colónico completo de los animales incluidos en el experimento DSS1, que reflejan incluso un descenso de la apoptosis intestinal inducido por la administración del GC. Asimismo, los resultados del ensayo TUNEL no mostraron cambios asociados a la inflamación ni al tratamiento con budesonida (datos no mostrados), lo que de hecho es coherente con observaciones de otros autores [899]. Dado que el efecto represor de la señalización por NF- $\kappa$ B ejercido por los GC se asocia normalmente a una mayor tendencia a la apoptosis en el epitelio intestinal, la ausencia de cambios observables en este sentido obedece probablemente a la gran abundancia de señales opuestas dentro del contexto inflamatorio, como TNF $\alpha$ , IL1- $\beta$  y IFN $\gamma$ , y a su inhibición por parte de los GC. Además de sus acciones moduladoras de la apoptosis, estas citoquinas activan la

fosforilación de la proteína MLC, lo que indirectamente tiende a aumentar la permeabilidad paracelular por desorganización de las uniones estrechas [900-904]. Los GC inhiben este efecto mediante la inducción de MKP1, y por supuesto disminuye los niveles de las citoquinas proinflamatorias, por lo que sus efectos a este nivel son protectores [79], lo que probablemente justifica la reducción de la permeabilidad a FITC-dextrano en el estudio en cámara de Ussing de fragmentos de colon distal de los animales incluidos en el experimento DSS2.

Por tanto, nuestros resultados apuntan globalmente a que la administración de budesonida a animales sometidos a colitis aguda inducida por DSS desencadena un proceso séptico a nivel sistémico, lo que se traduce en un empeoramiento de los animales tratados e incluso su muerte. Esta hipótesis resulta paradójica hasta cierto punto, teniendo en cuenta que hace años que se encuentra descrito el papel protector de los GC en los procesos de sepsis, a nivel experimental pero también clínico [905]. En los modelos animales de sepsis se ha puesto de manifiesto un incremento de la producción de corticosterona endógena que parece dar lugar a una cierta desensibilización de la respuesta a GC en neutrófilos y macrófagos [906], fenómeno al que contribuye decisivamente el óxido nítrico [907]. El aumento de GC endógenos que se produce en roedores expuestos a los diferentes modelos de *shock* séptico constituye una respuesta adaptativa evolutivamente conservada frente a los procesos inflamatorios de gran extensión o intensidad y a la disfunción vascular asociada, que evita el fallo multiorgánico secundario a una hipoperfusión periférica (*shock*). Así, los animales que son adrenelectomizados [908], expuestos a un inhibidor del GR como la mifepristona, o que sufren la delección de dicho receptor o de su co-factor *GR interacting protein 1* (GRIP1) en ciertos tipos celulares inmunocompetentes como los macrófagos y las células endoteliales [909-911], resultan significativamente más susceptibles al *shock* séptico inducido experimentalmente. El desarrollo de tolerancia/resistencia a GC puede limitar la eficacia de esta respuesta protectora y, lógicamente, también de los GC exógenos, y es coherente asimismo con los niveles desorbitados de cortisol endógeno que se alcanzan en los pacientes afectados [912]. En todo caso, el beneficio clínico asociado al tratamiento con GC en el *shock* séptico parece estar asociado con la inducción de un estado tolerogénico a LPS y otros componentes bacterianos, pero sobre todo con el mantenimiento a largo plazo de dicho estado. Es decir, el efecto protector de los GC sería más bien de carácter crónico que agudo. De hecho, el uso de los GC en el manejo clínico del *shock* séptico ha evolucionado sensiblemente, de forma que mientras en un principio se usaban dosis elevadas durante un período corto de tiempo con intención de reducir drásticamente la respuesta inflamatoria, sin demasiado éxito en términos de la supervivencia de los pacientes, en la actualidad se prefiere usarlos a dosis relativamente bajas durante un espacio temporal mucho más prolongado (200-300 mg/día de metilprednisolona durante 5 días, por ejemplo). Esta modificación en el patrón de uso ha mejorado notablemente sus resultados en esta condición clínica, de forma que hoy en día está constatado su impacto positivo sobre la producción de citoquinas sistémicas, la modulación de la apoptosis, el incremento de marcadores de extravasación celular, los parámetros hemodinámicos y finalmente la supervivencia de los pacientes [913]. Este principio es coherente con nuestros resultados, dado que el efecto nocivo de la budesonida tiene lugar a corto plazo [914, 915].

Por último, quisiéramos hacer algunas consideraciones con respecto a las posibles implicaciones de nuestros resultados desde el punto de vista traslacional. Los estudios que forman parte de la presente tesis doctoral no son los primeros que documentan los efectos nocivos de los GC en la inflamación intestinal, pero sí los primeros que los han examinado en detalle. Existen

antecedentes sustanciales en este sentido en la colitis experimental, ya expuestos con anterioridad. Además, se ha asociado el uso perinatal de dexametasona en neonatos pre-término con un incremento de la incidencia de perforaciones focales en la barrera intestinal del intestino delgado [709]. Por otra parte, los estudios llevados a cabo por el grupo de la Dra. P. Pérez a nivel epidérmico permiten afirmar que los efectos nocivos de los GC sobre la estabilidad de las barreras epiteliales no es un evento exclusivamente asociado al entorno intestinal [709, 710, 762], aunque al mismo tiempo la contribución de estas moléculas durante el desarrollo parece ser determinante para el adecuada instauración de la función de barrera cutánea. Es importante recordar las limitaciones existentes en el uso de GC en el manejo de la EII. El uso de GC en el manejo clínico de la EII se concentra en los brotes inflamatorios como terapia de primera elección en la inducción de remisión [916-919]. Por contra, la evidencia disponible indica que su administración es esencialmente ineficaz como terapia de mantenimiento del estado de remisión [734-738, 742, 920-922].

Estas limitaciones pueden tener su origen en las acciones potencialmente perjudiciales que hemos puesto de manifiesto en los distintos ensayos. Estas acciones adquieren relevancia cuando coexisten factores que desestabilizan la función de barrera intestinal, como alteraciones en la microbiota, toxicidad epitelial, o la propia reacción inflamatoria. En este sentido, diversos estudios han documentado un incremento notable de la translocación de bacterias viables o de DNA bacteriano hacia capas subyacentes de la pared intestinal, a órganos incluidos en el GALT, a tejidos extraintestinales y, en el caso del DNA bacteriano, hasta el torrente sanguíneo sistémico en muchas de las formas en las que se presenta la EII, siendo especialmente relevante en la EC cuando esta cursa con fistulizaciones ulcerosas [923]. Por otro lado, está demostrado que la presencia de DNA bacteriano en sangre es significativamente más frecuente en pacientes con EC con la variante genética NOD2/CARD5 que en aquellos que no la presentan, lo que resulta lógico por el defecto en la inmunidad innata que presentan [924]. La translocación de bacterias como la *E. coli* LF82 se ha relacionado además con el desarrollo de granulomas en la EC [925]. De hecho, aproximadamente el 50% de los pacientes con EC que cursa con estenosis y obstrucción presenta translocación bacteriana significativa a MLN [926]. Por tanto, parece evidente que la translocación bacteriana no es un hecho anecdótico en la fisiopatología de la EII (principalmente EC), además de en otras condiciones clínicas como traumatismos, quemaduras, estados de inmunosupresión, etc. Por otro lado, como se comentó ampliamente en la sección de introducción, el estudio de casos de agregación de EII en familias concretas ha permitido conocer que la permeabilidad intestinal se ve incrementada antes de la instauración de la inflamación propiamente dicha, por lo que hoy en día este fenómeno es considerado más una causa que una consecuencia de la misma. También existen alteraciones en la fase de remisión de la EII, como un aumento específico de la permeabilidad paracelular [927]. Estas observaciones clínicas se ven apoyadas por experimentos en animales haciendo uso del modelo del TNBS, que revelan que tras la resolución de la inflamación intestinal, la disfunción epitelial persiste, lo que conduce a una translocación bacteriana ligeramente aumentada respecto a lo normal [928].

En consecuencia, la hipótesis de que los efectos nocivos de los GC puedan producirse también en el ámbito clínico parece perfectamente plausible. Las alteraciones subsiguientes en la función de barrera pueden dar lugar a la pérdida del control de la respuesta inflamatoria mediante los mecanismos ya comentados. Sin embargo, se desconoce si la translocación bacteriana puede

conducir a un estado de sepsis. En parte, la escasez de datos obedece a la lógica clínica, en virtud de la cual la resección del segmento afectado tiene lugar antes de que pueda llegar a producirse una sepsis significativa. Sí se ha observado el desarrollo de *shock* séptico en pacientes con EII con obstrucción intestinal grave por estenosis [929].

En suma, los GC tienen efectos tanto beneficiosos como perjudiciales en la inflamación intestinal, cuyo balance parece depender de la concurrencia de factores adicionales que comprometan la función de barrera intestinal. Es posible, por tanto, que estos últimos efectos, ligados a la translocación bacteriana y a la hemorragia intestinal, puedan manifestarse en el ámbito clínico, pero es necesario realizar experimentos adicionales para verificar este extremo.



# CONCLUSIONES



1. La budesonida, y presumiblemente los GC en general, presentan una interesante dualidad de acción sobre la mucosa intestinal inflamada: por un lado una marcada acción antiinflamatoria local, y por el otro una acción perjudicial relacionada con un debilitamiento de la función de barrera que se traduce en efectos negativos a nivel sistémico. Ésta última se traduce en un severo deterioro del estado general de los animales e incluso en su muerte.

2. Nuestros datos sugieren que la acción perjudicial se manifiesta cuando existe una importante lesión en el epitelio intestinal (modelo de colitis aguda por DSS). Sin embargo, este efecto queda en un segundo plano cuando el compromiso de la barrera epitelial es más sutil (colitis por transferencia linfocitaria o animales no colíticos).

3. El debilitamiento de la función de barrera intestinal producida por los GC se traduce en un incremento de la translocación bacteriana que se encuentra asociada a la inhibición de los mecanismos inmunológicos de contención de la carga bacteriana luminal y de los mecanismos de reparación epitelial.

4. Los estudios *in vitro* llevados a cabo en células epiteliales intestinales indican que existen ciertas diferencias entre los cuatro GC ensayados en relación a la modulación que ejercen sobre la invasión epitelial por parte de bacterias enteroinvasivas, la producción de citoquinas en respuesta a PAMP y la curación de herida epitelial, aunque serán necesarios experimentos adicionales para detallar esta respuesta diferencial. De hecho, paralelamente a la ejecución de los experimentos recogidos en esta tesis doctoral, se ha desarrollado un ratón transgénico con delección inducible de la expresión del GR a nivel de células epiteliales intestinales, lo que nos permitirá dilucidar la relevancia relativa de este tipo celular en el efecto de los GC, tanto aquellos producidos localmente en el tejido intestinal o los administrados exógenamente en la colitis por DSS, así como su papel general en la homeostasis intestinal en condiciones basales y en otros modelos de inflamación intestinal.

5. Nuestros resultados tienen posibles implicaciones en el manejo clínico de pacientes con EII haciendo uso de GC de efecto local o sistémico, particularmente si la patología se acompaña de un significativo incremento de la permeabilidad intestinal y/o translocación bacteriana. Asimismo, existen otros desórdenes entre los que destaca el síndrome metabólico que cuentan con alteraciones en la función de barrera intestinal en la base de su fisiopatología, en los que atendiendo a nuestros resultados los GC podrían ejercer cierta influencia teóricamente negativa.





# CONCLUSIONS



1. Budesonide and likely glucocorticoids in general, have an interesting double sword action on the inflamed intestinal mucosa: first a consistent local antiinflammatory action, but also a negative effect related to an induction of a leaky gut state that has a negative impact on the systemic balance, namely a severe worsening of the animal condition and eventually its death.

2. Our data strongly suggest that the deleterious effects of glucocorticoids on the intestinal mucosa, take place exclusively when the intestinal epithelium is severely damaged (acute DSS-induced colitis). Conversely, they don't appear when the glucocorticoids are used in other models of colitis in which the intestinal epithelial barrier is barely compromised, for instance the lymphocyte transfer-induced colitis.

3. The weakening of the intestinal barrier function induced by glucocorticoids implies an enhancement of the bacterial translocation from the gut to other extra-intestinal tissues. Our data point towards an inhibition of the immunological mechanisms in charge of the luminal bacteria containment, but also of the wound healing mechanisms of the intestinal epithelium as the underlying reason for this phenomenon.

4. *In vitro* studies developed on intestinal epithelial cells point to certain differences among the different glucocorticoids in terms of the modulation of the epithelial cell's invasion by enteroinvasive bacteria, cytokine release after stimulation with different PAMP and epithelial wound healing, even though more experiments are needed to clarify this diverging behaviour. Actually, during the last year of experimental work oriented to this thesis we have developed a transgenic mouse with inducible ablation of the glucocorticoid receptor in the intestinal epithelial cells. This tool will help us shedding light on the relative relevance of this cell type in the effects of locally produced and exogenous glucocorticoids on the acute DSS-induced colitis described in this work, but also on its role in the intestinal homeostasis both under steady-state and other inflammatory conditions.

5. Our results could have some implications regarding on the clinical management of IBD patients making use of glucocorticoids with local or systemic distribution, particularly if the disease is featured by a sharp increase of the intestinal permeability and/or the bacterial translocation. Besides, many investigators are pointing to the intestinal barrier dysfunction as a critical factor in the establishment of other diseases like the metabolic syndrome. Thus, our results suggest that the indication of glucocorticoids like budesonide in patients with that medical condition could be controversial.



# REFERENCIAS



1. Wirtz, S. and M.F. Neurath, *Mouse models of inflammatory bowel disease*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2007. **59**(11): p. 1073-83.
2. Wirtz, S., et al., *Chemically induced mouse models of intestinal inflammation*. *Nat Protoc*, 2007. **2**(3): p. 541-6.
3. Rakoff-Nahoum, S., et al., *Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis*. *Cell*, 2004. **118**(2): p. 229-41.
4. Gronbach, K., et al., *Endotoxicity of lipopolysaccharide as a determinant of T-cell-mediated colitis induction in mice*. *Gastroenterology*, 2014. **146**(3): p. 765-75.
5. Hsu, D., et al., *Toll-like receptor 4 differentially regulates epidermal growth factor-related growth factors in response to intestinal mucosal injury*. *Lab Invest*, 2010. **90**(9): p. 1295-305.
6. Fukata, M., et al., *Constitutive activation of epithelial TLR4 augments inflammatory responses to mucosal injury and drives colitis-associated tumorigenesis*. *Inflamm Bowel Dis*, 2011. **17**(7): p. 1464-73.
7. 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.
8. Mucida, D., et al., *Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid*. *Science*, 2007. **317**(5835): p. 256-60.
9. 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.
10. Mucida, D. and H. Cheroutre, *TGFbeta and retinoic acid intersect in immune-regulation*. *Cell Adh Migr*, 2007. **1**(3): p. 142-4.
11. 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.
12. Sonnenberg, G.F., et al., *Innate lymphoid cells promote anatomical containment of lymphoid-resident commensal bacteria*. *Science*, 2012. **336**(6086): p. 1321-5.
13. Kielland, A., et al., *In vivo imaging of reactive oxygen and nitrogen species in inflammation using the luminescent probe L-012*. *Free Radic Biol Med*, 2009. **47**(6): p. 760-6.
14. Asghar, M.N., et al., *In vivo imaging of reactive oxygen and nitrogen species in murine colitis*. *Inflamm Bowel Dis*, 2014. **20**(8): p. 1435-47.
15. Lutz, M.B., et al., *An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow*. *J Immunol Methods*, 1999. **223**(1): p. 77-92.
16. Yao, Y., M.K. Levings, and T.S. Steiner, *ATP conditions intestinal epithelial cells to an inflammatory state that promotes components of DC maturation*. *Eur J Immunol*, 2012. **42**(12): p. 3310-21.
17. Lu, S., et al., *Transport properties are not altered across Caco-2 cells with heightened TEER despite underlying physiological and ultrastructural changes*. *J Pharm Sci*, 1996. **85**(3): p. 270-3.
18. Canny, G., A. Swidsinski, and B.A. McCormick, *Interactions of intestinal epithelial cells with bacteria and immune cells: methods to characterize microflora and functional consequences*. *Methods Mol Biol*, 2006. **341**: p. 17-35.
19. 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.
20. Sanchez de Medina, F., et al., *Induction of alkaline phosphatase in the inflamed intestine: a novel pharmacological target for inflammatory bowel disease*. *Biochem Pharmacol*, 2004. **68**(12): p. 2317-26.
21. Welch, C.L. and D.S. Young, *Spectrophotometry of occult blood in feces*. *Clin Chem*, 1983. **29**(12): p. 2022-5.
22. Bryan, N.S. and M.B. Grisham, *Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples*. *Free Radic Biol Med*, 2007. **43**(5): p. 645-57.



23. 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.
24. Viennois, E., et al., *Dextran sodium sulfate inhibits the activities of both polymerase and reverse transcriptase: lithium chloride purification, a rapid and efficient technique to purify RNA*. *BMC Res Notes*, 2013. **6**: p. 360.
25. Maynard, C.L., et al., *Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system*. *Nature*, 2012. **489**(7415): p. 231-41.
26. Mahida, Y.R., *Microbial-gut interactions in health and disease. Epithelial cell responses*. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2004. **18**(2): p. 241-53.
27. Booth, C. and C.S. Potten, *Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells*. *J Clin Invest*, 2000. **105**(11): p. 1493-9.
28. 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.
29. Watanabe, S., et al., *Conditioned mesenchymal stem cells produce pleiotropic gut trophic factors*. *J Gastroenterol*, 2014. **49**(2): p. 270-82.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. Fuqua, B.K., C.D. Vulpe, and G.J. Anderson, *Intestinal iron absorption*. *J Trace Elem Med Biol*, 2012. **26**(2-3): p. 115-9.
34. Turner, J.R., *Intestinal mucosal barrier function in health and disease*. *Nat Rev Immunol*, 2009. **9**(11): p. 799-809.
35. Mitic, L.L., C.M. Van Itallie, and J.M. Anderson, *Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2000. **279**(2): p. G250-4.
36. Diamond, J.M., *Twenty-first Bowditch lecture. The epithelial junction: bridge, gate, and fence*. *Physiologist*, 1977. **20**(1): p. 10-8.
37. Cunningham, K.E. and J.R. Turner, *Myosin light chain kinase: pulling the strings of epithelial tight junction function*. *Ann N Y Acad Sci*, 2012. **1258**: p. 34-42.
38. Su, L., et al., *Targeted epithelial tight junction dysfunction causes immune activation and contributes to development of experimental colitis*. *Gastroenterology*, 2009. **136**(2): p. 551-63.
39. Tripathi, A., et al., *Identification of human zonulin, a physiological modulator of tight junctions, as prehaptoglobin-2*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(39): p. 16799-804.
40. Gopalakrishnan, S., et al., *Mechanism of action of ZOT-derived peptide AT-1002, a tight junction regulator and absorption enhancer*. *Int J Pharm*, 2009. **365**(1-2): p. 121-30.
41. El Asmar, R., et al., *Host-dependent zonulin secretion causes the impairment of the small intestine barrier function after bacterial exposure*. *Gastroenterology*, 2002. **123**(5): p. 1607-15.
42. Fasano, A. and S. Uzzau, *Modulation of intestinal tight junctions by Zonula occludens toxin permits enteral administration of insulin and other macromolecules in an animal model*. *J Clin Invest*, 1997. **99**(6): p. 1158-64.
43. Fasano, A., *Intestinal zonulin: open sesame!* *Gut*, 2001. **49**(2): p. 159-62.
44. Arrieta, M.C., et al., *Reducing small intestinal permeability attenuates colitis in the IL10 gene-deficient mouse*. *Gut*, 2009. **58**(1): p. 41-8.
45. Sadzadeh, S.M. and J. Bozorgmehr, *Haptoglobin phenotypes in health and disorders*. *Am J Clin Pathol*, 2004. **121 Suppl**: p. S97-104.
46. Arredouani, M.S., et al., *Haptoglobin dampens endotoxin-induced inflammatory effects both in vitro and in vivo*. *Immunology*, 2005. **114**(2): p. 263-71.

47. Galicia, G., et al., *Haptoglobin deficiency facilitates the development of autoimmune inflammation*. Eur J Immunol, 2009. **39**(12): p. 3404-12.
48. Marquez, L., et al., *Effects of haptoglobin polymorphisms and deficiency on susceptibility to inflammatory bowel disease and on severity of murine colitis*. Gut, 2012. **61**(4): p. 528-34.
49. Yang, F., et al., *Characterization of the mouse haptoglobin gene*. Genomics, 1993. **18**(2): p. 374-80.
50. Papp, M., et al., *Haptoglobin polymorphisms are associated with Crohn's disease, disease behavior, and extraintestinal manifestations in Hungarian patients*. Dig Dis Sci, 2007. **52**(5): p. 1279-84.
51. Shifrin, D.A., Jr. and M.J. Tyska, *Ready...aim...fire into the lumen: a new role for enterocyte microvilli in gut host defense*. Gut Microbes, 2012. **3**(5): p. 460-2.
52. Kim, Y.S. and S.B. Ho, *Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress*. Curr Gastroenterol Rep, 2010. **12**(5): p. 319-30.
53. Johansson, M.E. and G.C. Hansson, *Mucus and the goblet cell*. Dig Dis, 2013. **31**(3-4): p. 305-9.
54. Van der Sluis, M., et al., *Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection*. Gastroenterology, 2006. **131**(1): p. 117-29.
55. Corfield, A.P., *Mucins: a biologically relevant glycan barrier in mucosal protection*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1850**(1): p. 236-52.
56. Satoh, Y., et al., *Carbamylcholine- and catecholamine-induced intracellular calcium dynamics of epithelial cells in mouse ileal crypts*. Gastroenterology, 1995. **108**(5): p. 1345-56.
57. Ayabe, T., et al., *Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria*. Nat Immunol, 2000. **1**(2): p. 113-8.
58. Stockinger, S., et al., *Interleukin-13-mediated paneth cell degranulation and antimicrobial peptide release*. J Innate Immun, 2014. **6**(4): p. 530-41.
59. Farin, H.F., et al., *Paneth cell extrusion and release of antimicrobial products is directly controlled by immune cell-derived IFN-gamma*. J Exp Med, 2014. **211**(7): p. 1393-405.
60. Ernst, M., et al., *Epithelial gp130/Stat3 functions: an intestinal signaling node in health and disease*. Semin Immunol, 2014. **26**(1): p. 29-37.
61. Salzman, N.H. and C.L. Bevins, *Dysbiosis--a consequence of Paneth cell dysfunction*. Semin Immunol, 2013. **25**(5): p. 334-41.
62. Ganz, T., *Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(9): p. 710-20.
63. Bevins, C.L. and N.H. Salzman, *Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis*. Nat Rev Microbiol, 2011. **9**(5): p. 356-68.
64. Dickinson, B.L., et al., *Bidirectional FcRn-dependent IgG transport in a polarized human intestinal epithelial cell line*. J Clin Invest, 1999. **104**(7): p. 903-11.
65. Witmer-Pack, M.D., et al., *Tissue distribution of the DEC-205 protein that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145. II. Expression in situ in lymphoid and nonlymphoid tissues*. Cell Immunol, 1995. **163**(1): p. 157-62.
66. Barnich, N. and A. Darfeuille-Michaud, *Abnormal CEACAM6 expression in Crohn disease patients favors gut colonization and inflammation by adherent-invasive E. coli*. Virulence, 2010. **1**(4): p. 281-2.
67. Rescigno, M., *Dendritic cell-epithelial cell crosstalk in the gut*. Immunol Rev, 2014. **260**(1): p. 118-28.
68. Kabashima, K., et al., *The prostaglandin receptor EP4 suppresses colitis, mucosal damage and CD4 cell activation in the gut*. J Clin Invest, 2002. **109**(7): p. 883-93.
69. 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.
70. McDole, J.R., et al., *Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine*. Nature, 2012. **483**(7389): p. 345-9.
71. del Rio, M.L., et al., *Development and functional specialization of CD103+ dendritic cells*. Immunol Rev, 2010. **234**(1): p. 268-81.

72. Dong, L., et al., *Toll-like receptor 2 monoclonal antibody or/and Toll-like receptor 4 monoclonal antibody increase counts of Lactobacilli and Bifidobacteria in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice.* J Gastroenterol Hepatol, 2012. **27**(1): p. 110-9.
73. Albert, E.J., et al., *Tissue eosinophilia in a mouse model of colitis is highly dependent on TLR2 and independent of mast cells.* Am J Pathol, 2011. **178**(1): p. 150-60.
74. 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.
75. Gong, J., et al., *Epithelial-specific blockade of MyD88-dependent pathway causes spontaneous small intestinal inflammation.* Clin Immunol, 2010. **136**(2): p. 245-56.
76. Nenci, A., et al., *Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation.* Nature, 2007. **446**(7135): p. 557-61.
77. Kajino-Sakamoto, R., et al., *Enterocyte-derived TAK1 signaling prevents epithelium apoptosis and the development of ileitis and colitis.* J Immunol, 2008. **181**(2): p. 1143-52.
78. Pull, S.L., et al., *Activated macrophages are an adaptive element of the colonic epithelial progenitor niche necessary for regenerative responses to injury.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(1): p. 99-104.
79. 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.
80. Rosen, M.J., et al., *STAT6 activation in ulcerative colitis: a new target for prevention of IL-13-induced colon epithelial cell dysfunction.* Inflamm Bowel Dis, 2011. **17**(11): p. 2224-34.
81. 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.
82. Zheng, Y., et al., *Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens.* Nat Med, 2008. **14**(3): p. 282-9.
83. Sugimoto, K., et al., *IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis.* J Clin Invest, 2008. **118**(2): p. 534-44.
84. Diegelmann, J., et al., *A novel role for interleukin-27 (IL-27) as mediator of intestinal epithelial barrier protection mediated via differential signal transducer and activator of transcription (STAT) protein signaling and induction of antibacterial and anti-inflammatory proteins.* J Biol Chem, 2012. **287**(1): p. 286-98.
85. Troy, A.E., et al., *IL-27 regulates homeostasis of the intestinal CD4+ effector T cell pool and limits intestinal inflammation in a murine model of colitis.* J Immunol, 2009. **183**(3): p. 2037-44.
86. Grivennikov, S., et al., *IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer.* Cancer Cell, 2009. **15**(2): p. 103-13.
87. Shkoda, A., et al., *Interleukin-10 blocked endoplasmic reticulum stress in intestinal epithelial cells: impact on chronic inflammation.* Gastroenterology, 2007. **132**(1): p. 190-207.
88. Matsumoto, H., et al., *Mucosal gene therapy using a pseudotyped lentivirus vector encoding murine interleukin-10 (mIL-10) suppresses the development and relapse of experimental murine colitis.* BMC Gastroenterol, 2014. **14**: p. 68.
89. Egea, L., et al., *GM-CSF produced by nonhematopoietic cells is required for early epithelial cell proliferation and repair of injured colonic mucosa.* J Immunol, 2013. **190**(4): p. 1702-13.
90. Bersudsky, M., et al., *Non-redundant properties of IL-1alpha and IL-1beta during acute colon inflammation in mice.* Gut, 2014. **63**(4): p. 598-609.
91. Hughes, J.B., et al., *Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity.* Appl Environ Microbiol, 2001. **67**(10): p. 4399-406.
92. Azzali, G., *Structure, lymphatic vascularization and lymphocyte migration in mucosa-associated lymphoid tissue.* Immunol Rev, 2003. **195**: p. 178-89.
93. Knoop, K.A., et al., *RANKL is necessary and sufficient to initiate development of antigen-sampling M cells in the intestinal epithelium.* J Immunol, 2009. **183**(9): p. 5738-47.
94. Kucharzik, T., et al., *Role of M cells in intestinal barrier function.* Ann N Y Acad Sci, 2000. **915**: p. 171-83.

95. Gutzeit, C., G. Magri, and A. Cerutti, *Intestinal IgA production and its role in host-microbe interaction*. Immunol Rev, 2014. **260**(1): p. 76-85.
96. Bockman, D.E., *Functional histology of appendix*. Arch Histol Jpn, 1983. **46**(3): p. 271-92.
97. Crivellato, E., A. Vacca, and D. Ribatti, *Setting the stage: an anatomist's view of the immune system*. Trends Immunol, 2004. **25**(4): p. 210-7.
98. Steinbach, E.C. and S.E. Plevy, *The role of macrophages and dendritic cells in the initiation of inflammation in IBD*. Inflamm Bowel Dis, 2014. **20**(1): p. 166-75.
99. Kerkhoff, C., et al., *Novel insights into the role of S100A8/A9 in skin biology*. Exp Dermatol, 2012. **21**(11): p. 822-6.
100. Hiroshima, Y., et al., *S100A8 induces IL-10 and protects against acute lung injury*. J Immunol, 2014. **192**(6): p. 2800-11.
101. 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.
102. Hofmann, M.A., et al., *RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides*. Cell, 1999. **97**(7): p. 889-901.
103. Loser, K., et al., *The Toll-like receptor 4 ligands Mrp8 and Mrp14 are crucial in the development of autoreactive CD8+ T cells*. Nat Med, 2010. **16**(6): p. 713-7.
104. Ho, S., C. Pothoulakis, and H.W. Koon, *Antimicrobial peptides and colitis*. Curr Pharm Des, 2013. **19**(1): p. 40-7.
105. Bellamy, W., et al., *Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin*. J Appl Bacteriol, 1992. **73**(6): p. 472-9.
106. Singer, II, et al., *Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease*. Gastroenterology, 1996. **111**(4): p. 871-85.
107. Kemmerly, T. and J.D. Kaunitz, *Gastroduodenal mucosal defense*. Curr Opin Gastroenterol, 2013. **29**(6): p. 642-9.
108. Vetrano, S., et al., *Unexpected role of anticoagulant protein C in controlling epithelial barrier integrity and intestinal inflammation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(49): p. 19830-5.
109. Abdullah, M., et al., *New insights on the pathomechanisms of inflammatory bowel disease*. J Dig Dis, 2013. **14**(9): p. 455-62.
110. Maheshwari, A., et al., *TGF-beta2 suppresses macrophage cytokine production and mucosal inflammatory responses in the developing intestine*. Gastroenterology, 2011. **140**(1): p. 242-53.
111. Kobayashi, T., et al., *IL-10 regulates Il12b expression via histone deacetylation: implications for intestinal macrophage homeostasis*. J Immunol, 2012. **189**(4): p. 1792-9.
112. Mosser, D.M. and J.P. Edwards, *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(12): p. 958-69.
113. Bettelli, E., et al., *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 235-8.
114. Edwards, J.P., et al., *Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations*. J Leukoc Biol, 2006. **80**(6): p. 1298-307.
115. Muller, U., et al., *IL-13 induces disease-promoting type 2 cytokines, alternatively activated macrophages and allergic inflammation during pulmonary infection of mice with Cryptococcus neoformans*. J Immunol, 2007. **179**(8): p. 5367-77.
116. Tumitan, A.R., et al., *Pattern of macrophage activation in yersinia-resistant and yersinia-susceptible strains of mice*. Microbiol Immunol, 2007. **51**(10): p. 1021-8.
117. Cosin-Roger, J., et al., *M2 macrophages activate WNT signaling pathway in epithelial cells: relevance in ulcerative colitis*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e78128.
118. Wendelsdorf, K., et al., *Model of colonic inflammation: immune modulatory mechanisms in inflammatory bowel disease*. J Theor Biol, 2010. **264**(4): p. 1225-39.
119. Denning, T.L., et al., *Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses*. Nat Immunol, 2007. **8**(10): p. 1086-94.

120. Benoit, M., et al., *Coxiella burnetii*, the agent of Q fever, stimulates an atypical M2 activation program in human macrophages. *Eur J Immunol*, 2008. **38**(4): p. 1065-70.
121. Baetselier, P.D., et al., *Alternative versus classical macrophage activation during experimental African trypanosomosis*. *Int J Parasitol*, 2001. **31**(5-6): p. 575-87.
122. Biswas, S.K., et al., *A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation)*. *Blood*, 2006. **107**(5): p. 2112-22.
123. Niess, J.H., et al., *CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance*. *Science*, 2005. **307**(5707): p. 254-8.
124. Medina-Contreras, O., et al., *CX3CR1 regulates intestinal macrophage homeostasis, bacterial translocation, and colitogenic Th17 responses in mice*. *J Clin Invest*, 2011. **121**(12): p. 4787-95.
125. Uematsu, S., et al., *Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5*. *Nat Immunol*, 2008. **9**(7): p. 769-76.
126. Mantis, N.J., N. Rol, and B. Corthesy, *Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut*. *Mucosal Immunol*, 2011. **4**(6): p. 603-11.
127. Iliev, I.D., et al., *Intestinal epithelial cells promote colitis-protective regulatory T-cell differentiation through dendritic cell conditioning*. *Mucosal Immunol*, 2009. **2**(4): p. 340-50.
128. Liu, Y.J., et al., *TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation*. *Annu Rev Immunol*, 2007. **25**: p. 193-219.
129. Manoharan, I., et al., *TLR2-dependent activation of beta-catenin pathway in dendritic cells induces regulatory responses and attenuates autoimmune inflammation*. *J Immunol*, 2014. **193**(8): p. 4203-13.
130. Manicassamy, S., et al., *Activation of beta-catenin in dendritic cells regulates immunity versus tolerance in the intestine*. *Science*, 2010. **329**(5993): p. 849-53.
131. Strauch, U.G., et al., *Loss of CD103+ intestinal dendritic cells during colonic inflammation*. *World J Gastroenterol*, 2010. **16**(1): p. 21-9.
132. Cortez, V.S., M.L. Robinette, and M. Colonna, *Innate lymphoid cells: new insights into function and development*. *Curr Opin Immunol*, 2015. **32C**: p. 71-77.
133. McKenzie, A.N., H. Spits, and G. Eberl, *Innate lymphoid cells in inflammation and immunity*. *Immunity*, 2014. **41**(3): p. 366-74.
134. Tait Wojno, E.D. and D. Artis, *Innate lymphoid cells: balancing immunity, inflammation, and tissue repair in the intestine*. *Cell Host Microbe*, 2012. **12**(4): p. 445-57.
135. Diefenbach, A., M. Colonna, and S. Koyasu, *Development, differentiation, and diversity of innate lymphoid cells*. *Immunity*, 2014. **41**(3): p. 354-65.
136. Drake, L.Y., K. Iijima, and H. Kita, *Group 2 innate lymphoid cells and CD4+ T cells cooperate to mediate type 2 immune response in mice*. *Allergy*, 2014. **69**(10): p. 1300-7.
137. Annunziato, F., et al., *Phenotypic and functional features of human Th17 cells*. *J Exp Med*, 2007. **204**(8): p. 1849-61.
138. Cosmi, L., et al., *Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor*. *J Exp Med*, 2008. **205**(8): p. 1903-16.
139. Califano, D., et al., *Diverting T helper cell trafficking through increased plasticity attenuates autoimmune encephalomyelitis*. *J Clin Invest*, 2014. **124**(1): p. 174-87.
140. Carbo, A., et al., *Systems modeling of molecular mechanisms controlling cytokine-driven CD4+ T cell differentiation and phenotype plasticity*. *PLoS Comput Biol*, 2013. **9**(4): p. e1003027.
141. Hovhannisyan, Z., et al., *Characterization of interleukin-17-producing regulatory T cells in inflamed intestinal mucosa from patients with inflammatory bowel diseases*. *Gastroenterology*, 2011. **140**(3): p. 957-65.
142. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Toll-like receptor control of the adaptive immune responses*. *Nat Immunol*, 2004. **5**(10): p. 987-95.

143. Brandtzaeg, P., I.N. Farstad, and G. Haraldsen, *Regional specialization in the mucosal immune system: primed cells do not always home along the same track*. Immunol Today, 1999. **20**(6): p. 267-77.
144. Brandtzaeg, P., et al., *Regional specialization in the mucosal immune system: what happens in the microcompartments?* Immunol Today, 1999. **20**(3): p. 141-51.
145. Targan, S.R., et al., *Definition of a lamina propria T cell responsive state. Enhanced cytokine responsiveness of T cells stimulated through the CD2 pathway*. J Immunol, 1995. **154**(2): p. 664-75.
146. 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.
147. 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.
148. 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.
149. Chen, Y., et al., *Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial gamma delta T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(22): p. 14338-43.
150. Tsuchiya, T., et al., *Role of gamma delta T cells in the inflammatory response of experimental colitis mice*. J Immunol, 2003. **171**(10): p. 5507-13.
151. Raffatellu, M., et al., *Simian immunodeficiency virus-induced mucosal interleukin-17 deficiency promotes Salmonella dissemination from the gut*. Nat Med, 2008. **14**(4): p. 421-8.
152. Casola, S. and K. Rajewsky, *B cell recruitment and selection in mouse GALT germinal centers*. Curr Top Microbiol Immunol, 2006. **308**: p. 155-71.
153. Fagarasan, S., et al., *In situ class switching and differentiation to IgA-producing cells in the gut lamina propria*. Nature, 2001. **413**(6856): p. 639-43.
154. Hirota, K., et al., *Plasticity of Th17 cells in Peyer's patches is responsible for the induction of T cell-dependent IgA responses*. Nat Immunol, 2013. **14**(4): p. 372-9.
155. Tsuji, M., et al., *Preferential generation of follicular B helper T cells from Foxp3+ T cells in gut Peyer's patches*. Science, 2009. **323**(5920): p. 1488-92.
156. Eckburg, P.B., et al., *Diversity of the human intestinal microbial flora*. Science, 2005. **308**(5728): p. 1635-8.
157. Sakata, S., et al., *Culture-independent analysis of fecal microbiota in infants, with special reference to Bifidobacterium species*. FEMS Microbiol Lett, 2005. **243**(2): p. 417-23.
158. Scanlan, P.D., et al., *Culture-independent analysis of the gut microbiota in colorectal cancer and polyposis*. Environ Microbiol, 2008. **10**(3): p. 789-98.
159. Barthel, M., et al., *Pretreatment of mice with streptomycin provides a Salmonella enterica serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host*. Infect Immun, 2003. **71**(5): p. 2839-58.
160. Hooper, L.V., et al., *Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine*. Science, 2001. **291**(5505): p. 881-4.
161. Gosalbes, M.J., et al., *Meconium microbiota types dominated by lactic acid or enteric bacteria are differentially associated with maternal eczema and respiratory problems in infants*. Clin Exp Allergy, 2013. **43**(2): p. 198-211.
162. Moles, L., et al., *Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the first month of life*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e66986.
163. Jimenez, E., et al., *Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section*. Curr Microbiol, 2005. **51**(4): p. 270-4.
164. Perez, P.F., et al., *Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells?* Pediatrics, 2007. **119**(3): p. e724-32.

165. Stappenbeck, T.S., L.V. Hooper, and J.I. Gordon, *Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(24): p. 15451-5.
166. Blaut, M. and S. Klaus, *Intestinal microbiota and obesity*. Handb Exp Pharmacol, 2012(209): p. 251-73.
167. Biedermann, L. and G. Rogler, *The intestinal microbiota: its role in health and disease*. Eur J Pediatr, 2015. **174**(2): p. 151-67.
168. Collins, S.M., Z. Kassam, and P. Bercik, *The adoptive transfer of behavioral phenotype via the intestinal microbiota: experimental evidence and clinical implications*. Curr Opin Microbiol, 2013. **16**(3): p. 240-5.
169. Leung, A., H. Tsoi, and J. Yu, *Fusobacterium and Escherichia: models of colorectal cancer driven by microbiota and the utility of microbiota in colorectal cancer screening*. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2015: p. 1-7.
170. Schulz, M.D., et al., *High-fat-diet-mediated dysbiosis promotes intestinal carcinogenesis independently of obesity*. Nature, 2014. **514**(7523): p. 508-12.
171. Kubinak, J.L., et al., *MyD88 Signaling in T Cells Directs IgA-Mediated Control of the Microbiota to Promote Health*. Cell Host Microbe, 2015. **17**(2): p. 153-63.
172. Wells, J.M., et al., *Epithelial crosstalk at the microbiota-mucosal interface*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108 Suppl 1**: p. 4607-14.
173. Kawai, T. and S. Akira, *TLR signaling*. Semin Immunol, 2007. **19**(1): p. 24-32.
174. Lu, Y.C., W.C. Yeh, and P.S. Ohashi, *LPS/TLR4 signal transduction pathway*. Cytokine, 2008. **42**(2): p. 145-51.
175. Sanchez de Medina, F., et al., *Host-microbe interactions: the difficult yet peaceful coexistence of the microbiota and the intestinal mucosa*. Br J Nutr, 2013. **109 Suppl 2**: p. S12-20.
176. 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.
177. Ivison, S.M., et al., *TLR5 is not required for flagellin-mediated exacerbation of DSS colitis*. Inflamm Bowel Dis, 2010. **16**(3): p. 401-9.
178. 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.
179. 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.
180. 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.
181. Sanchez de Medina, F., et al., *Intestinal inflammation and mucosal barrier function*. Inflamm Bowel Dis, 2014. **20**(12): p. 2394-404.
182. Brun, P., et al., *Toll-like receptor 2 regulates intestinal inflammation by controlling integrity of the enteric nervous system*. Gastroenterology, 2013. **145**(6): p. 1323-33.
183. Yang, Y.X., X. Chen, and H.T. Gan, *Toll-like receptor 2 regulates intestinal inflammation by controlling integrity of the enteric nervous system: why were TLR3's roles not tested?* Gastroenterology, 2014. **146**(5): p. 1428.
184. Chamaillard, M., et al., *Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation*. Cell Microbiol, 2003. **5**(9): p. 581-92.
185. Hasegawa, M., et al., *Differential release and distribution of Nod1 and Nod2 immunostimulatory molecules among bacterial species and environments*. J Biol Chem, 2006. **281**(39): p. 29054-63.
186. Takeuchi, O. and S. Akira, *Innate immunity to virus infection*. Immunol Rev, 2009. **227**(1): p. 75-86.
187. Fukata, M. and M. Arditi, *The role of pattern recognition receptors in intestinal inflammation*. Mucosal Immunol, 2013. **6**(3): p. 451-63.

188. Kato, H., et al., *Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses*. Nature, 2006. **441**(7089): p. 101-5.
189. Kowalinski, E., et al., *Structural basis for the activation of innate immune pattern-recognition receptor RIG-I by viral RNA*. Cell, 2011. **147**(2): p. 423-35.
190. Zeng, W., et al., *Reconstitution of the RIG-I pathway reveals a signaling role of unanchored polyubiquitin chains in innate immunity*. Cell, 2010. **141**(2): p. 315-30.
191. Hou, F., et al., *MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response*. Cell, 2011. **146**(3): p. 448-61.
192. Yoneyama, M., et al., *The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses*. Nat Immunol, 2004. **5**(7): p. 730-7.
193. Yu, C.Y., et al., *The interferon stimulator mitochondrial antiviral signaling protein facilitates cell death by disrupting the mitochondrial membrane potential and by activating caspases*. J Virol, 2010. **84**(5): p. 2421-31.
194. Li, X.D., et al., *Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(49): p. 17717-22.
195. Arimoto, K., et al., *Negative regulation of the RIG-I signaling by the ubiquitin ligase RNF125*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(18): p. 7500-5.
196. Franchi, L., R. Munoz-Planillo, and G. Nunez, *Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes*. Nat Immunol, 2012. **13**(4): p. 325-32.
197. Fernandes-Alnemri, T., et al., *Cutting edge: TLR signaling licenses IRAK1 for rapid activation of the NLRP3 inflammasome*. J Immunol, 2013. **191**(8): p. 3995-9.
198. Lin, K.M., et al., *IRAK-1 bypasses priming and directly links TLRs to rapid NLRP3 inflammasome activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(2): p. 775-80.
199. Bauernfeind, F.G., et al., *Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression*. J Immunol, 2009. **183**(2): p. 787-91.
200. Franchi, L., T. Eigenbrod, and G. Nunez, *Cutting edge: TNF-alpha mediates sensitization to ATP and silica via the NLRP3 inflammasome in the absence of microbial stimulation*. J Immunol, 2009. **183**(2): p. 792-6.
201. Schroder, K., et al., *Acute lipopolysaccharide priming boosts inflammasome activation independently of inflammasome sensor induction*. Immunobiology, 2012. **217**(12): p. 1325-9.
202. Haneklaus, M., et al., *Cutting edge: miR-223 and EBV miR-BART15 regulate the NLRP3 inflammasome and IL-1beta production*. J Immunol, 2012. **189**(8): p. 3795-9.
203. Sutterwala, F.S., S. Haasken, and S.L. Cassel, *Mechanism of NLRP3 inflammasome activation*. Ann N Y Acad Sci, 2014. **1319**: p. 82-95.
204. Sancho, D. and C. Reis e Sousa, *Signaling by myeloid C-type lectin receptors in immunity and homeostasis*. Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 491-529.
205. Osorio, F. and C. Reis e Sousa, *Myeloid C-type lectin receptors in pathogen recognition and host defense*. Immunity, 2011. **34**(5): p. 651-64.
206. Hutter, J., et al., *Role of the C-type lectin receptors MCL and DCIR in experimental colitis*. PLoS One, 2014. **9**(7): p. e103281.
207. Colgan, S.P., B. Fennimore, and S.F. Ehrentraut, *Adenosine and gastrointestinal inflammation*. J Mol Med (Berl), 2013. **91**(2): p. 157-64.
208. Estrela, A.B. and W.R. Abraham, *Adenosine in the inflamed gut: a Janus faced compound*. Curr Med Chem, 2011. **18**(18): p. 2791-815.
209. Burnstock, G., *Purinergic signalling in the gastrointestinal tract and related organs in health and disease*. Purinergic Signal, 2014. **10**(1): p. 3-50.
210. Beyazit, Y., et al., *Serum adenosine deaminase activity as a predictor of disease severity in ulcerative colitis*. J Crohns Colitis, 2012. **6**(1): p. 102-7.



211. Burnstock, G. and H. Ulrich, *Purinergic signaling in embryonic and stem cell development*. Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(8): p. 1369-94.
212. Desplaces, A., D. Zagury, and E. Sacquet, [*Study of the thyroid function of the germ-free rat*]. C R Hebd Seances Acad Sci, 1963. **257**: p. 756-8.
213. Wostmann, B.S. and N.L. Wiech, *Total serum and liver cholesterol in germfree and conventional male rats*. Am J Physiol, 1961. **201**: p. 1027-9.
214. Danielsson, H. and B. Gustafsson, *On serum-cholesterol levels and neutral fecal sterols in germ-free rats; bile acids and steroids 59*. Arch Biochem Biophys, 1959. **83**: p. 482-5.
215. Ley, R.E., et al., *Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity*. Nature, 2006. **444**(7122): p. 1022-3.
216. Dulloo, A.G. and J.P. Montani, *Pathways from dieting to weight regain, to obesity and to the metabolic syndrome: an overview*. Obes Rev, 2015. **16 Suppl 1**: p. 1-6.
217. Ridaura, V.K., et al., *Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice*. Science, 2013. **341**(6150): p. 1241214.
218. Backhed, F., et al., *Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(3): p. 979-84.
219. Gordon, H.A., E. Bruckner-Kardoss, and B.S. Wostmann, *Aging in germ-free mice: life tables and lesions observed at natural death*. J Gerontol, 1966. **21**(3): p. 380-7.
220. Crumeyrolle-Arias, M., et al., *Absence of the gut microbiota enhances anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rats*. Psychoneuroendocrinology, 2014. **42**: p. 207-17.
221. Diaz Heijtz, R., et al., *Normal gut microbiota modulates brain development and behavior*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(7): p. 3047-52.
222. Clarke, G., et al., *The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner*. Mol Psychiatry, 2013. **18**(6): p. 666-73.
223. Loesche, W.J., *Protein and carbohydrate composition of cecal contents of gnotobiotic rats and mice*. Proc Soc Exp Biol Med, 1968. **128**(1): p. 195-9.
224. Donowitz, M. and H.J. Binder, *Mechanism of fluid and electrolyte secretion in the germ-free rat cecum*. Dig Dis Sci, 1979. **24**(7): p. 551-9.
225. Round, J.L. and S.K. Mazmanian, *The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(5): p. 313-23.
226. 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.
227. Sawa, S., et al., *RORgammat+ innate lymphoid cells regulate intestinal homeostasis by integrating negative signals from the symbiotic microbiota*. Nat Immunol, 2011. **12**(4): p. 320-6.
228. Imaoka, A., et al., *Proliferative recruitment of intestinal intraepithelial lymphocytes after microbial colonization of germ-free mice*. Eur J Immunol, 1996. **26**(4): p. 945-8.
229. Kawaguchi-Miyashita, M., et al., *Development and cytolytic function of intestinal intraepithelial T lymphocytes in antigen-minimized mice*. Immunology, 1996. **89**(2): p. 268-73.
230. Ivanov, II, et al., *Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine*. Cell Host Microbe, 2008. **4**(4): p. 337-49.
231. Tanoue, T. and K. Honda, *Induction of Treg cells in the mouse colonic mucosa: a central mechanism to maintain host-microbiota homeostasis*. Semin Immunol, 2012. **24**(1): p. 50-7.
232. Atarashi, K., et al., *Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species*. Science, 2011. **331**(6015): p. 337-41.
233. Chiu, C.C., et al., *Monocolonization of germ-free mice with Bacteroides fragilis protects against dextran sulfate sodium-induced acute colitis*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 675786.
234. Kitajima, S., et al., *Dextran sodium sulfate-induced colitis in germ-free IQI/Jic mice*. Exp Anim, 2001. **50**(5): p. 387-95.
235. Berg, D.J., et al., *Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses*. J Clin Invest, 1996. **98**(4): p. 1010-20.

236. Madsen, K.L., et al., *Antibiotic therapy attenuates colitis in interleukin 10 gene-deficient mice*. *Gastroenterology*, 2000. **118**(6): p. 1094-105.
237. Kang, S.S., et al., *An antibiotic-responsive mouse model of fulminant ulcerative colitis*. *PLoS Med*, 2008. **5**(3): p. e41.
238. Garrett, W.S., et al., *Communicable ulcerative colitis induced by T-bet deficiency in the innate immune system*. *Cell*, 2007. **131**(1): p. 33-45.
239. Ivanov, II, et al., *Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria*. *Cell*, 2009. **139**(3): p. 485-98.
240. Baumgart, D.C. and S.R. Carding, *Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology*. *Lancet*, 2007. **369**(9573): p. 1627-40.
241. 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.
242. 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.
243. Gyde, S.N., et al., *Malignancy in Crohn's disease*. *Gut*, 1980. **21**(12): p. 1024-9.
244. Ekbo, A., et al., *Increased risk of large-bowel cancer in Crohn's disease with colonic involvement*. *Lancet*, 1990. **336**(8711): p. 357-9.
245. Cheung, O. and M.D. Regueiro, *Inflammatory bowel disease emergencies*. *Gastroenterol Clin North Am*, 2003. **32**(4): p. 1269-88.
246. 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.
247. 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.
248. Lott, M.F. and J.D. Davies, *Lymph node hypervascularity: haemangioma-like lesions and pan-nodal vasodilatation*. *J Pathol*, 1983. **140**(3): p. 209-19.
249. Mortensen, N., *Fulminant acute and diffuse chronic ulcerative colitis--the argument for surgery*. *Acta Gastroenterol Belg*, 2000. **63**(3): p. 289.
250. Wong, C.K. and B.R. Yacyshyn, *Fulminant Ulcerative Colitis*. *Curr Treat Options Gastroenterol*, 2000. **3**(3): p. 217-226.
251. 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.
252. Rose, J.D., et al., *Cardiff Crohn's disease jubilee: the incidence over 50 years*. *Gut*, 1988. **29**(3): p. 346-51.
253. 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.
254. Bonnevie, O., *A socio-economic study of patients with ulcerative colitis*. *Scand J Gastroenterol*, 1967. **2**(2): p. 129-36.
255. Gent, A.E., et al., *Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy*. *Lancet*, 1994. **343**(8900): p. 766-7.
256. 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.
257. 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.
258. Sonnenberg, A., *Date of birth in the occurrence of inflammatory bowel disease*. *Inflamm Bowel Dis*, 2009. **15**(2): p. 206-11.
259. 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.

260. Askling, J., et al., *Incidence of paediatric Crohn's disease in Stockholm, Sweden*. *Lancet*, 1999. **354**(9185): p. 1179.
261. Lindberg, E., et al., *Inflammatory bowel disease in children and adolescents in Sweden, 1984-1995*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2000. **30**(3): p. 259-64.
262. Hildebrand, H., et al., *Chronic inflammatory bowel disease in children and adolescents in Sweden*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1991. **13**(3): p. 293-7.
263. White, J.M., et al., *Inflammatory bowel disease in African American children compared with other racial/ethnic groups in a multicenter registry*. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2008. **6**(12): p. 1361-9.
264. Castro, M., et al., *Inflammatory bowel disease in children and adolescents in Italy: data from the pediatric national IBD register (1996-2003)*. *Inflamm Bowel Dis*, 2008. **14**(9): p. 1246-52.
265. Ekbohm, A., et al., *The epidemiology of inflammatory bowel disease: a large, population-based study in Sweden*. *Gastroenterology*, 1991. **100**(2): p. 350-8.
266. Karlinger, K., et al., *The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease*. *Eur J Radiol*, 2000. **35**(3): p. 154-67.
267. Calkins, B.M., et al., *Trends in incidence rates of ulcerative colitis and Crohn's disease*. *Dig Dis Sci*, 1984. **29**(10): p. 913-20.
268. Segal, I., et al., *The rarity of ulcerative colitis in South African blacks*. *Am J Gastroenterol*, 1980. **74**(4): p. 332-6.
269. Stallwood, C., et al., *Manifestations of inflammatory bowel disease in patients of Haitian and Cape Verdean descent*. *Scand J Gastroenterol*, 2015: p. 1-9.
270. Roth, M.P., et al., *Geographic origins of Jewish patients with inflammatory bowel disease*. *Gastroenterology*, 1989. **97**(4): p. 900-4.
271. 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.
272. 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.
273. El-Tawil, A.M., *Jews and inflammatory bowel disease*. *J Gastrointestin Liver Dis*, 2009. **18**(2): p. 137-8.
274. 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.
275. 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.
276. 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.
277. 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.
278. 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.
279. Burke, D.A. and A.T. Axon, *Adhesive Escherichia coli in inflammatory bowel disease and infective diarrhoea*. *BMJ*, 1988. **297**(6641): p. 102-4.
280. 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.
281. Chassaing, B., et al., *Crohn disease--associated adherent-invasive E. coli bacteria target mouse and human Peyer's patches via long polar fimbriae*. *J Clin Invest*, 2011. **121**(3): p. 966-75.
282. 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.

283. 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.
284. 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.
285. Fukuda, Y., et al., *Helicobacter pylori infection increases mucosal permeability of the stomach and intestine*. *Digestion*, 2001. **63 Suppl 1**: p. 93-6.
286. Kirsner, J.B. and J.A. Spencer, *Family Occurrences of Ulcerative Colitis, Regional Enteritis, and Ileocolitis*. *Ann Intern Med*, 1963. **59**: p. 133-44.
287. Saro Gismera, C., et al., *[Epidemiology of chronic inflammatory bowel disease in Gijon, Asturias]*. *Gastroenterol Hepatol*, 2001. **24**(5): p. 228-35.
288. Satsangi, J., et al., *Genetics of inflammatory bowel disease*. *Gut*, 1994. **35**(5): p. 696-700.
289. Probert, C.S., et al., *Prevalence and family risk of ulcerative colitis and Crohn's disease: an epidemiological study among Europeans and south Asians in Leicestershire*. *Gut*, 1993. **34**(11): p. 1547-51.
290. Park, J.B., et al., *Familial occurrence of inflammatory bowel disease in Korea*. *Inflamm Bowel Dis*, 2006. **12**(12): p. 1146-51.
291. Orholm, M., et al., *Familial occurrence of inflammatory bowel disease*. *N Engl J Med*, 1991. **324**(2): p. 84-8.
292. 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.
293. McConnell, R.B., *Ulcerative colitis--genetic features*. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 1983. **88**: p. 14-6.
294. 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.
295. 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.
296. 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.
297. 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.
298. 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.
299. 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.
300. 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.
301. 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.
302. 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.
303. 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.
304. 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.
305. Blanco-Kelly, F., et al., *CD40: novel association with Crohn's disease and replication in multiple sclerosis susceptibility*. *PLoS One*, 2010. **5**(7): p. e11520.

306. Jostins, L., et al., *Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease*. *Nature*, 2012. **491**(7422): p. 119-24.
307. 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.
308. 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.
309. 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.
310. Van Limbergen, J., G. Radford-Smith, and J. Satsangi, *Advances in IBD genetics*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2014. **11**(6): p. 372-85.
311. 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.
312. Human Microbiome Jumpstart Reference Strains, C., et al., *A catalog of reference genomes from the human microbiome*. *Science*, 2010. **328**(5981): p. 994-9.
313. 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.
314. 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.
315. De Cruz, P., et al., *Characterization of the gastrointestinal microbiota in health and inflammatory bowel disease*. *Inflamm Bowel Dis*, 2012. **18**(2): p. 372-90.
316. Wills, E.S., et al., *Fecal microbial composition of ulcerative colitis and Crohn's disease patients in remission and subsequent exacerbation*. *PLoS One*, 2014. **9**(3): p. e90981.
317. Swidsinski, A., et al., *Mucosal flora in inflammatory bowel disease*. *Gastroenterology*, 2002. **122**(1): p. 44-54.
318. 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.
319. 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.
320. 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.
321. Lindsay, J.O., et al., *Clinical, microbiological, and immunological effects of fructo-oligosaccharide in patients with Crohn's disease*. *Gut*, 2006. **55**(3): p. 348-55.
322. Kruis, W., et al., *Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic Escherichia coli Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine*. *Gut*, 2004. **53**(11): p. 1617-23.
323. Grehan, M.J., et al., *Durable alteration of the colonic microbiota by the administration of donor fecal flora*. *J Clin Gastroenterol*, 2010. **44**(8): p. 551-61.
324. Anderson, J.L., R.J. Edney, and K. Whelan, *Systematic review: faecal microbiota transplantation in the management of inflammatory bowel disease*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2012. **36**(6): p. 503-16.
325. Sha, S., et al., *Systematic review: faecal microbiota transplantation therapy for digestive and nondigestive disorders in adults and children*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2014. **39**(10): p. 1003-32.
326. Goyal, R.K. and I. Hirano, *The enteric nervous system*. *N Engl J Med*, 1996. **334**(17): p. 1106-15.
327. Engel, G.L., *Psychological factors in ulcerative colitis in man and gibbon*. *Gastroenterology*, 1969. **57**(3): p. 362-5.
328. Alexander, T., *An objective study of psychological factors in ulcerative colitis in children*. *Appl Ther*, 1965. **7**(10): p. 837-9.
329. Robertson, D.A., et al., *Personality profile and affective state of patients with inflammatory bowel disease*. *Gut*, 1989. **30**(5): p. 623-6.

330. 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.
331. Enck, P., et al., *Stress effects on gastrointestinal transit in the rat*. Gut, 1989. **30**(4): p. 455-9.
332. 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.
333. 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.
334. Wlk, M., et al., *Corticotropin-releasing hormone antagonists possess anti-inflammatory effects in the mouse ileum*. Gastroenterology, 2002. **123**(2): p. 505-15.
335. 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.
336. 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.
337. 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.
338. 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.
339. 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.
340. 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.
341. Persson, P.G., A. Ahlbom, and G. Hellers, *Diet and inflammatory bowel disease: a case-control study*. Epidemiology, 1992. **3**(1): p. 47-52.
342. 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.
343. 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.
344. 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.
345. 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.
346. 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.
347. 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.
348. Kim, Y.I., *Short-chain fatty acids in ulcerative colitis*. Nutr Rev, 1998. **56**(1 Pt 1): p. 17-24.
349. 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.
350. 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.
351. 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.

352. Hennet, T., A. Weiss, and L. Borsig, *Decoding breast milk oligosaccharides*. *Swiss Med Wkly*, 2014. **144**: p. w13927.
353. Penttila, I.A., *Milk-derived transforming growth factor-beta and the infant immune response*. *J Pediatr*, 2010. **156**(2 Suppl): p. S21-5.
354. Vidal, K. and A. Donnet-Hughes, *CD14: a soluble pattern recognition receptor in milk*. *Adv Exp Med Biol*, 2008. **606**: p. 195-216.
355. Cleary, T.G., *Human milk protective mechanisms*. *Adv Exp Med Biol*, 2004. **554**: p. 145-54.
356. 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.
357. Tanabe, S., *Short peptide modules for enhancing intestinal barrier function*. *Curr Pharm Des*, 2012. **18**(6): p. 776-81.
358. 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.
359. Binder, J.H., et al., *Intolerance to milk in ulcerative colitis. A preliminary report*. *Am J Dig Dis*, 1966. **11**(11): p. 858-64.
360. 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.
361. 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.
362. Rampton, D.S., *Smoking and ulcerative colitis*. *Lancet*, 1984. **1**(8369): p. 168.
363. Srivasta, E.D., et al., *Smoking and ulcerative colitis: a community study*. *Int J Colorectal Dis*, 1993. **8**(2): p. 71-4.
364. Franceschi, S., et al., *Nonspecific inflammatory bowel disease and smoking*. *Am J Epidemiol*, 1987. **125**(3): p. 445-52.
365. 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.
366. Benoni, C. and A. Nilsson, *Smoking habits in patients with inflammatory bowel disease*. *Scand J Gastroenterol*, 1984. **19**(6): p. 824-30.
367. Cottone, M., et al., *Smoking habits and recurrence in Crohn's disease*. *Gastroenterology*, 1994. **106**(3): p. 643-8.
368. 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.
369. Motley, R.J., et al., *Smoking, eicosanoids and ulcerative colitis*. *J Pharm Pharmacol*, 1990. **42**(4): p. 288-9.
370. 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.
371. Rutgeerts, P., et al., *Appendectomy protects against ulcerative colitis*. *Gastroenterology*, 1994. **106**(5): p. 1251-3.
372. 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.
373. Duggan, A.E., et al., *Appendectomy, childhood hygiene, Helicobacter pylori status, and risk of inflammatory bowel disease: a case control study*. *Gut*, 1998. **43**(4): p. 494-8.
374. Ekbohm, A., *Appendectomy and childhood hygiene: different sides of the same coin?* *Gut*, 1998. **43**(4): p. 451.
375. Radford-Smith, G.L., et al., *Protective role of appendectomy on onset and severity of ulcerative colitis and Crohn's disease*. *Gut*, 2002. **51**(6): p. 808-13.
376. Cosnes, J., et al., *Effects of appendectomy on the course of ulcerative colitis*. *Gut*, 2002. **51**(6): p. 803-7.
377. 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.

378. Shen, L., L. Su, and J.R. Turner, *Mechanisms and functional implications of intestinal barrier defects*. *Dig Dis*, 2009. **27**(4): p. 443-9.
379. 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.
380. 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.
381. Franchimont, D., et al., *Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis*. *Gut*, 2004. **53**(7): p. 987-92.
382. Goyette, P., et al., *Molecular pathogenesis of inflammatory bowel disease: genotypes, phenotypes and personalized medicine*. *Ann Med*, 2007. **39**(3): p. 177-99.
383. Pierik, M., et al., *Toll-like receptor-1, -2, and -6 polymorphisms influence disease extension in inflammatory bowel diseases*. *Inflamm Bowel Dis*, 2006. **12**(1): p. 1-8.
384. Hart, A.L., et al., *Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases*. *Gastroenterology*, 2005. **129**(1): p. 50-65.
385. 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.
386. Cruickshank, S.M., et al., *Colonic epithelial cell mediated suppression of CD4 T cell activation*. *Gut*, 2004. **53**(5): p. 678-84.
387. 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.
388. 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.
389. 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.
390. Marks, D.J., et al., *Defective acute inflammation in Crohn's disease: a clinical investigation*. *Lancet*, 2006. **367**(9511): p. 668-78.
391. Smith, A.M., et al., *Disordered macrophage cytokine secretion underlies impaired acute inflammation and bacterial clearance in Crohn's disease*. *J Exp Med*, 2009. **206**(9): p. 1883-97.
392. Casanova, J.L. and L. Abel, *Revisiting Crohn's disease as a primary immunodeficiency of macrophages*. *J Exp Med*, 2009. **206**(9): p. 1839-43.
393. Panes, J., I. Ordas, and E. Ricart, *Stem cell treatment for Crohn's disease*. *Expert Rev Clin Immunol*, 2010. **6**(4): p. 597-605.
394. Oyama, Y., et al., *Autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with refractory Crohn's disease*. *Gastroenterology*, 2005. **128**(3): p. 552-63.
395. Viazis, N., et al., *Course of inflammatory bowel disease in patients infected with human immunodeficiency virus*. *Inflamm Bowel Dis*, 2010. **16**(3): p. 507-11.
396. 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.
397. Lazebnik, L.B., et al., *[Cell adhesion molecules in evaluation of Crohn's disease therapy]*. *Eksp Klin Gastroenterol*, 2013(3): p. 31-8.
398. 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.
399. 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.
400. 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.
401. Marineata, A., et al., *Extra intestinal manifestations and complications in inflammatory bowel disease*. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*, 2014. **118**(2): p. 279-88.
402. 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.



403. Gabay, C. and I. Kushner, *Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation*. N Engl J Med, 1999. **340**(6): p. 448-54.
404. Assadsangabi, A. and A.J. Lobo, *Diagnosing and managing inflammatory bowel disease*. Practitioner, 2013. **257**(1763): p. 13-8, 2.
405. Rogler, G. and S. Vavricka, *Anemia in inflammatory bowel disease: an under-estimated problem?* Front Med (Lausanne), 2014. **1**: p. 58.
406. 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.
407. Itzkowitz, S.H. and N. Harpaz, *Diagnosis and management of dysplasia in patients with inflammatory bowel diseases*. Gastroenterology, 2004. **126**(6): p. 1634-48.
408. Rutter, M., et al., *Severity of inflammation is a risk factor for colorectal neoplasia in ulcerative colitis*. Gastroenterology, 2004. **126**(2): p. 451-9.
409. Ditsworth, D. and W.X. Zong, *NF-kappaB: key mediator of inflammation-associated cancer*. Cancer Biol Ther, 2004. **3**(12): p. 1214-6.
410. Tracey, D., et al., *Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review*. Pharmacol Ther, 2008. **117**(2): p. 244-79.
411. Popivanova, B.K., et al., *Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis*. J Clin Invest, 2008. **118**(2): p. 560-70.
412. Waldner, M.J. and M.F. Neurath, *Cytokines in colitis associated cancer: potential drug targets?* Inflamm Allergy Drug Targets, 2008. **7**(3): p. 187-94.
413. Jobin, C. and R.B. Sartor, *NF-kappaB signaling proteins as therapeutic targets for inflammatory bowel diseases*. Inflamm Bowel Dis, 2000. **6**(3): p. 206-13.
414. Pahl, H.L., *Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors*. Oncogene, 1999. **18**(49): p. 6853-66.
415. Grilli, M., J.J. Chiu, and M.J. Lenardo, *NF-kappa B and Rel: participants in a multiform transcriptional regulatory system*. Int Rev Cytol, 1993. **143**: p. 1-62.
416. Wang, C., et al., *TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK*. Nature, 2001. **412**(6844): p. 346-51.
417. Wei, J. and J. Feng, *Signaling pathways associated with inflammatory bowel disease*. Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov, 2010. **4**(2): p. 105-17.
418. Kawai, T., et al., *Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes*. J Immunol, 2001. **167**(10): p. 5887-94.
419. Hacker, H., et al., *Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6*. Nature, 2006. **439**(7073): p. 204-7.
420. Kawai, T., et al., *Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin*. Immunity, 1999. **11**(1): p. 115-22.
421. Wesche, H., et al., *MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex*. Immunity, 1997. **7**(6): p. 837-47.
422. Burns, K., et al., *Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(6): p. 346-51.
423. Vadlamudi, R.K., et al., *p62, a phosphotyrosine-independent ligand of the SH2 domain of p56lck, belongs to a new class of ubiquitin-binding proteins*. J Biol Chem, 1996. **271**(34): p. 20235-7.
424. Yao, J., et al., *Interleukin-1 (IL-1)-induced TAK1-dependent Versus MEKK3-dependent NFkappaB activation pathways bifurcate at IL-1 receptor-associated kinase modification*. J Biol Chem, 2007. **282**(9): p. 6075-89.
425. Solt, L.A., et al., *Interleukin-1-induced NF-kappaB activation is NEMO-dependent but does not require IKKbeta*. J Biol Chem, 2007. **282**(12): p. 8724-33.
426. Micheau, O. and J. Tschopp, *Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes*. Cell, 2003. **114**(2): p. 181-90.

427. Harper, N., et al., *Fas-associated death domain protein and caspase-8 are not recruited to the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex during tumor necrosis factor-induced apoptosis*. J Biol Chem, 2003. **278**(28): p. 25534-41.
428. Hsu, H., et al., *TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex*. Immunity, 1996. **4**(4): p. 387-96.
429. Hsu, H., et al., *TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways*. Cell, 1996. **84**(2): p. 299-308.
430. Kanayama, A., et al., *TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains*. Mol Cell, 2004. **15**(4): p. 535-48.
431. Ea, C.K., et al., *Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO*. Mol Cell, 2006. **22**(2): p. 245-57.
432. Blonska, M., et al., *TAK1 is recruited to the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) receptor 1 complex in a receptor-interacting protein (RIP)-dependent manner and cooperates with MEKK3 leading to NF-kappaB activation*. J Biol Chem, 2005. **280**(52): p. 43056-63.
433. Meskiene, I. and H. Hirt, *MAP kinase pathways: molecular plug-and-play chips for the cell*. Plant Mol Biol, 2000. **42**(6): p. 791-806.
434. Liu, Y. and S. Zhang, *Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in Arabidopsis*. Plant Cell, 2004. **16**(12): p. 3386-99.
435. Cargnello, M. and P.P. Roux, *Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases*. Microbiol Mol Biol Rev, 2011. **75**(1): p. 50-83.
436. Leonard, W.J. and J.J. O'Shea, *Jaks and STATs: biological implications*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 293-322.
437. Hawkins, K., S. Joy, and T. McKay, *Cell signalling pathways underlying induced pluripotent stem cell reprogramming*. World J Stem Cells, 2014. **6**(5): p. 620-8.
438. Durant, L., et al., *Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis*. Immunity, 2010. **32**(5): p. 605-15.
439. Kolls, J.K. and A. Linden, *Interleukin-17 family members and inflammation*. Immunity, 2004. **21**(4): p. 467-76.
440. Liu, X., et al., *Loss of STAT3 in CD4+ T cells prevents development of experimental autoimmune diseases*. J Immunol, 2008. **180**(9): p. 6070-6.
441. Chaudhry, A., et al., *CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner*. Science, 2009. **326**(5955): p. 986-91.
442. Sanseverino, I., et al., *STAT3-silenced human dendritic cells have an enhanced ability to prime IFNgamma production by both alphabeta and gammadelta T lymphocytes*. Immunobiology, 2014. **219**(7): p. 503-11.
443. Akira, S., *Roles of STAT3 defined by tissue-specific gene targeting*. Oncogene, 2000. **19**(21): p. 2607-11.
444. Niemand, C., et al., *Activation of STAT3 by IL-6 and IL-10 in primary human macrophages is differentially modulated by suppressor of cytokine signaling 3*. J Immunol, 2003. **170**(6): p. 3263-72.
445. Li, Y., et al., *New insights into the role of STAT3 in IBD*. Inflamm Bowel Dis, 2012. **18**(6): p. 1177-83.
446. Zindl, C.L., et al., *IL-22-producing neutrophils contribute to antimicrobial defense and restitution of colonic epithelial integrity during colitis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(31): p. 12768-73.
447. Iwasaki, Y., et al., *Interleukin-27 in T Cell Immunity*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(2): p. 2851-2863.
448. Booth, D. and C.S. Potten, *Protection against mucosal injury by growth factors and cytokines*. J Natl Cancer Inst Monogr, 2001(29): p. 16-20.
449. Bollrath, J., et al., *gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis*. Cancer Cell, 2009. **15**(2): p. 91-102.

450. Pickert, G., et al., *STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing*. J Exp Med, 2009. **206**(7): p. 1465-72.
451. Ferguson, L.R., et al., *Genetic factors in chronic inflammation: single nucleotide polymorphisms in the STAT-JAK pathway, susceptibility to DNA damage and Crohn's disease in a New Zealand population*. Mutat Res, 2010. **690**(1-2): p. 108-15.
452. Mudter, J., et al., *Activation pattern of signal transducers and activators of transcription (STAT) factors in inflammatory bowel diseases*. Am J Gastroenterol, 2005. **100**(1): p. 64-72.
453. Nusslein-Volhard, C. and E. Wieschaus, *Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila*. Nature, 1980. **287**(5785): p. 795-801.
454. Rijsewijk, F., et al., *The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless*. Cell, 1987. **50**(4): p. 649-57.
455. Monroe, D.G., et al., *Update on Wnt signaling in bone cell biology and bone disease*. Gene, 2012. **492**(1): p. 1-18.
456. Clevers, H. and R. Nusse, *Wnt/beta-catenin signaling and disease*. Cell, 2012. **149**(6): p. 1192-205.
457. DasGupta, R. and E. Fuchs, *Multiple roles for activated LEF/TCF transcription complexes during hair follicle development and differentiation*. Development, 1999. **126**(20): p. 4557-68.
458. Czerwinska, P. and B. Kaminska, *Regulation of breast cancer stem cell features*. Contemp Oncol (Pozn), 2015. **19**(1A): p. A7-A15.
459. Ohta, Y. and T. Sato, *Intestinal tumor in a dish*. Front Med (Lausanne), 2014. **1**: p. 14.
460. Merlos-Suarez, A., et al., *The intestinal stem cell signature identifies colorectal cancer stem cells and predicts disease relapse*. Cell Stem Cell, 2011. **8**(5): p. 511-24.
461. Vincan, E., *Frizzled/WNT signalling: the insidious promoter of tumour growth and progression*. Front Biosci, 2004. **9**: p. 1023-34.
462. Mikels, A.J. and R. Nusse, *Wnts as ligands: processing, secretion and reception*. Oncogene, 2006. **25**(57): p. 7461-8.
463. Willert, K. and R. Nusse, *Wnt proteins*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(9): p. a007864.
464. Jin, Y.R. and J.K. Yoon, *The R-spondin family of proteins: emerging regulators of WNT signaling*. Int J Biochem Cell Biol, 2012. **44**(12): p. 2278-87.
465. Katoh, M., *WNT/PCP signaling pathway and human cancer (review)*. Oncol Rep, 2005. **14**(6): p. 1583-8.
466. Kohn, A.D. and R.T. Moon, *Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways*. Cell Calcium, 2005. **38**(3-4): p. 439-46.
467. Barker, N., et al., *Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro*. Cell Stem Cell, 2010. **6**(1): p. 25-36.
468. Barker, N., et al., *Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer*. Nature, 2009. **457**(7229): p. 608-11.
469. Angers, S. and R.T. Moon, *Proximal events in Wnt signal transduction*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(7): p. 468-77.
470. He, X., et al., *LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way*. Development, 2004. **131**(8): p. 1663-77.
471. Xu, Q., et al., *Vascular development in the retina and inner ear: control by Norrin and Frizzled-4, a high-affinity ligand-receptor pair*. Cell, 2004. **116**(6): p. 883-95.
472. Carmon, K.S., et al., *R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/beta-catenin signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(28): p. 11452-7.
473. Binnerts, M.E., et al., *R-Spondin1 regulates Wnt signaling by inhibiting internalization of LRP6*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(37): p. 14700-5.
474. Kawano, Y. and R. Kypta, *Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 13): p. 2627-34.

475. Zeng, X., et al., *A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation*. Nature, 2005. **438**(7069): p. 873-7.
476. Bilic, J., et al., *Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation*. Science, 2007. **316**(5831): p. 1619-22.
477. Davidson, G., et al., *Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction*. Nature, 2005. **438**(7069): p. 867-72.
478. Stadel, R., R. Hoffmann, and K. Basler, *Transcription under the control of nuclear Arm/beta-catenin*. Curr Biol, 2006. **16**(10): p. R378-85.
479. Molenaar, M., et al., *XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in Xenopus embryos*. Cell, 1996. **86**(3): p. 391-9.
480. van de Wetering, M., et al., *Armadillo coactivates transcription driven by the product of the Drosophila segment polarity gene dTCF*. Cell, 1997. **88**(6): p. 789-99.
481. Ruffner, H., et al., *R-Spondin potentiates Wnt/beta-catenin signaling through orphan receptors LGR4 and LGR5*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e40976.
482. Korinek, V., et al., *Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4*. Nat Genet, 1998. **19**(4): p. 379-83.
483. Reya, T. and H. Clevers, *Wnt signalling in stem cells and cancer*. Nature, 2005. **434**(7035): p. 843-50.
484. van Es, J.H., et al., *Wnt signalling induces maturation of Paneth cells in intestinal crypts*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(4): p. 381-6.
485. Koch, S., et al., *The Wnt antagonist Dkk1 regulates intestinal epithelial homeostasis and wound repair*. Gastroenterology, 2011. **141**(1): p. 259-68, 268 e1-8.
486. MacPherson, B.R. and C.J. Pfeiffer, *Experimental production of diffuse colitis in rats*. Digestion, 1978. **17**(2): p. 135-50.
487. Rachmilewitz, D., F. Karmeli, and E. Okon, *Sulphydryl blocker-induced rat colonic inflammation is ameliorated by inhibition of nitric oxide synthase*. Gastroenterology, 1995. **109**(1): p. 98-106.
488. Satoh, H., et al., *New ulcerative colitis model induced by sulphydryl blockers in rats and the effects of antiinflammatory drugs on the colitis*. Jpn J Pharmacol, 1997. **73**(4): p. 299-309.
489. Barada, K.A., et al., *Localized colonic inflammation increases cytokine levels in distant small intestinal segments in the rat*. Life Sci, 2006. **79**(21): p. 2032-42.
490. Okayasu, I., et al., *A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice*. Gastroenterology, 1990. **98**(3): p. 694-702.
491. Dieleman, L.A., et al., *Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice*. Gastroenterology, 1994. **107**(6): p. 1643-52.
492. Clapper, M.L., H.S. Cooper, and W.C. Chang, *Dextran sulfate sodium-induced colitis-associated neoplasia: a promising model for the development of chemopreventive interventions*. Acta Pharmacol Sin, 2007. **28**(9): p. 1450-9.
493. Morris, G.P., et al., *Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon*. Gastroenterology, 1989. **96**(3): p. 795-803.
494. Neurath, M.F., et al., *Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice*. J Exp Med, 1995. **182**(5): p. 1281-90.
495. Strober, W., et al., *Reciprocal IFN-gamma and TGF-beta responses regulate the occurrence of mucosal inflammation*. Immunol Today, 1997. **18**(2): p. 61-4.
496. Glaeser, H. and M.F. Fromm, *Animal models and intestinal drug transport*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2008. **4**(4): p. 347-61.
497. Kaur, K., et al., *RGS-insensitive Galpha subunits: probes of Galpha subtype-selective signaling and physiological functions of RGS proteins*. Methods Mol Biol, 2011. **756**: p. 75-98.
498. Irie, K., et al., *Roles and modes of action of nectins in cell-cell adhesion*. Semin Cell Dev Biol, 2004. **15**(6): p. 643-56.

499. Wilk, J.N., J. Bilborough, and J.L. Viney, *The mdrla<sup>-/-</sup> mouse model of spontaneous colitis: a relevant and appropriate animal model to study inflammatory bowel disease*. *Immunol Res*, 2005. **31**(2): p. 151-9.
500. Vereecke, L., et al., *Enterocyte-specific A20 deficiency sensitizes to tumor necrosis factor-induced toxicity and experimental colitis*. *J Exp Med*, 2010. **207**(7): p. 1513-23.
501. Kole, A. and K.J. Maloy, *Control of intestinal inflammation by interleukin-10*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2014. **380**: p. 19-38.
502. Fullard, N., C.L. Wilson, and F. Oakley, *Roles of c-Rel signalling in inflammation and disease*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012. **44**(6): p. 851-60.
503. Boden, E., et al., *The role of CD28 and CTLA4 in the function and homeostasis of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells*. *Novartis Found Symp*, 2003. **252**: p. 55-63; discussion 63-6, 106-14.
504. Strober, W., B.R. Ludviksson, and I.J. Fuss, *The pathogenesis of mucosal inflammation in murine models of inflammatory bowel disease and Crohn disease*. *Ann Intern Med*, 1998. **128**(10): p. 848-56.
505. Kontoyiannis, D., et al., *Genetic dissection of the cellular pathways and signaling mechanisms in modeled tumor necrosis factor-induced Crohn's-like inflammatory bowel disease*. *J Exp Med*, 2002. **196**(12): p. 1563-74.
506. Mombaerts, P., et al., *Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T cell receptor mutant mice*. *Cell*, 1993. **75**(2): p. 274-82.
507. Xavier, R.J. and D.K. Podolsky, *Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease*. *Nature*, 2007. **448**(7152): p. 427-34.
508. Gommerman, J.L. and L. Summers deLuca, *LTbetaR and CD40: working together in dendritic cells to optimize immune responses*. *Immunol Rev*, 2011. **244**(1): p. 85-98.
509. Zanninelli, G., et al., *Smad3 knock-out mice as a useful model to study intestinal fibrogenesis*. *World J Gastroenterol*, 2006. **12**(8): p. 1211-8.
510. Vetuschi, A., et al., *Smad3-null mice lack interstitial cells of Cajal in the colonic wall*. *Eur J Clin Invest*, 2006. **36**(1): p. 41-8.
511. Watanabe, M., et al., *Interleukin 7 transgenic mice develop chronic colitis with decreased interleukin 7 protein accumulation in the colonic mucosa*. *J Exp Med*, 1998. **187**(3): p. 389-402.
512. Wirtz, S., et al., *Cutting edge: chronic intestinal inflammation in STAT-4 transgenic mice: characterization of disease and adoptive transfer by TNF- plus IFN-gamma-producing CD4<sup>+</sup> T cells that respond to bacterial antigens*. *J Immunol*, 1999. **162**(4): p. 1884-8.
513. Elson, C.O., Y. Cong, and J. Sundberg, *The C3H/HeJBir mouse model: a high susceptibility phenotype for colitis*. *Int Rev Immunol*, 2000. **19**(1): p. 63-75.
514. Strober, W., K. Nakamura, and A. Kitani, *The SAMP1/Yit mouse: another step closer to modeling human inflammatory bowel disease*. *J Clin Invest*, 2001. **107**(6): p. 667-70.
515. Powrie, F., R.L. Coffman, and R. Correa-Oliveira, *Transfer of CD4<sup>+</sup> T cells to C.B-17 SCID mice: a model to study Th1 and Th2 cell differentiation and regulation in vivo*. *Res Immunol*, 1994. **145**(5): p. 347-53.
516. Powrie, F., et al., *Phenotypically distinct subsets of CD4<sup>+</sup> T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice*. *Int Immunol*, 1993. **5**(11): p. 1461-71.
517. Morrissey, P.J., et al., *CD4<sup>+</sup> T cells that express high levels of CD45RB induce wasting disease when transferred into congenic severe combined immunodeficient mice. Disease development is prevented by cotransfer of purified CD4<sup>+</sup> T cells*. *J Exp Med*, 1993. **178**(1): p. 237-44.
518. Mascaraque, C., et al., *Rutin has intestinal antiinflammatory effects in the CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> T cell transfer model of colitis*. *Pharmacol Res*, 2014. **90**: p. 48-57.
519. Powrie, F., et al., *Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4<sup>+</sup> T cells*. *Immunity*, 1994. **1**(7): p. 553-62.
520. McGovern, D. and F. Powrie, *The IL23 axis plays a key role in the pathogenesis of IBD*. *Gut*, 2007. **56**(10): p. 1333-6.

521. Gotlind, Y.Y., et al., *CD4+FoxP3+ regulatory T cells from Galphai2-/- mice are functionally active in vitro, but do not prevent colitis*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e25073.
522. Blum, A.M., et al., *Heligmosomoides polygyrus bakeri induces tolerogenic dendritic cells that block colitis and prevent antigen-specific gut T cell responses*. J Immunol, 2012. **189**(5): p. 2512-20.
523. Gisbert, J.P., et al., *Role of 5-aminosalicylic acid (5-ASA) in treatment of inflammatory bowel disease: a systematic review*. Dig Dis Sci, 2002. **47**(3): p. 471-88.
524. Sutherland, L., et al., *Oral 5-aminosalicylic acid for maintenance of remission in ulcerative colitis*. Cochrane Database Syst Rev, 2002(4): p. CD000544.
525. Azad Khan, A.K., J. Piris, and S.C. Truelove, *An experiment to determine the active therapeutic moiety of sulphasalazine*. Lancet, 1977. **2**(8044): p. 892-5.
526. van Hees, P.A., J.H. Bakker, and J.H. van Tongeren, *Effect of sulphapyridine, 5-aminosalicylic acid, and placebo in patients with idiopathic proctitis: a study to determine the active therapeutic moiety of sulphasalazine*. Gut, 1980. **21**(7): p. 632-5.
527. Forbes, A., et al., *Review article: Oral, modified-release mesalazine formulations--proprietary versus generic*. Aliment Pharmacol Ther, 2003. **17**(10): p. 1207-14.
528. Christensen, L.A., et al., *Release of 5-aminosalicylic acid from Pentasa during normal and accelerated intestinal transit time*. Br J Clin Pharmacol, 1987. **23**(3): p. 365-9.
529. Nikolaus, S., U. Folsch, and S. Schreiber, *Immunopharmacology of 5-aminosalicylic acid and of glucocorticoids in the therapy of inflammatory bowel disease*. Hepatogastroenterology, 2000. **47**(31): p. 71-82.
530. Greenfield, S.M., et al., *Review article: the mode of action of the aminosalicylates in inflammatory bowel disease*. Aliment Pharmacol Ther, 1993. **7**(4): p. 369-83.
531. Wahl, C., et al., *Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B*. J Clin Invest, 1998. **101**(5): p. 1163-74.
532. Weber, C.K., et al., *Suppression of NF-kappaB activity by sulfasalazine is mediated by direct inhibition of IkappaB kinases alpha and beta*. Gastroenterology, 2000. **119**(5): p. 1209-18.
533. Martinez-Augustin, O., et al., *Genomic analysis of sulfasalazine effect in experimental colitis is consistent primarily with the modulation of NF-kappaB but not PPAR-gamma signaling*. Pharmacogenet Genomics, 2009. **19**(5): p. 363-72.
534. Schroeder, K.W., W.J. Tremaine, and D.M. Ilstrup, *Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study*. N Engl J Med, 1987. **317**(26): p. 1625-9.
535. Sninsky, C.A., et al., *Oral mesalamine (Asacol) for mildly to moderately active ulcerative colitis. A multicenter study*. Ann Intern Med, 1991. **115**(5): p. 350-5.
536. O'Morain, C., *Sulfasalazine: side effects*. Dig Dis Sci, 1984. **29**(8): p. 782.
537. Lennard, L., *The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine*. Eur J Clin Pharmacol, 1992. **43**(4): p. 329-39.
538. Colman, R.J. and D.T. Rubin, *Optimal Doses of Methotrexate Combined with Anti-TNF Therapy to Maintain Clinical Remission in Inflammatory Bowel Disease*. J Crohns Colitis, 2015.
539. Gorlick, R., et al., *Intrinsic and acquired resistance to methotrexate in acute leukemia*. N Engl J Med, 1996. **335**(14): p. 1041-8.
540. Flanagan, W.M., et al., *Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A*. Nature, 1991. **352**(6338): p. 803-7.
541. Cominelli, F., et al., *Recombinant interleukin-1 receptor antagonist blocks the proinflammatory activity of endogenous interleukin-1 in rabbit immune colitis*. Gastroenterology, 1992. **103**(1): p. 65-71.
542. Sandborn, W.J., et al., *Ustekinumab induction and maintenance therapy in refractory Crohn's disease*. N Engl J Med, 2012. **367**(16): p. 1519-28.
543. Rutgeerts, P., S. Vermeire, and G. Van Assche, *Biological therapies for inflammatory bowel diseases*. Gastroenterology, 2009. **136**(4): p. 1182-97.

544. Keshav, S., et al., *A randomized controlled trial of the efficacy and safety of CCX282-B, an orally-administered blocker of chemokine receptor CCR9, for patients with Crohn's disease*. PLoS One, 2013. **8**(3): p. e60094.
545. Leiman, D.A. and G.R. Lichtenstein, *Therapy of inflammatory bowel disease: what to expect in the next decade*. Curr Opin Gastroenterol, 2014. **30**(4): p. 385-90.
546. Vasiliauskas, E.A., et al., *An open-label pilot study of low-dose thalidomide in chronically active, steroid-dependent Crohn's disease*. Gastroenterology, 1999. **117**(6): p. 1278-87.
547. Ehrenpreis, E.D., et al., *Thalidomide therapy for patients with refractory Crohn's disease: an open-label trial*. Gastroenterology, 1999. **117**(6): p. 1271-7.
548. Haslett, P.A., et al., *Thalidomide stimulates T cell responses and interleukin 12 production in HIV-infected patients*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1999. **15**(13): p. 1169-79.
549. Sykes, A.P., et al., *The effect of an inhibitor of matrix metalloproteinases on colonic inflammation in a trinitrobenzenesulphonic acid rat model of inflammatory bowel disease*. Aliment Pharmacol Ther, 1999. **13**(11): p. 1535-42.
550. Fedorak, R.N., et al., *Recombinant human interleukin 10 in the treatment of patients with mild to moderately active Crohn's disease*. The Interleukin 10 Inflammatory Bowel Disease Cooperative Study Group. Gastroenterology, 2000. **119**(6): p. 1473-82.
551. Schreiber, S., et al., *Safety and efficacy of recombinant human interleukin 10 in chronic active Crohn's disease*. Crohn's Disease IL-10 Cooperative Study Group. Gastroenterology, 2000. **119**(6): p. 1461-72.
552. Miller, D.H., et al., *A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis*. N Engl J Med, 2003. **348**(1): p. 15-23.
553. Bickston, S.J., et al., *Vedolizumab for induction and maintenance of remission in ulcerative colitis*. Cochrane Database Syst Rev, 2014. **8**: p. CD007571.
554. Vermeire, S. and P. Rutgeerts, *IBD in 2012: Pathogenesis and management of IBD--thinking outside the box*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2013. **10**(2): p. 67-9.
555. Mamolo, C., et al., *Tofacitinib (CP-690,550), an oral Janus kinase inhibitor, improves patient-reported outcomes in a phase 2b, randomized, double-blind, placebo-controlled study in patients with moderate-to-severe psoriasis*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2013.
556. Sandborn, W.J., et al., *Tofacitinib, an oral Janus kinase inhibitor, in active ulcerative colitis*. N Engl J Med, 2012. **367**(7): p. 616-24.
557. Richards, C.D., et al., *Adenovirus vectors for cytokine gene expression*. Ann N Y Acad Sci, 1995. **762**: p. 282-92; discussion 292-3.
558. Wilson, J.M., *Adenoviruses as gene-delivery vehicles*. N Engl J Med, 1996. **334**(18): p. 1185-7.
559. Chao, H., et al., *Persistent expression of canine factor IX in hemophilia B canines*. Gene Ther, 1999. **6**(10): p. 1695-704.
560. During, M.J., et al., *Peroral gene therapy of lactose intolerance using an adeno-associated virus vector*. Nat Med, 1998. **4**(10): p. 1131-5.
561. Spisni, E., et al., *Cyclooxygenase-2 silencing for the treatment of colitis: a combined in vivo strategy based on RNA interference and engineered Escherichia coli*. Mol Ther, 2015. **23**(2): p. 278-89.
562. Schreiber, S., et al., *Absence of efficacy of subcutaneous antisense ICAM-1 treatment of chronic active Crohn's disease*. Gastroenterology, 2001. **120**(6): p. 1339-46.
563. Jung, W.Y., et al., *Human adipose-derived stem cells attenuate inflammatory bowel disease in IL-10 knockout mice*. Tissue Cell, 2015. **47**(1): p. 86-93.
564. Qu, B., et al., *Testing stem cell therapy in a rat model of inflammatory bowel disease: role of bone marrow stem cells and stem cell factor in mucosal regeneration*. PLoS One, 2014. **9**(10): p. e107891.
565. Martinez-Montiel Mdel, P., G.J. Gomez-Gomez, and A.I. Flores, *Therapy with stem cells in inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(5): p. 1211-27.

566. van Deen, W.K., A. Oikonomopoulos, and D.W. Hommes, *Stem cell therapy in inflammatory bowel disease: which, when and how?* *Curr Opin Gastroenterol*, 2013. **29**(4): p. 384-90.
567. Lopez-Cubero, S.O., K.M. Sullivan, and G.B. McDonald, *Course of Crohn's disease after allogeneic marrow transplantation.* *Gastroenterology*, 1998. **114**(3): p. 433-40.
568. Copelan, E.A., *Hematopoietic stem-cell transplantation.* *N Engl J Med*, 2006. **354**(17): p. 1813-26.
569. Liu, J., et al., *Applications of Induced Pluripotent Stem Cells in the Modeling of Human Inflammatory Bowel Diseases.* *Curr Stem Cell Res Ther*, 2014.
570. Burger, D. and S. Travis, *Conventional medical management of inflammatory bowel disease.* *Gastroenterology*, 2011. **140**(6): p. 1827-1837 e2.
571. Ricart, E., et al., *Are we giving biologics too late? The case for early versus late use.* *World J Gastroenterol*, 2008. **14**(36): p. 5523-7.
572. Baert, F., R. Caprilli, and E. Angelucci, *Medical therapy for Crohn's disease: top-down or step-up?* *Dig Dis*, 2007. **25**(3): p. 260-6.
573. 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.
574. 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.
575. 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.
576. 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.
577. 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.
578. 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.
579. 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.
580. Medzhitov, R., *Septic shock: on the importance of being tolerant.* *Immunity*, 2013. **39**(5): p. 799-800.
581. 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.
582. 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.
583. Chrousos, G.P., *Stress and disorders of the stress system.* *Nat Rev Endocrinol*, 2009. **5**(7): p. 374-81.
584. Mayer, E.A., et al., *V. Stress and irritable bowel syndrome.* *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001. **280**(4): p. G519-24.
585. 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.
586. 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.
587. 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.
588. 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.
589. Pimenta, E., M. Wolley, and M. Stowasser, *Adverse cardiovascular outcomes of corticosteroid excess.* *Endocrinology*, 2012. **153**(11): p. 5137-42.



590. 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.
591. Johannsson, G. and O. Ragnarsson, *Cardiovascular and metabolic impact of glucocorticoid replacement therapy*. *Front Horm Res*, 2014. **43**: p. 33-44.
592. Nussinovitch, U., et al., *Glucocorticoids and the cardiovascular system: state of the art*. *Curr Pharm Des*, 2010. **16**(32): p. 3574-85.
593. 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.
594. Hanaoka, B.Y., et al., *Implications of glucocorticoid therapy in idiopathic inflammatory myopathies*. *Nat Rev Rheumatol*, 2012. **8**(8): p. 448-57.
595. 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.
596. 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.
597. Silverman, M.N. and E.M. Sternberg, *Glucocorticoid regulation of inflammation and its functional correlates: from HPA axis to glucocorticoid receptor dysfunction*. *Ann N Y Acad Sci*, 2012. **1261**: p. 55-63.
598. Ambroggi, F., et al., *Stress and addiction: glucocorticoid receptor in dopaminergic neurons facilitates cocaine seeking*. *Nat Neurosci*, 2009. **12**(3): p. 247-9.
599. Desrivieres, S., et al., *Glucocorticoid receptor (NR3C1) gene polymorphisms and onset of alcohol abuse in adolescents*. *Addict Biol*, 2011. **16**(3): p. 510-3.
600. Wei, Q., et al., *Early-life forebrain glucocorticoid receptor overexpression increases anxiety behavior and cocaine sensitization*. *Biol Psychiatry*, 2012. **71**(3): p. 224-31.
601. Arnett, M.G., et al., *Behavioral insights from mouse models of forebrain--and amygdala-specific glucocorticoid receptor genetic disruption*. *Mol Cell Endocrinol*, 2011. **336**(1-2): p. 2-5.
602. 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.
603. Garza, J.C., et al., *Leptin restores adult hippocampal neurogenesis in a chronic unpredictable stress model of depression and reverses glucocorticoid-induced inhibition of GSK-3beta/beta-catenin signaling*. *Mol Psychiatry*, 2012. **17**(8): p. 790-808.
604. Silva, E.J., et al., *Innate immunity and glucocorticoids: potential regulatory mechanisms in epididymal biology*. *J Androl*, 2011. **32**(6): p. 614-24.
605. Moisiadis, V.G. and S.G. Matthews, *Glucocorticoids and fetal programming part 2: Mechanisms*. *Nat Rev Endocrinol*, 2014. **10**(7): p. 403-11.
606. Harris, A. and J. Seckl, *Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease*. *Horm Behav*, 2011. **59**(3): p. 279-89.
607. 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.
608. 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.
609. Funder, J.W., *Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors: biology and clinical relevance*. *Annu Rev Med*, 1997. **48**: p. 231-40.
610. 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.
611. 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.

612. 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.
613. 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.
614. 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.
615. 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.
616. 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.
617. Pratt, W.B., et al., *Chaperoning of glucocorticoid receptors*. Handb Exp Pharmacol, 2006(172): p. 111-38.
618. 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.
619. Kadmiel, M. and J.A. Cidlowski, *Glucocorticoid receptor signaling in health and disease*. Trends Pharmacol Sci, 2013. **34**(9): p. 518-30.
620. 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.
621. 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.
622. Beck, I.M., et al., *Crosstalk in inflammation: the interplay of glucocorticoid receptor-based mechanisms and kinases and phosphatases*. Endocr Rev, 2009. **30**(7): p. 830-82.
623. 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.
624. 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.
625. Stocklin, E., et al., *Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor*. Nature, 1996. **383**(6602): p. 726-8.
626. 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.
627. 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.
628. Schule, R., et al., *Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor*. Cell, 1990. **62**(6): p. 1217-26.
629. Imai, E., et al., *Glucocorticoid receptor-cAMP response element-binding protein interaction and the response of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene to glucocorticoids*. J Biol Chem, 1993. **268**(8): p. 5353-6.
630. Ogawa, S., et al., *Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors*. Cell, 2005. **122**(5): p. 707-21.
631. Liberman, A.C., et al., *The activated glucocorticoid receptor inhibits the transcription factor T-bet by direct protein-protein interaction*. FASEB J, 2007. **21**(4): p. 1177-88.
632. Liberman, A.C., et al., *Intracellular molecular signaling. Basis for specificity to glucocorticoid anti-inflammatory actions*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1153**: p. 6-13.
633. 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.

634. 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.
635. 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.
636. 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.
637. 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.
638. Breuner, C.W. and M. Orchinik, *Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid action in vertebrates*. J Endocrinol, 2002. **175**(1): p. 99-112.
639. 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.
640. Pemberton, P.A., et al., *Hormone binding globulins undergo serpin conformational change in inflammation*. Nature, 1988. **336**(6196): p. 257-8.
641. Mendel, C.M., *The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model*. Endocr Rev, 1989. **10**(3): p. 232-74.
642. Fleshner, M., et al., *A long-term increase in basal levels of corticosterone and a decrease in corticosteroid-binding globulin after acute stressor exposure*. Endocrinology, 1995. **136**(12): p. 5336-42.
643. Neufeld, J.H., L. Breen, and R. Hauger, *Extreme posture elevates corticosterone in a forced ambulation model of chronic stress in rats*. Pharmacol Biochem Behav, 1994. **47**(2): p. 233-40.
644. 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.
645. 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.
646. Petersen, H.H., et al., *Hyporesponsiveness to glucocorticoids in mice genetically deficient for the corticosteroid binding globulin*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(19): p. 7236-45.
647. 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.
648. 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.
649. 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.
650. 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.
651. 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.
652. Bayo, P., et al., *Glucocorticoid receptor is required for skin barrier competence*. Endocrinology, 2008. **149**(3): p. 1377-88.
653. 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.
654. 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.
655. 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.

656. 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.
657. 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.
658. 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.
659. Forster, C., *Tight junctions and the modulation of barrier function in disease*. Histochem Cell Biol, 2008. **130**(1): p. 55-70.
660. 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.
661. Gavard, J., *Breaking the VE-cadherin bonds*. FEBS Lett, 2009. **583**(1): p. 1-6.
662. Crosby, C.V., et al., *VE-cadherin is not required for the formation of nascent blood vessels but acts to prevent their disassembly*. Blood, 2005. **105**(7): p. 2771-6.
663. 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.
664. Salvador, E., S. Shityakov, and C. Forster, *Glucocorticoids and endothelial cell barrier function*. Cell Tissue Res, 2014. **355**(3): p. 597-605.
665. Pitzalis, C., N. Pipitone, and M. Perretti, *Regulation of leukocyte-endothelial interactions by glucocorticoids*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **966**: p. 108-18.
666. 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.
667. 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.
668. Anacker, C., et al., *The glucocorticoid receptor: pivot of depression and of antidepressant treatment?* Psychoneuroendocrinology, 2011. **36**(3): p. 415-25.
669. Schacke, H., W.D. Docke, and K. Asadullah, *Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids*. Pharmacol Ther, 2002. **96**(1): p. 23-43.
670. Torriglia, A., F. Valamanesh, and F. Behar-Cohen, *On the retinal toxicity of intraocular glucocorticoids*. Biochem Pharmacol, 2010. **80**(12): p. 1878-86.
671. Small, G.R., et al., *Preventing local regeneration of glucocorticoids by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 enhances angiogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(34): p. 12165-70.
672. Shikatani, E.A., et al., *Inhibition of proliferation, migration and proteolysis contribute to corticosterone-mediated inhibition of angiogenesis*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e46625.
673. El Zaoui, I., F. Behar-Cohen, and A. Torriglia, *Glucocorticoids exert direct toxicity on microvasculature: analysis of cell death mechanisms*. Toxicol Sci, 2015. **143**(2): p. 441-53.
674. Lu, W., et al., *VEGF induces phosphorylation of STAT3 through binding VEGFR2 in ovarian carcinoma cells in vitro*. Eur J Gynaecol Oncol, 2006. **27**(4): p. 363-9.
675. Connolly, D.T., et al., *Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis*. J Clin Invest, 1989. **84**(5): p. 1470-8.
676. Gerhardt, H., et al., *VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia*. J Cell Biol, 2003. **161**(6): p. 1163-77.
677. Li, S., et al., *Distinct roles for the small GTPases Cdc42 and Rho in endothelial responses to shear stress*. J Clin Invest, 1999. **103**(8): p. 1141-50.

678. Mayanagi, T., et al., *Glucocorticoid receptor-mediated expression of caldesmon regulates cell migration via the reorganization of the actin cytoskeleton*. J Biol Chem, 2008. **283**(45): p. 31183-96.
679. Logie, J.J., et al., *Glucocorticoid-mediated inhibition of angiogenic changes in human endothelial cells is not caused by reductions in cell proliferation or migration*. PLoS One, 2010. **5**(12): p. e14476.
680. Moser, M., et al., *Glucocorticoids down-regulate dendritic cell function in vitro and in vivo*. Eur J Immunol, 1995. **25**(10): p. 2818-24.
681. 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.
682. 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.
683. 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.
684. 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.
685. Rutella, S., S. Danese, and G. Leone, *Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age*. Blood, 2006. **108**(5): p. 1435-40.
686. 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.
687. 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.
688. 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.
689. 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.
690. Cupps, T.R., et al., *Multiple mechanisms of B cell immunoregulation in man after administration of in vivo corticosteroids*. J Immunol, 1984. **132**(1): p. 170-5.
691. Cupps, T.R., et al., *Effects of in vitro corticosteroids on B cell activation, proliferation, and differentiation*. J Clin Invest, 1985. **75**(2): p. 754-61.
692. Pazirandeh, A., et al., *Paracrine glucocorticoid activity produced by mouse thymic epithelial cells*. FASEB J, 1999. **13**(8): p. 893-901.
693. Vacchio, M.S., V. Papadopoulos, and J.D. Ashwell, *Steroid production in the thymus: implications for thymocyte selection*. J Exp Med, 1994. **179**(6): p. 1835-46.
694. Purton, J.F., et al., *Intrathymic T cell development and selection proceeds normally in the absence of glucocorticoid receptor signaling*. Immunity, 2000. **13**(2): p. 179-86.
695. Brewer, J.A., et al., *Thymocyte apoptosis induced by T cell activation is mediated by glucocorticoids in vivo*. J Immunol, 2002. **169**(4): p. 1837-43.
696. Stephens, G.L., J.D. Ashwell, and L. Ignatowicz, *Mutually antagonistic signals regulate selection of the T cell repertoire*. Int Immunol, 2003. **15**(5): p. 623-32.
697. Vacchio, M.S., J.Y. Lee, and J.D. Ashwell, *Thymus-derived glucocorticoids set the thresholds for thymocyte selection by inhibiting TCR-mediated thymocyte activation*. J Immunol, 1999. **163**(3): p. 1327-33.
698. Lowenberg, M., et al., *Rapid immunosuppressive effects of glucocorticoids mediated through Lck and Fyn*. Blood, 2005. **106**(5): p. 1703-10.
699. 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.

700. 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.
701. 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.
702. 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.
703. Kang, Y., et al., *Cutting edge: Immunosuppressant as adjuvant for tolerogenic immunization*. *J Immunol*, 2008. **180**(8): p. 5172-6.
704. Maibach, H.I. and R.C. Wester, *Issues in measuring percutaneous absorption of topical corticosteroids*. *Int J Dermatol*, 1992. **31 Suppl 1**: p. 21-5.
705. Kyriazopoulou, V., *Glucocorticoid replacement therapy in patients with Addison's disease*. *Expert Opin Pharmacother*, 2007. **8**(6): p. 725-9.
706. O'Shea, T.M., et al., *Randomized placebo-controlled trial of a 42-day tapering course of dexamethasone to reduce the duration of ventilator dependency in very low birth weight infants: outcome of study participants at 1-year adjusted age*. *Pediatrics*, 1999. **104**(1 Pt 1): p. 15-21.
707. Yeh, T.F., et al., *Early dexamethasone therapy in preterm infants: a follow-up study*. *Pediatrics*, 1998. **101**(5): p. E7.
708. Garland, J.S., et al., *A three-day course of dexamethasone therapy to prevent chronic lung disease in ventilated neonates: a randomized trial*. *Pediatrics*, 1999. **104**(1 Pt 1): p. 91-9.
709. Gordon, P., et al., *Early postnatal dexamethasone increases the risk of focal small bowel perforation in extremely low birth weight infants*. *J Perinatol*, 1999. **19**(8 Pt 1): p. 573-7.
710. Gordon, P.V., W.A. Price, and A.D. Stiles, *Dexamethasone administration to newborn mice alters mucosal and muscular morphology in the ileum and modulates IGF-I localization*. *Pediatr Res*, 2001. **49**(1): p. 93-100.
711. Gordon, P.V., et al., *The clinical, morphologic, and molecular changes in the ileum associated with early postnatal dexamethasone administration: from the baby's bowel to the researcher's bench*. *Mol Genet Metab*, 2001. **72**(2): p. 91-103.
712. Annane, D., et al., *Impaired pressor sensitivity to noradrenaline in septic shock patients with and without impaired adrenal function reserve*. *Br J Clin Pharmacol*, 1998. **46**(6): p. 589-97.
713. Bellissant, E. and D. Annane, *Effect of hydrocortisone on phenylephrine--mean arterial pressure dose-response relationship in septic shock*. *Clin Pharmacol Ther*, 2000. **68**(3): p. 293-303.
714. Marchant, A., et al., *Methylprednisolone differentially regulates IL-10 and tumour necrosis factor (TNF) production during murine endotoxaemia*. *Clin Exp Immunol*, 1996. **106**(1): p. 91-6.
715. Batuman, O.A., et al., *Differential regulation of transforming growth factor beta-1 gene expression by glucocorticoids in human T and glial cells*. *J Immunol*, 1995. **155**(9): p. 4397-405.
716. Bailey, J.M., et al., *Corticosteroids suppress cyclooxygenase messenger RNA levels and prostanoid synthesis in cultured vascular cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1988. **157**(3): p. 1159-63.
717. Zaitsu, M., et al., *A novel pharmacologic action of glucocorticosteroids on leukotriene C4 catabolism*. *J Allergy Clin Immunol*, 2001. **108**(1): p. 122-4.
718. Han, S.J., et al., *Glucocorticoids prevent NF-kappaB activation by inhibiting the early release of platelet-activating factor in response to lipopolysaccharide*. *Eur J Immunol*, 1999. **29**(4): p. 1334-41.
719. Szeffler, S.J., et al., *IFN-gamma and LPS overcome glucocorticoid inhibition of priming for superoxide release in human monocytes. Evidence that secretion of IL-1 and tumor necrosis factor-alpha is not essential for monocyte priming*. *J Immunol*, 1989. **142**(11): p. 3985-92.
720. Di Rosa, M., et al., *Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase in macrophages*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990. **172**(3): p. 1246-52.
721. McCall, T.B., R.M. Palmer, and S. Moncada, *Induction of nitric oxide synthase in rat peritoneal neutrophils and its inhibition by dexamethasone*. *Eur J Immunol*, 1991. **21**(10): p. 2523-7.
722. Ayala, A., et al., *The induction of accelerated thymic programmed cell death during polymicrobial sepsis: control by corticosteroids but not tumor necrosis factor*. *Shock*, 1995. **3**(4): p. 259-67.

723. Szabo, C., et al., *Attenuation of the induction of nitric oxide synthase by endogenous glucocorticoids accounts for endotoxin tolerance in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(1): p. 271-5.
724. Paya, D., et al., *Effect of dexamethasone on the onset and persistence of vascular hyporeactivity induced by E. coli lipopolysaccharide in rats*. Circ Shock, 1993. **41**(2): p. 103-12.
725. McKee, J.I. and W.E. Finlay, *Cortisol replacement in severely stressed patients*. Lancet, 1983. **1**(8322): p. 484.
726. 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.
727. 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.
728. 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.
729. 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.
730. 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.
731. Lee, R.W., et al., *Steroid refractory CD4+ T cells in patients with sight-threatening uveitis*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009. **50**(9): p. 4273-8.
732. 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.
733. Manz, M., et al., *Therapy of steroid-resistant inflammatory bowel disease*. Digestion, 2012. **86 Suppl 1**: p. 11-5.
734. Kuenzig, M.E., et al., *Budesonide for maintenance of remission in Crohn's disease*. Cochrane Database Syst Rev, 2014. **8**: p. CD002913.
735. Steinhart, A.H., et al., *Corticosteroids for maintenance of remission in Crohn's disease*. Cochrane Database Syst Rev, 2003(4): p. CD000301.
736. Benchimol, E.I., et al., *Budesonide for maintenance of remission in Crohn's disease*. Cochrane Database Syst Rev, 2009(1): p. CD002913.
737. Schoon, E.J., *Budesonide: a useful tool in the maintenance treatment of Crohn's disease?* Neth J Med, 2007. **65**(9): p. 316-7.
738. 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.
739. Gonvers, J.J., et al., *Maintenance of remission in Crohn's disease*. Digestion, 2005. **71**(1): p. 41-8.
740. 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.
741. Yang, Y.X. and G.R. Lichtenstein, *Corticosteroids in Crohn's disease*. Am J Gastroenterol, 2002. **97**(4): p. 803-23.
742. Hofer, K.N., *Oral budesonide in the management of Crohn's disease*. Ann Pharmacother, 2003. **37**(10): p. 1457-64.
743. Lubach, D., J. Rath, and M. Kietzmann, *Skin atrophy induced by initial continuous topical application of clobetasol followed by intermittent application*. Dermatology, 1995. **190**(1): p. 51-5.
744. Autio, P., et al., *Effects of an inhaled steroid (budesonide) on skin collagen synthesis of asthma patients in vivo*. Am J Respir Crit Care Med, 1996. **153**(3): p. 1172-5.
745. Dennler, S., et al., *Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene*. EMBO J, 1998. **17**(11): p. 3091-100.
746. Frank, S., M. Madlener, and S. Werner, *Transforming growth factors beta1, beta2, and beta3 and their receptors are differentially regulated during normal and impaired wound healing*. J Biol Chem, 1996. **271**(17): p. 10188-93.

747. Perez, P., et al., *Altered skin development and impaired proliferative and inflammatory responses in transgenic mice overexpressing the glucocorticoid receptor*. *FASEB J*, 2001. **15**(11): p. 2030-2.
748. Beer, H.D., R. Fassler, and S. Werner, *Glucocorticoid-regulated gene expression during cutaneous wound repair*. *Vitam Horm*, 2000. **59**: p. 217-39.
749. Gras, M.P., et al., *Downregulation of human type VII collagen (COL7A1) promoter activity by dexamethasone. Identification of a glucocorticoid receptor binding region*. *Exp Dermatol*, 2001. **10**(1): p. 28-34.
750. LaPier, T.K., *Glucocorticoid-induced muscle atrophy. The role of exercise in treatment and prevention*. *J Cardiopulm Rehabil*, 1997. **17**(2): p. 76-84.
751. 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.
752. 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.
753. Ohnaka, K., et al., *Glucocorticoid suppresses the canonical Wnt signal in cultured human osteoblasts*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **329**(1): p. 177-81.
754. Smith, E. and B. Frenkel, *Glucocorticoids inhibit the transcriptional activity of LEF/TCF in differentiating osteoblasts in a glycogen synthase kinase-3beta-dependent and -independent manner*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(3): p. 2388-94.
755. Glass, D.A., 2nd, et al., *Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation*. *Dev Cell*, 2005. **8**(5): p. 751-64.
756. Holmen, S.L., et al., *Essential role of beta-catenin in postnatal bone acquisition*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(22): p. 21162-8.
757. Canalis, E., et al., *Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiology and therapy*. *Osteoporos Int*, 2007. **18**(10): p. 1319-28.
758. Brown, E.S., D.A. Khan, and V.A. Nejtck, *The psychiatric side effects of corticosteroids*. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 1999. **83**(6 Pt 1): p. 495-503; quiz 503-4.
759. Carpenter, W.T., Jr. and P.H. Gruen, *Cortisol's effects on human mental functioning*. *J Clin Psychopharmacol*, 1982. **2**(2): p. 91-101.
760. Wissink, S., et al., *Regulation of the rat serotonin-1A receptor gene by corticosteroids*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(2): p. 1321-6.
761. Richardson, C.T., *Pathogenetic factors in peptic ulcer disease*. *Am J Med*, 1985. **79**(2C): p. 1-7.
762. Hu, X., et al., *Dexamethasone alters epithelium proliferation and survival and suppresses Wnt/beta-catenin signaling in developing cleft palate*. *Food Chem Toxicol*, 2013. **56**: p. 67-74.
763. Jacobson, P.B., et al., *Hepatic glucocorticoid receptor antagonism is sufficient to reduce elevated hepatic glucose output and improve glucose control in animal models of type 2 diabetes*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005. **314**(1): p. 191-200.
764. Barnes, P.J., *How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005*. *Br J Pharmacol*, 2006. **148**(3): p. 245-54.
765. Macfarlane, D.P., S. Forbes, and B.R. Walker, *Glucocorticoids and fatty acid metabolism in humans: fuelling fat redistribution in the metabolic syndrome*. *J Endocrinol*, 2008. **197**(2): p. 189-204.
766. Reichardt, H.M., et al., *DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival*. *Cell*, 1998. **93**(4): p. 531-41.
767. Robertson, S., et al., *Abrogation of glucocorticoid receptor dimerization correlates with dissociated glucocorticoid behavior of compound a*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(11): p. 8061-75.
768. Schacke, H., et al., *Dissociation of transactivation from transrepression by a selective glucocorticoid receptor agonist leads to separation of therapeutic effects from side effects*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(1): p. 227-32.
769. Swart, P., et al., *Biological activities of the shrub *Salsola tuberculatifomis* Botsch.: contraceptive or stress alleviator?* *Bioessays*, 2003. **25**(6): p. 612-9.



770. Miner, J.N., M.H. Hong, and A. Negro-Vilar, *New and improved glucocorticoid receptor ligands*. *Expert Opin Investig Drugs*, 2005. **14**(12): p. 1527-45.
771. Schacke, H., et al., *Selective glucocorticoid receptor agonists (SEGRAs): novel ligands with an improved therapeutic index*. *Mol Cell Endocrinol*, 2007. **275**(1-2): p. 109-17.
772. Lopez, F.J., et al., *LGD-5552, an antiinflammatory glucocorticoid receptor ligand with reduced side effects, in vivo*. *Endocrinology*, 2008. **149**(5): p. 2080-9.
773. Owen, H.C., et al., *The growth plate sparing effects of the selective glucocorticoid receptor modulator, AL-438*. *Mol Cell Endocrinol*, 2007. **264**(1-2): p. 164-70.
774. Vollmer, T.R., A. Stockhausen, and J.Z. Zhang, *Anti-inflammatory effects of mapracorat, a novel selective glucocorticoid receptor agonist, is partially mediated by MAP kinase phosphatase-1 (MKP-1)*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(42): p. 35212-21.
775. De Bosscher, K., et al., *A fully dissociated compound of plant origin for inflammatory gene repression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(44): p. 15827-32.
776. Dewint, P., et al., *A plant-derived ligand favoring monomeric glucocorticoid receptor conformation with impaired transactivation potential attenuates collagen-induced arthritis*. *J Immunol*, 2008. **180**(4): p. 2608-15.
777. Yemelyanov, A., et al., *Novel steroid receptor phyto-modulator compound a inhibits growth and survival of prostate cancer cells*. *Cancer Res*, 2008. **68**(12): p. 4763-73.
778. Gossye, V., et al., *A plant-derived glucocorticoid receptor modulator attenuates inflammation without provoking ligand-induced resistance*. *Ann Rheum Dis*, 2010. **69**(1): p. 291-6.
779. Wust, S., et al., *Therapeutic and adverse effects of a non-steroidal glucocorticoid receptor ligand in a mouse model of multiple sclerosis*. *PLoS One*, 2009. **4**(12): p. e8202.
780. Zhang, Z., Z.Y. Zhang, and H.J. Schluesener, *Compound A, a plant origin ligand of glucocorticoid receptors, increases regulatory T cells and M2 macrophages to attenuate experimental autoimmune neuritis with reduced side effects*. *J Immunol*, 2009. **183**(5): p. 3081-91.
781. van Loo, G., et al., *Antiinflammatory properties of a plant-derived nonsteroidal, dissociated glucocorticoid receptor modulator in experimental autoimmune encephalomyelitis*. *Mol Endocrinol*, 2010. **24**(2): p. 310-22.
782. Suzuki, K., et al., *Effects of crowding and heat stress on intestinal flora, body weight gain, and feed efficiency of growing rats and chicks*. *Nihon Juigaku Zasshi*, 1983. **45**(3): p. 331-8.
783. Bradesi, S., et al., *Repeated exposure to water avoidance stress in rats: a new model for sustained visceral hyperalgesia*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2005. **289**(1): p. G42-53.
784. Ait-Belgnaoui, A., et al., *Acute stress-induced hypersensitivity to colonic distension depends upon increase in paracellular permeability: role of myosin light chain kinase*. *Pain*, 2005. **113**(1-2): p. 141-7.
785. Mazzon, E. and S. Cuzzocrea, *Role of TNF-alpha in ileum tight junction alteration in mouse model of restraint stress*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008. **294**(5): p. G1268-80.
786. Matsuo, K., et al., *Acute stress-induced colonic tissue HSP70 expression requires commensal bacterial components and intrinsic glucocorticoid*. *Brain Behav Immun*, 2009. **23**(1): p. 108-15.
787. 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.
788. 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.
789. 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.
790. 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.
791. 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.

792. Turnbull, A.V. and C. Rivier, *Corticotropin-releasing factor (CRF) and endocrine responses to stress: CRF receptors, binding protein, and related peptides*. Proc Soc Exp Biol Med, 1997. **215**(1): p. 1-10.
793. 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.
794. Sandle, G.I. and H.J. Binder, *Corticosteroids and intestinal ion transport*. Gastroenterology, 1987. **93**(1): p. 188-96.
795. 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.
796. 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.
797. 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.
798. 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.
799. Finnie, I.A., et al., *Stimulation of colonic mucin synthesis by corticosteroids and nicotine*. Clin Sci (Lond), 1996. **91**(3): p. 359-64.
800. 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.
801. 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.
802. 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.
803. 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.
804. Kakuno, Y., M. Honda, and K. Takakura, *[Colonization types of Escherichia coli in experimental urinary tract infection in compromised mice treated with hydrocortisone]*. Kansenshogaku Zasshi, 1997. **71**(7): p. 652-8.
805. Hostettler, N., et al., *Local glucocorticoid production in the mouse lung is induced by immune cell stimulation*. Allergy, 2012. **67**(2): p. 227-34.
806. Gomez-Sanchez, E.P., et al., *Aldosterone synthesis in the brain contributes to Dahl salt-sensitive rat hypertension*. Exp Physiol, 2010. **95**(1): p. 120-30.
807. Ohtani, T., et al., *Elevated cardiac tissue level of aldosterone and mineralocorticoid receptor in diastolic heart failure: Beneficial effects of mineralocorticoid receptor blocker*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007. **292**(2): p. R946-54.
808. Croft, A.P., et al., *Effects of minor laboratory procedures, adrenalectomy, social defeat or acute alcohol on regional brain concentrations of corticosterone*. Brain Res, 2008. **1238**: p. 12-22.
809. Taves, M.D., et al., *Steroid concentrations in plasma, whole blood and brain: effects of saline perfusion to remove blood contamination from brain*. PLoS One, 2010. **5**(12): p. e15727.
810. Slominski, A., et al., *A novel pathway for sequential transformation of 7-dehydrocholesterol and expression of the P450scc system in mammalian skin*. Eur J Biochem, 2004. **271**(21): p. 4178-88.
811. Cirillo, N. and S.S. Prime, *Keratinocytes synthesize and activate cortisol*. J Cell Biochem, 2011. **112**(6): p. 1499-505.
812. 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.
813. Zmijewski, M.A. and A.T. Slominski, *Neuroendocrinology of the skin: An overview and selective analysis*. Dermatoendocrinol, 2011. **3**(1): p. 3-10.

814. 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.
815. 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.
816. Cima, I., et al., *Intestinal epithelial cells synthesize glucocorticoids and regulate T cell activation*. J Exp Med, 2004. **200**(12): p. 1635-46.
817. Noti, M., et al., *Lipopolysaccharide induces intestinal glucocorticoid synthesis in a TNFalpha-dependent manner*. FASEB J, 2010. **24**(5): p. 1340-6.
818. Noti, M., et al., *TNF suppresses acute intestinal inflammation by inducing local glucocorticoid synthesis*. J Exp Med, 2010. **207**(5): p. 1057-66.
819. 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.
820. 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.
821. Mueller, M., et al., *Differential regulation of glucocorticoid synthesis in murine intestinal epithelial versus adrenocortical cell lines*. Endocrinology, 2007. **148**(3): p. 1445-53.
822. Val, P., et al., *SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues*. Nucl Recept, 2003. **1**(1): p. 8.
823. 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.
824. Brunner, T., et al., *Regulation of cell death and survival in intestinal intraepithelial lymphocytes*. Cell Death Differ, 2001. **8**(7): p. 706-14.
825. 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.
826. 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.
827. 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.
828. Bouguen, G., et al., *Intestinal steroidogenesis*. Steroids, 2015.
829. Sidler, D., et al., *Colon cancer cells produce immunoregulatory glucocorticoids*. Oncogene, 2011. **30**(21): p. 2411-9.
830. Kim, I., et al., *Dexamethasone 21-sulfate improves the therapeutic properties of dexamethasone against experimental rat colitis by specifically delivering the steroid to the large intestine*. Pharm Res, 2009. **26**(2): p. 415-21.
831. Crcarevska, M.S., et al., *Bioefficacy of budesonide loaded crosslinked polyelectrolyte microparticles in rat model of induced colitis*. J Drug Target, 2009. **17**(10): p. 788-802.
832. Ali, H., et al., *Budesonide loaded nanoparticles with pH-sensitive coating for improved mucosal targeting in mouse models of inflammatory bowel diseases*. J Control Release, 2014. **183**: p. 167-77.
833. Hirano, D. and S. Kudo, *Usefulness of CD4+CD45RBhigh CD25- cell-transferred SCID mice for preclinical evaluation of drugs for inflammatory bowel disease*. J Pharmacol Sci, 2009. **110**(2): p. 169-81.
834. 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.
835. Graffner-Nordberg, M., et al., *Design and synthesis of dihydrofolate reductase inhibitors encompassing a bridging ester group. Evaluation in a mouse colitis model*. J Med Chem, 2003. **46**(16): p. 3455-62.
836. Marrero, J.A., et al., *Dextran sulfate sodium-induced murine colitis activates NF-kappaB and increases galanin-1 receptor expression*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2000. **278**(5): p. G797-804.

837. 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.
838. 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.
839. Cauwels, A. and P. Brouckaert, *Nitrite regulation of shock*. *Cardiovasc Res*, 2011. **89**(3): p. 553-9.
840. Salomao, R., et al., *Bacterial sensing, cell signaling, and modulation of the immune response during sepsis*. *Shock*, 2012. **38**(3): p. 227-42.
841. Galon, J., et al., *Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells*. *FASEB J*, 2002. **16**(1): p. 61-71.
842. Novick, D., et al., *Interleukin-18, more than a Th1 cytokine*. *Semin Immunol*, 2013. **25**(6): p. 439-48.
843. Koboziev, I., et al., *Pharmacological intervention studies using mouse models of the inflammatory bowel diseases: translating preclinical data into new drug therapies*. *Inflamm Bowel Dis*, 2011. **17**(5): p. 1229-45.
844. Krausova, M. and V. Korinek, *Wnt signaling in adult intestinal stem cells and cancer*. *Cell Signal*, 2014. **26**(3): p. 570-9.
845. Guanabens, N., L. Gifre, and P. Peris, *The role of Wnt signaling and sclerostin in the pathogenesis of glucocorticoid-induced osteoporosis*. *Curr Osteoporos Rep*, 2014. **12**(1): p. 90-7.
846. Li, X.C., A.M. Jevnikar, and D.R. Grant, *Expression of functional ICAM-1 and VCAM-1 adhesion molecules by an immortalized epithelial cell clone derived from the small intestine*. *Cell Immunol*, 1997. **175**(1): p. 58-66.
847. Martinez-Moya, P., et al., *Exogenous alkaline phosphatase treatment complements endogenous enzyme protection in colonic inflammation and reduces bacterial translocation in rats*. *Pharmacol Res*, 2012. **66**(2): p. 144-53.
848. Chaniotou, Z., et al., *Corticotropin-releasing factor regulates TLR4 expression in the colon and protects mice from colitis*. *Gastroenterology*, 2010. **139**(6): p. 2083-92.
849. Beloqui, A., et al., *Budesonide-loaded nanostructured lipid carriers reduce inflammation in murine DSS-induced colitis*. *Int J Pharm*, 2013. **454**(2): p. 775-83.
850. Lozano-Perez, A.A., et al., *Silk fibroin nanoparticles constitute a vector for controlled release of resveratrol in an experimental model of inflammatory bowel disease in rats*. *Int J Nanomedicine*, 2014. **9**: p. 4507-20.
851. Kremer, B., et al., *Temporal colonic gene expression profiling in the recurrent colitis model identifies early and chronic inflammatory processes*. *PLoS One*, 2012. **7**(11): p. e50388.
852. Drucker, D.J., et al., *Induction of intestinal epithelial proliferation by glucagon-like peptide 2*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(15): p. 7911-6.
853. Drucker, D.J., *Glucagon-like peptides: regulators of cell proliferation, differentiation, and apoptosis*. *Mol Endocrinol*, 2003. **17**(2): p. 161-71.
854. L'Heureux, M.C. and P.L. Brubaker, *Glucagon-like peptide-2 and common therapeutics in a murine model of ulcerative colitis*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003. **306**(1): p. 347-54.
855. Kojouharoff, G., et al., *Neutralization of tumour necrosis factor (TNF) but not of IL-1 reduces inflammation in chronic dextran sulphate sodium-induced colitis in mice*. *Clin Exp Immunol*, 1997. **107**(2): p. 353-8.
856. Rochette, L., et al., *Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: possible therapeutic targets?* *Pharmacol Ther*, 2013. **140**(3): p. 239-57.
857. Bereshchenko, O., et al., *GILZ promotes production of peripherally induced Treg cells and mediates the crosstalk between glucocorticoids and TGF-beta signaling*. *Cell Rep*, 2014. **7**(2): p. 464-75.
858. Calmette, J., et al., *Glucocorticoid-induced leucine zipper enhanced expression in dendritic cells is sufficient to drive regulatory T cells expansion in vivo*. *J Immunol*, 2014. **193**(12): p. 5863-72.

859. Deitch, E.A., *Bacterial translocation or lymphatic drainage of toxic products from the gut: what is important in human beings?* Surgery, 2002. **131**(3): p. 241-4.
860. Moore, F.A., et al., *Gut bacterial translocation via the portal vein: a clinical perspective with major torso trauma.* J Trauma, 1991. **31**(5): p. 629-36; discussion 636-8.
861. Swank, G.M. and E.A. Deitch, *Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes.* World J Surg, 1996. **20**(4): p. 411-7.
862. Mainous, M.R., et al., *Studies of the route, magnitude, and time course of bacterial translocation in a model of systemic inflammation.* Arch Surg, 1991. **126**(1): p. 33-7.
863. Tschoeke, S.K., A. Oberholzer, and L.L. Moldawer, *Interleukin-18: a novel prognostic cytokine in bacteria-induced sepsis.* Crit Care Med, 2006. **34**(4): p. 1225-33.
864. Souza, D.G., et al., *The essential role of the intestinal microbiota in facilitating acute inflammatory responses.* J Immunol, 2004. **173**(6): p. 4137-46.
865. Huang, S.P., et al., *Interleukin-6 increases vascular endothelial growth factor and angiogenesis in gastric carcinoma.* J Biomed Sci, 2004. **11**(4): p. 517-27.
866. Kazanskaya, O., et al., *The Wnt signaling regulator R-spondin 3 promotes angioblast and vascular development.* Development, 2008. **135**(22): p. 3655-64.
867. Hong, C.H., et al., *STAT3-dependent VEGF production from keratinocytes abrogates dendritic cell activation and migration by arsenic: a plausible regional mechanism of immunosuppression in arsenical cancers.* Chem Biol Interact, 2015. **227**: p. 96-103.
868. Nauck, M., et al., *Induction of vascular endothelial growth factor by platelet-activating factor and platelet-derived growth factor is downregulated by corticosteroids.* Am J Respir Cell Mol Biol, 1997. **16**(4): p. 398-406.
869. Fang, K., et al., *Temporal genomewide expression profiling of DSS colitis reveals novel inflammatory and angiogenesis genes similar to ulcerative colitis.* Physiol Genomics, 2011. **43**(1): p. 43-56.
870. Chidlow, J.H., Jr., et al., *Differential angiogenic regulation of experimental colitis.* Am J Pathol, 2006. **169**(6): p. 2014-30.
871. Danese, S., *Inflammation and the mucosal microcirculation in inflammatory bowel disease: the ebb and flow.* Curr Opin Gastroenterol, 2007. **23**(4): p. 384-9.
872. Tolstanova, G., et al., *Role of anti-angiogenic factor endostatin in the pathogenesis of experimental ulcerative colitis.* Life Sci, 2011. **88**(1-2): p. 74-81.
873. Qualls, J.E., et al., *Suppression of experimental colitis in mice by CD11c+ dendritic cells.* Inflamm Bowel Dis, 2009. **15**(2): p. 236-47.
874. Qualls, J.E., et al., *Suppression of experimental colitis by intestinal mononuclear phagocytes.* J Leukoc Biol, 2006. **80**(4): p. 802-15.
875. Huang, E.Y., et al., *Using corticosteroids to reshape the gut microbiome: implications for inflammatory bowel diseases.* Inflamm Bowel Dis, 2015. **21**(5): p. 963-72.
876. Ellis, M., *Preventing microbial translocation in haematological malignancy.* Br J Haematol, 2004. **125**(3): p. 282-93.
877. Prager, M., et al., *The JAK2 variant rs10758669 in Crohn's disease: altering the intestinal barrier as one mechanism of action.* Int J Colorectal Dis, 2012. **27**(5): p. 565-73.
878. Polgar, N., et al., *Investigation of JAK2, STAT3 and CCR6 polymorphisms and their gene-gene interactions in inflammatory bowel disease.* Int J Immunogenet, 2012. **39**(3): p. 247-52.
879. Mathew, C.G., *New links to the pathogenesis of Crohn disease provided by genome-wide association scans.* Nat Rev Genet, 2008. **9**(1): p. 9-14.
880. Leung, J.M., et al., *IL-22-producing CD4+ cells are depleted in actively inflamed colitis tissue.* Mucosal Immunol, 2014. **7**(1): p. 124-33.
881. Hanson, M.L., et al., *Oral delivery of IL-27 recombinant bacteria attenuates immune colitis in mice.* Gastroenterology, 2014. **146**(1): p. 210-221 e13.
882. Ahlfors, H., et al., *IL-22 fate reporter reveals origin and control of IL-22 production in homeostasis and infection.* J Immunol, 2014. **193**(9): p. 4602-13.

883. Guo, X., et al., *Induction of innate lymphoid cell-derived interleukin-22 by the transcription factor STAT3 mediates protection against intestinal infection*. *Immunity*, 2014. **40**(1): p. 25-39.
884. O'Connor, W., Jr., et al., *A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation*. *Nat Immunol*, 2009. **10**(6): p. 603-9.
885. Brenchley, J.M., et al., *Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection*. *Nat Med*, 2006. **12**(12): p. 1365-71.
886. Sankaran, S., et al., *Rapid onset of intestinal epithelial barrier dysfunction in primary human immunodeficiency virus infection is driven by an imbalance between immune response and mucosal repair and regeneration*. *J Virol*, 2008. **82**(1): p. 538-45.
887. Ramesh, R., et al., *Pro-inflammatory human Th17 cells selectively express P-glycoprotein and are refractory to glucocorticoids*. *J Exp Med*, 2014. **211**(1): p. 89-104.
888. Wang, Y., et al., *Protective role of tumor necrosis factor (TNF) receptors in chronic intestinal inflammation: TNFR1 ablation boosts systemic inflammatory response*. *Lab Invest*, 2013. **93**(9): p. 1024-35.
889. Naito, Y., et al., *Enhanced intestinal inflammation induced by dextran sulfate sodium in tumor necrosis factor-alpha deficient mice*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2003. **18**(5): p. 560-9.
890. Vandenbroucke, K., et al., *Orally administered L. lactis secreting an anti-TNF Nanobody demonstrate efficacy in chronic colitis*. *Mucosal Immunol*, 2010. **3**(1): p. 49-56.
891. Obermeier, F., et al., *Interferon-gamma (IFN-gamma)- and tumour necrosis factor (TNF)-induced nitric oxide as toxic effector molecule in chronic dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice*. *Clin Exp Immunol*, 1999. **116**(2): p. 238-45.
892. 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.
893. Santaolalla, R., et al., *TLR4 activates the beta-catenin pathway to cause intestinal neoplasia*. *PLoS One*, 2013. **8**(5): p. e63298.
894. Hernandez, Y., et al., *The role of prostaglandin E2 (PGE 2) in toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated colitis-associated neoplasia*. *BMC Gastroenterol*, 2010. **10**: p. 82.
895. Albert, E.J. and J.S. Marshall, *Aging in the absence of TLR2 is associated with reduced IFN-gamma responses in the large intestine and increased severity of induced colitis*. *J Leukoc Biol*, 2008. **83**(4): p. 833-42.
896. Clevers, H., K.M. Loh, and R. Nusse, *Stem cell signaling. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control*. *Science*, 2014. **346**(6205): p. 1248012.
897. Koch, S. and A. Nusrat, *The life and death of epithelia during inflammation: lessons learned from the gut*. *Annu Rev Pathol*, 2012. **7**: p. 35-60.
898. Koch, S., et al., *Dkk-1 inhibits intestinal epithelial cell migration by attenuating directional polarization of leading edge cells*. *Mol Biol Cell*, 2009. **20**(22): p. 4816-25.
899. Vetuschi, A., et al., *Increased proliferation and apoptosis of colonic epithelial cells in dextran sulfate sodium-induced colitis in rats*. *Dig Dis Sci*, 2002. **47**(7): p. 1447-57.
900. Wang, F., et al., *Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression*. *Am J Pathol*, 2005. **166**(2): p. 409-19.
901. Graham, W.V., et al., *Tumor necrosis factor-induced long myosin light chain kinase transcription is regulated by differentiation-dependent signaling events. Characterization of the human long myosin light chain kinase promoter*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(36): p. 26205-15.
902. Al-Sadi, R., et al., *Mechanism of IL-1beta-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability*. *J Immunol*, 2008. **180**(8): p. 5653-61.
903. 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.

904. Romero, I.A., et al., *Changes in cytoskeletal and tight junctional proteins correlate with decreased permeability induced by dexamethasone in cultured rat brain endothelial cells*. Neuroscience Letters, 2003. **344**(2): p. 112-116.
905. Sprung, C.L., et al., *Glucocorticoids in sepsis: dissecting facts from fiction*. Crit Care, 2011. **15**(5): p. 446.
906. van den Akker, E.L., et al., *Glucocorticoid receptor mRNA levels are selectively decreased in neutrophils of children with sepsis*. Intensive Care Med, 2009. **35**(7): p. 1247-54.
907. Duma, D., J.E. Silva-Santos, and J. Assreuy, *Inhibition of glucocorticoid receptor binding by nitric oxide in endotoxemic rats*. Crit Care Med, 2004. **32**(11): p. 2304-10.
908. Evans, G.F. and S.H. Zuckerman, *Glucocorticoid-dependent and -independent mechanisms involved in lipopolysaccharide tolerance*. Eur J Immunol, 1991. **21**(9): p. 1973-9.
909. Goodwin, J.E., et al., *Loss of the endothelial glucocorticoid receptor prevents the therapeutic protection afforded by dexamethasone after LPS*. PLoS One, 2014. **9**(10): p. e108126.
910. Kleiman, A., et al., *Glucocorticoid receptor dimerization is required for survival in septic shock via suppression of interleukin-1 in macrophages*. FASEB J, 2012. **26**(2): p. 722-9.
911. Chinenov, Y., et al., *Role of transcriptional coregulator GRIP1 in the anti-inflammatory actions of glucocorticoids*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(29): p. 11776-81.
912. Antonucci, E., et al., *Glucocorticoid administration in sepsis and septic shock: time for a paradigm change?* Minerva Anestesiol, 2014. **80**(9): p. 1058-62.
913. Annane, D. and J.M. Cavillon, *Corticosteroids in sepsis: from bench to bedside?* Shock, 2003. **20**(3): p. 197-207.
914. Rearte, B., et al., *Differential effects of glucocorticoids in the establishment and maintenance of endotoxin tolerance*. Clin Exp Immunol, 2010. **159**(2): p. 208-16.
915. Rearte, B., et al., *Mifepristone (RU486) restores humoral and T cell-mediated immune response in endotoxin immunosuppressed mice*. Clin Exp Immunol, 2010. **162**(3): p. 568-77.
916. Cupps, T.R. and A.S. Fauci, *Corticosteroid-mediated immunoregulation in man*. Immunol Rev, 1982. **65**: p. 133-55.
917. Perretti, M. and F. D'Acquisto, *Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(1): p. 62-70.
918. Kaufman, D.B., et al., *Immunosuppression: practice and trends*. Am J Transplant, 2004. **4 Suppl 9**: p. 38-53.
919. Rutgeerts, P., *Medical therapy of inflammatory bowel disease*. Digestion, 1998. **59**(5): p. 453-69.
920. Lichtenstein, G.R., et al., *Oral budesonide for maintenance of remission of Crohn's disease: a pooled safety analysis*. Aliment Pharmacol Ther, 2009. **29**(6): p. 643-53.
921. Sandborn, W.J., et al., *Budesonide for maintenance of remission in patients with Crohn's disease in medically induced remission: a predetermined pooled analysis of four randomized, double-blind, placebo-controlled trials*. Am J Gastroenterol, 2005. **100**(8): p. 1780-7.
922. Simms, L. and A.H. Steinhart, *Budesonide for maintenance of remission in Crohn's disease*. Cochrane Database Syst Rev, 2001(1): p. CD002913.
923. Li, Y., et al., *The impact of bacterial DNA translocation on early postoperative outcomes in Crohn's patients undergoing abdominal surgery*. J Crohns Colitis, 2015. **9**(3): p. 259-65.
924. Gutierrez, A., et al., *Antimicrobial peptide response to blood translocation of bacterial DNA in Crohn's disease is affected by NOD2/CARD15 genotype*. Inflamm Bowel Dis, 2011. **17**(8): p. 1641-50.
925. Meconi, S., et al., *Adherent-invasive Escherichia coli isolated from Crohn's disease patients induce granulomas in vitro*. Cell Microbiol, 2007. **9**(5): p. 1252-61.
926. Balzan, S., et al., *Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact*. J Gastroenterol Hepatol, 2007. **22**(4): p. 464-71.
927. Porras, M., et al., *Correlation between cyclical epithelial barrier dysfunction and bacterial translocation in the relapses of intestinal inflammation*. Inflamm Bowel Dis, 2006. **12**(9): p. 843-52.

928. Asfaha, S., et al., *Persistent epithelial dysfunction and bacterial translocation after resolution of intestinal inflammation*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001. **281**(3): p. G635-44.
929. Tani, T., et al., *Bacterial translocation as a cause of septic shock in humans: a report of two cases*. *Surg Today*, 1997. **27**(5): p. 447-9.





# ABREVIATURAS



---

|                       |  |
|-----------------------|--|
| 11- $\beta$ -HSD 1/2: | 11- $\beta$ -hidroxiesteroide dehidrogenasa 1/2                |
| ACTH:                 | corticotropina   |
| AIEC:                 | adherent-invasive <i>E. Coli</i>                               |
| AIM2:                 | absent in melanoma 2   |
| AJ:                   | adherent junctions   |
| AMPC:                 | AMP cíclico  |
| ANOVA:                | análisis de varianza con un factor                             |
| AP:                   | fosfatasa alcalina   |
| APC:                  | célula presentadora de antígenos                               |
| AVP:                  | arginina vasopresina   |
| BAFF:                 | B-cell activating factor belonging to TNF family               |
| BAX:                  | bcl2-like protein 4  |
| BCL2:                 | B cell lymphoma 2  |
| BDNF:                 | brain derived neurotrophic factor                              |
| BIR:                  | baculovirus inhibitor repeat domain                            |
| BMDC:                 | bone marrow derived dendritic cell                             |
| BRG-1:                | brahma-related gene 1  |
| CARD:                 | caspase recruitment domain                                     |
| CBG:                  | corticoesteroide binding globulin                              |
| CBP:                  | acetylase CREB-binding protein                                 |
| CCL:                  | c-c motif ligand   |
| CCR9:                 | receptor de quimioquinas 9                                     |
| CK-1:                 | casein kinase 1  |
| CLD-2:                | claudina 2   |
| CLD-4:                | claudina 4   |
| CLD-5:                | claudina 5   |
| CLR:                  | c-type lectin receptors  |
| COX-2:                | ciclooxigenasa 2   |
| CpdA:                 | compuesto A  |
| CRC:                  | cáncer colorectal  |
| CRH:                  | hormona liberadora de corticotropina                           |
| CU:                   | colitis ulcerosa   |
| DAM:                  | damage associated molecular patterns                           |
| DBD:                  | DNA binding domain   |
| DC:                   | células dendríticas  |
| DD:                   | death domain   |
| DHEA:                 | deshidroepiandrosterona  |
| DMEM:                 | dulbeccos modified eagle's medium                              |
| DMSO:                 | dimetil sulfóxido  |
| DNA:                  | ácido desoxiribonucleico                                       |
| DSS:                  | dextrano sulfato sódico  |
| EC:                   | enfermedad de Crohn  |
| ECSIT:                | evolutionary conserved signaling intermediate in Toll pathways |
| EGF:                  | epidermal growth factor  |
| EGFR:                 | epithelial growth factor receptor                              |
| ELISA:                | enzimo inmunoensayo  |

|                |  |
|----------------|--|
| eNOS:          | óxido nítrico sintasa endotelial                 |
| FAE:           | epitelio asociado a folículo                     |
| FBS:           | fetal bovine serum                               |
| FSBP:          | perforación focal en el intestino delgado        |
| FZD :          | frizzled   |
| G-CSF:         | granulocyte colony stimulating factor            |
| G6Pasa:        | glucosa-6-fosfatasa                              |
| GALT:          | gut associated lymphoid tissue                   |
| GC:            | glucocorticoide                                  |
| GF:            | germ-free  |
| GH:            | growth hormone                                   |
| GILZ:          | glucocorticoid-induced leucine zipper            |
| GMCSF:         | granulocyte macrophage colony stimulating factor |
| GR:            | glucocorticoid receptor                          |
| GRE:           | glucocorticoid response element                  |
| GRIP1:         | glutamate receptor interacting protein 1         |
| GSK3 $\beta$ : | glycogen synthase kinase 3                       |
| GWAS:          | genome-wide-association study                    |
| HBSS:          | hank's balanced solution                         |
| HDCA3:         | hystone deacetylase                              |
| HHA:           | hipotálamo-hipofisario-adrenal                   |
| HP:            | haptoglobina                                     |
| HPRT:          | hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa     |
| HSC:           | células madre hematopoiéticas                    |
| HSP70:         | heat shock protein 70                            |
| HSP90:         | heat shock protein 90                            |
| IAP:           | fosfatasa alcalina intestinal                    |
| IBD:           | inflammatory bowel disease                       |
| ICAM:          | intracellular adhesion molecule                  |
| IEL:           | linfocitos intraepiteliales                      |
| IFN:           | interferon                                       |
| IGF-1:         | insuline growth factor 1                         |
| IKK:           | I $\kappa$ B kinase                              |
| IL1:           | interleuquina 1                                  |
| IL17A:         | interleuquina 17 A                               |
| IL18:          | interleuquina 18                                 |
| IL1R:          | IL1 receptor                                     |
| IL22:          | interleuquina 22                                 |
| IL27:          | interleuquina 27                                 |
| IL6:           | interleuquina 6                                  |
| ILC:           | innate lymphoid cells                            |
| ILF:           | isolated lymphoid follicles                      |
| iNOS:          | óxido nítrico sintasa inducible                  |
| IP:            | inmunophilin                                     |
| IRAK:          | IL1 receptor-associated kinase                   |
| IRF3/7:        | interferon regulatory transcription factor 3/7   |

---

|        |  |
|--------|--|
| IS:    | insuficiencia suprarrenal                                  |
| Isc:   | corriente de cortocircuito                                 |
| ISRE:  | interferon-stimulated response elements                    |
| JAK:   | janus kinase   |
| KGF:   | keratinocyte growth factor                                 |
| LAL:   | lymulus amebocyte lysate                                   |
| LBD:   | ligand binding domain                                      |
| LBP:   | LPS binding protein  |
| LFA-1: | lymphocyte function associated antigen 1                   |
| LGR5:  | leucine reach repeat containing G protein coupled receptor |
| LPL:   | linfocitos de lámina propia                                |
| LRH-1: | liver receptor homologue 1                                 |
| LRP:   | low-density lipoprotein receptor-related protein 6         |
| LTC4:  | leucotrieno C4   |
| LYZ2:  | lisozima 2   |
| Mac-1: | macrophage antigen 1                                       |
| MAPKs: | mitogen-activated protein kinases                          |
| MAVS:  | mitochondrial-antiviral signaling protein                  |
| MC2R:  | melanocortina receptor 2                                   |
| MCP1:  | macrophage chemoattractant protein                         |
| MDP:   | muramildipéptido   |
| MEKK3: | mitogen activated protein kinase kinase 3                  |
| MIF:   | macrophage function inhibitory factor                      |
| MIP:   | macrophage inflammatory protein                            |
| MKP1:  | MAP kinase phosphatase 1                                   |
| MLC:   | myosin light chain   |
| MLCK:  | myosin light chain kinase                                  |
| MLN:   | ganglios mesentéricos                                      |
| MLN64: | metastatec lymph node 64                                   |
| MLNC:  | células de ganglios mesentéricos                           |
| MMP:   | matrix metalloproteases                                    |
| MPO:   | mieloperoxidasa  |
| MR:    | mineralocorticoid receptor                                 |
| MSC:   | células madre mesenquimales                                |
| MUC:   | mucina   |
| MyD88: | myeloid differentiation primary response 88                |
| Ncor:  | nuclear receptor repressor complex                         |
| NEMO:  | NF-kB essential modyfier                                   |
| NF-kB: | nuclear factor-kB  |
| NFAT:  | nuclear factor activated T cells                           |
| NK:    | natural killer   |
| NLR:   | nucleotide binding oligomerisation domain-like receptors   |
| NO:    | óxido nítrico  |
| PAF:   | factor de activación plaquetario                           |
| PAMP:  | patrón molecular asociado a patógenos                      |
| PAR2:  | protease activated receptor 2                              |

|            |  |
|------------|--|
| PCNA:      | antígeno nuclear de proliferación celular          |
| PCP:       | planar cell polarity                               |
| PDGF:      | platelet derived growth factor                     |
| PEPCK:     | fosfoenol piruvato carboxiquinasa                  |
| PGE2:      | prostaglandina E 2                                 |
| PGN:       | peptidoglicano                                     |
| PKC:       | protein kinase C                                   |
| PMA:       | forbol-12-myristate-13-acetate                     |
| POMC:      | proopiomelanocortina                               |
| PRR:       | pattern recognition receptor                       |
| PTH:       | paratohormona                                      |
| PYR:       | pyrin domain                                       |
| RA:        | ácido retinoico                                    |
| RAGE:      | receptor for advanced glycation end products       |
| RANTES:    | regulated on activation normal T cells as secreted |
| REG:       | regenerating islet-derived 3                       |
| RICK:      | receptor-interacting serine/threonine kinase       |
| RIP1:      | receptor interacting protein 1                     |
| RLR:       | retinoic acid induced-like receptors               |
| RNA:       | ácido ribonucleico                                 |
| RPMI:      | Roswell park medium                                |
| RSPO1:     | R-spondin 1  |
| RSPO3:     | R-spondin 3  |
| SF-1:      | steroidogenic factor 1                             |
| SFB:       | segmented filamentous bacteria                     |
| sFRP:      | secreted frizzled related protein                  |
| SGK1:      | serum/GC regulated kinase 1                        |
| sIgA:      | inmunoglobulina A secretora                        |
| siRNA:     | RNA pequeño de interferencia                       |
| SMRT:      | silencing mediator of retinoic acid receptor       |
| SNP:       | mutacions puntuales                                |
| SOCS3:     | silencing of cytokine signaling 3                  |
| STAR:      | steroidogenic acute regulatory protein             |
| STAT:      | signal transducer and activator of transcription   |
| SYK:       | spleen tyrosine kinase                             |
| TAB:       | TAK1 binding protein                               |
| TAK1:      | transforming growth factor activated kinase 1      |
| TBK1:      | TANK binding kinase 1                              |
| TCF:       | T cell factor                                      |
| TEER:      | resistencia transepitelial                         |
| TFF3:      | trefoil factor 3                                   |
| Tfh:       | T follicular helper                                |
| TGFβ:      | transforming growth factor β                       |
| TIRAP/MAL: | TIR-containing adaptor protein/MyD88-adaptor like  |
| TLR:       | toll-like receptor                                 |
| TNAP:      | fosfatasa alcalina no específica de tejido         |

|              |  |
|--------------|--|
| TNBS:        | ácido trinitrobencenosulfónico   |
| TNF:         | tumor necrosis factor  |
| TNFR:        | TNF receptor   |
| TRADD:       | TNFR1 associated death domain  |
| TRAF:        | TNF receptor associated factors  |
| TRAM/TICAM2: | TIR-domain containing adaptor molecule/TRIF-related adaptor protein 2      |
| Treg:        | células T reguladoras  |
|              | TIR-containing adaptor inducing IFN $\beta$ /TIR-domain-containing adaptor |
| TRIF/TICAM:  | molecule 1   |
| TSLP:        | thymic stromal lymphopoietin   |
| TTP:         | tristetraproline   |
| VCA-1:       | vascular cell adhesion 1   |
| VE-cadherin: | vascular-endothelial cadherin  |
| VLA-4:       | very late activation antigen 4   |
| WIF-1:       | Wnt inhibitory factor 1  |
| ZO-1:        | zonulae ocludens 1   |





# AGRADECIMIENTOS



