

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacología



miRNA-146a regula la interacción entre células epiteliales intestinales, microbiota y estímulos inflamatorios

Tesis doctoral para aspirar al grado de Doctor presentada por

Andrea Anzola Santander

Bajo la dirección de los Doctores:

Olga Martínez Augustin

Raquel González Pérez

Antonio Zarzuelo Zurita

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales

Autora: Andrea Anzola Santander

ISBN: 978-84-9125-990-9

URI: <http://hdl.handle.net/10481/44082>

Summary

1. INTRODUCTION

The intestinal homeostasis depends on the interaction between bacteria and the intestinal epithelium. This fact is clearly manifested in intestinal inflammatory diseases in which dysbiosis is known to play a pathogenic role (1). In addition, dysbiosis has been related to systemic diseases such as fatty-liver disease, obesity or diabetes (2,3). The current view indicates that the intestinal immune system and the microbiota maintain a collaborative alliance in which the microbiota modulates the immune system and, in turn, the latter tolerates microbiota and fights off invasive pathogenic bacteria (4). This partnership is possible to a great extent due to non-specific receptors in innate immune cells that recognize bacterial antigens. Among these receptors, TLRs are the best characterized, together with the retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptors and NLRs (5,6).

Intestinal epithelial cells (IECs) are considered components of the intestinal innate immune system that play a major role in the cross-talk with the microbiota and the development of tolerance. In fact, IECs express TLRs, but under homeostatic conditions expression is low, and the effects of their ligands are correspondingly attenuated (7). Nevertheless, under inflammatory conditions TLR expression is increased and contributes to inflammation and immune tolerance (8).

In the last few years microRNAs (miRNAs) have been shown to be involved in the regulation of the inflammatory response by microbiota-derived antigens. These small non-coding RNAs regulate gene expression and, as such, are involved in the pathogenesis of several diseases (9,10). A general mechanism of action of miRNAs involves the regulation of protein expression both at the transcriptional and translational level. Among the miRNAs associated to the inflammatory response and the microbiota, miR-146a is strongly induced by endotoxin through the stimulation of TLR4 in different cell types (11,12). Furthermore, it has been shown to participate in the regulation of the immune response limiting it to prevent its overstimulation (13–15). The response of miR-146a knockout mice to endotoxin has given proof of the negative feedback regulatory loop that controls pro-inflammatory signaling, as miR-146a knockout mice are hyperresponsive to lipopolysaccharide. Thus, miR-146a is considered a negative effector of the innate immune response (14). Although there are not many studies assessing the role of miR-146a in intestinal inflammation, a study indicated that miR-146a also protects against intestinal ischemia/reperfusion

injury (16). Nevertheless, late findings have introduced controversy regarding the role of miRNA-146a in the intestinal inflammation. A recent study indicates that knockout animals are resistant to DSS induced colitis, a chemical model in which the intestinal barrier function is disrupted.

The current explanation for this apparent contradiction is based on the ability of miR-146a to inhibit both inflammatory and intestinal barrier related genes (14). In this study we aimed to better understand the regulation of miR-146a in intestinal inflammation studying its expression in animal models of colitis, its role in intestinal inflammation and the maintenance of immune tolerance by IECs.

Characterization of the function of miR-146a in intestinal inflammation and tolerance will contribute to better understand these processes and their contribution to the pathogenesis of inflammatory diseases like inflammatory bowel disease and even of systemic diseases in which a role for intestinal microbiota has been suggested.

2. AIMS

Based on all the above, we proposed 5 main objectives in this doctoral thesis:

1. To determine changes in miRNA expression in human intestinal epithelial cells, depending on the stage of cell differentiation and inflammation.
2. To study miR-146a expression in three animal models of colitis, that differ in the involvement of the intestinal mucosal barrier and, accordingly, in the level of contact with the intestinal microbiota.
3. To study the effect of bacterial antigens and cytokines on the expression of miR-146a using IEC lines.
4. To confirm the hypothesis that miR-146a may contribute to prevent overstimulation of the immune response.
5. To study the effect of bacterial antigens and cytokines on the expression of miR-146a using organoids from mouse small intestine.

3. MATERIAL AND METHODS

To carry out these objectives, we used a wide variety of techniques, including cell and tissue culture and isolation techniques, real time PCR, microarray, histology techniques, shRNA gene silencing, Western Blot, overexpression of has-miR-146a-5p and ELISA as well as different experimental models of colitis (TNBS, DSS and lymphocyte transfer model). Differences among means were tested for statistical significance using Student's t-test when two groups were compared or by one-way ANOVA and a posteriori Fisher-LSD test on preselected pairs. Analyses were carried out with the SigmaStat 3.5 program (Jandel, San Jose, CA, USA). Differences were considered significant at $p < 0.05$. The functional analysis of microarrays was carried out by the program MeV (MultiExperiment Viewer) which allows to analyze microarray data incorporating algorithms for clustering, visualization, classification and statistical analysis in heatmaps.

4. RESULTS

- **miRNAs: differentiation and inflammation**

We used a specific microarray analysis for miRNAs involved in differentiation which includes 84 miRNAs. We cultured Caco-2 cells at 2 (preconfluence), 7 (confluence) and 17 (postconfluence) days for testing differentiation. The monolayers were cultured for the last 24 hours under proinflammatory conditions adding IL-1 β and TNF to the medium.

Compared with the control sample (monolayers at day 2), 40 miRNAs in the sample collected at 7 days and 75 miRNAs in the sample collected at 17 days were overexpressed (Figure 2).

The clustering of miRNAs by families as miRBase (<http://www.mirbase.org/>) indicated that between miRNAs whose expression is augmented with differentiation are those belonging to families let7, miR1, miR15 or miR10 (Figure 3).

Moreover, of the 84 miRNAs studied, only miR302 was inhibited in differentiated cells. Meanwhile, IL-1 β and TNF induced variations in expression

in most miRNAs analyzed (Figure 1). Among those genes induced by TNF and IL-1 β include the families of miR10, miR15 and family members and cluster mir17 miR17-92 (Figure 4).

In figure 4 they are clustered miRNAs that were more overexpressed. It is important to note that the most overexpressed miRNA was miRNA 146a, being one of the reasons why we decided to continue studying its role in inflammatory bowel disease.

- **miR-146a is overexpressed in several models of colitis**

We assessed the expression of miR-146a in two different and widely used chemically induced colitis models, namely TNBS colitis in rats and DSS colitis in mice. In addition, we evaluated miR-146a levels in Rag1 $^{-/-}$ mice transferred with CD4 $^{+}$ CD62L $^{+}$ T cells from regular donor mice i.e. lymphocyte transfer colitis. In the chemically induced colitis models the inflammatory reaction starts immediately or shortly after the administration of the colitogenic agent (TNBS or DSS) and is not strictly chronic (i.e. animals heal with time), while the transfer model is characterized by a slow, insidious onset (6-8 weeks) and a true chronic course. In addition, the latter model is lymphocyte driven as human inflammatory bowel disease (IBD), while both TNBS and DSS colitis develop virtually normally in the absence of lymphocytes. Colonic expression of miR-146a as determined by qRT-PCR was upregulated in TNBS and DSS models but not in the transfer model (Figures 8, 13 and 16).

- **miR-146a is overexpressed in differentiated intestinal epithelial cells**

Crypt and villus cells from mouse jejunum were isolated and the expression of miR-146a was measured by qRT-PCR (Figure 17a). Levels were found to be up-regulated in villi when compared to crypts. As expected, the expression of iAP, a marker of IEC differentiation, followed the same pattern (Figure 17b).

- **Proinflammatory cytokines and the bacterial components LPS and flagellin induce miR-146a expression in intestinal epithelial cells**

Caco-2 cells (human adenocarcinoma colonic cells) miR-146a expression was sharply upregulated in response to IL-1 β (fold change: 49.22 p<0.05 vs. C; n=4). Similarly, quiescent IEC18 cells (nontumoral rat ileal cells) displayed low

expression of miR-46a, which shifted to a marked increase after stimulation with LPS (a TLR4 ligand), flagellin (a TLR5 ligand) or TNF (Figure 20). Conversely, no significant effect of CpG DNA (TLR9 ligand), peptidoglycan (TLR2 ligand), muramyl dipeptide (NOD2 ligand) or IL-1 β was noted. The expression of TLR 2, 4, 5 and 9 and NOD-2 in IEC-18 cells was also studied and was directly correlated with the observed stimulation of miR-146a, being TLR4 and TLR5 highly expressed (Figure 22). As a positive control of the effect of IEC stimulation, MCP-1 and IL-8 production were measured in IEC18 and Caco-2 cells, respectively. The pattern of cytokine secretion paralleled that of miR-146a induction, as it was confirmed in IL-1 β treated Caco-2 cells (269.13 ± 63.43 vs 3.56 ± 1.34 pg/ml, $p < 0.05$ vs C; $n=4$) and in IEC-18 exposed to LPS, flagellin and TNF, but not to other stimuli (Figure 21).

- **Inflammatory mediators such as IL-1 β and TNF α induce miR-146a expression in organoids obtained from jejunum crypts of mice.**

To test the effect of inflammation in a third model, closer to a physiological model than IEC18 cells, we used a recently developed 3D intestinal culture system allowing the generation and multiplication of “mini-guts” (termed organoids) from mouse small intestinal epithelial stem cells (17).

We first studied the effect of proinflammatory cytokines (IL-1 β , TNF α and IFN γ) on the secretion of GRO α /CXCL1 in mouse jejunum organoids. After incubation for 24 hours of the organoids grown for one week in Matrigel™ with the respective cytokines. In general the addition of cytokines to the culture medium induced secretion GRO α /CXCL1, in particular the results showed a significant increase in secretion of this cytokine when added IFN γ and TNF α (Figure 30).

- **Signaling through TLR4/MyD88 induces miR-146a expression in intestinal epithelial Cells**

MyD88 is a TLR adapter protein used by most TLRs to activate transcription factor NF- κ B with the consequent induction of proinflammatory cytokines. To confirm that TLR ligand evoked induction of miR-146a depends on MyD88, gene knockdown with interference RNA technology was applied to IEC18 cells. Silencing MyD88 expression in IEC-18 cells resulted in the inhibition of miR-146a associated with a decrease of MCP-1 induction by LPS (Figures 25 a-c). In

addition, TLR4 expression was similarly knocked down in IEC-18 cells, resulting as expected in an attenuated MCP-1 response to LPS, and downregulated miR-146a expression (Figures 25 b-d).

- **Overexpression of miR-146a inhibits cytokine production in response to LPS and IL-1 β in intestinal epithelial cells**

A role limiting the immune response to prevent overstimulation has been attributed to miR-146a (13) In order to test the validity of this hypothesis in intestinal epithelial cells, we overexpressed miR-146a in both IEC18 and Caco-2 cells and studied the effect on cytokine production (Figure 26). Transfection of a small RNA mimic of miR-146a was employed for this purpose. Overexpression of miR-146a in IEC-18 inhibited the production of MCP-1 and GRO α in the culture medium after 24 h of incubation both in basal conditions and after LPS stimulation (Figure 26a). The studies with Caco-2 cells stimulated with IL-1 β confirmed these results, showing a decreased production of IL-8 and MCP-1 in cells overexpressing miR-146a after IL-1 β stimulation and in basal conditions (Figure 26b).

5. CONCLUSIONS

1. The expression of miRNAs is regulated in differentiation and proliferation processes in the intestinal epithelial cells Caco-2. These same miRNAs are also regulated by proinflammatory cytokines. In particular, in differentiated cells, ie with low proliferative levels, the expression of most of the miRNAs analyzed in this study is increased. This is the case of tumor suppressors miRNAs such as family let7, miR1, miR10 or miR15. Moreover, of the 84 miRNAs studied, only miR302, whose expression has been related to cell reprogramming, was inhibited in differentiated cells. IL-1 β and TNF induce the expression of tumor suppressor miRNAs belonging to the families miR10, miR15 and miR17, while inhibit family let7 expression. This observed link between specific miRNAs and processes of inflammation and epithelial differentiation suggests an association between inflammation and cancer, which is consistent with the literature.

2. miR-146a is involved in maintaining the intestinal barrier function. This conclusion is based on:

a) miR-146a expression is induced under conditions of proliferation and in response to proinflammatory cytokines IL-1 β and TNF in intestinal epithelial cells and colonic inflammation *in vivo* in which there is epithelial damage.

b) miR-146a expression is induced by self molecules of intestinal microbiota in human and murine intestinal cell lines and small intestinal mouse organoid, it includes LPS and flagelin (bacterial antigens and TLR4 and TLR5 ligands)

c) miR-146 helps the innate tolerance inhibiting proinflammatory cytokine expression in response to bacterial antigens.

Introducción

1. RNA DE INTERFERENCIA (RNAI)

Uno de los avances más importantes en la biología molecular en las últimas décadas ha sido el descubrimiento de moléculas de RNA que se encargan de regular la expresión de genes.

La función principal que se le había otorgado al RNA era la de formar parte de la maquinaria de producción de proteínas. Hoy día se sabe que el silenciamiento mediado por RNAs es un mecanismo altamente conservado en la naturaleza en el cual moléculas de RNA regulan la expresión de genes, principalmente a nivel post-transcripcional, uniéndose a regiones no traducidas del RNA mensajero (mRNA). Antes de este descubrimiento, un fenómeno denominado silenciamiento génico había sido descrito en 1990, cuando botánicos que estaban trabajando con petunias, trataron de incrementar la expresión del gen codificante de la enzima (chalcona sintasa) encargada de la génesis de pigmentos de antocianina, los cuales le proporcionan el color púrpura a las flores (18), esperando encontrar que las plantas sobre-expresaran este gen y tuvieran un color púrpura más intenso. El resultado sorprendente fue que la sobreexpresión de la chalcona sintasa derivó en plantas con flores blancas, el color natural cuando no se producen pigmentos de antocianina. La conclusión extraída de este fenómeno fue que una copia extra del gen que codifica la enzima parecía inhibir el gen endógeno de la planta, por esta razón al fenómeno se le llamó co-supresión. Un fenómeno similar fue descrito dos años más tarde por Romano y colaboradores en un hongo conocido como *Neurospora crassa*; y fue llamado *quelling* ("detener abruptamente") (19). Ensayos ejecutados por varios grupos de investigación habían puesto de manifiesto en esa época que la supresión era un fenómeno que ocurría a nivel postranscripcional, por lo que se denominó a este fenómeno Silenciamiento Postranscripcional de Genes ("Post Transcriptional Gene Silencing" o PTGS). La explicación molecular de estos procesos no vio la luz hasta 1998. En este año Fire y Melo trataban de encontrar el modo eficaz de silenciar genes en *Caenorhabditis elegans*, como estrategia para estudiar su función en el desarrollo del nematodo. Para ello, inyectaron moléculas de RNA complementario al mRNA del gen que querían silenciar en las células del nematodo. En estos ensayos, ni el uso del mRNA sentido ni el del antisentido produjeron efecto alguno. Inesperadamente, una mezcla de mRNA sentido y antisentido, en la que ambos mRNA de cadena sentido habían hibridado formando un RNA de doble hebra (RNA_{dh}), produjo la ablación casi completa de

la expresión del gen diana (20). Este fenómeno explicaba tanto la co-supresión como el *quelling*, demostrando que el fenómeno de PTGS era producido por la RNAdh. Los RNAs que tenían la capacidad de silenciar la expresión de secuencias homólogas se denominaron RNA de interferencia o RNAi. Por dicho descubrimiento Fire and Melo fueron galardonados con el premio Nobel de Fisiología y Medicina en el año 2006. Posteriormente se ha observado la existencia de cientos de estos RNAi en plantas, animales y hongos (21).

Entre los años 1999 y 2000, el mecanismo molecular de la interferencia por RNA fue descrito. A grandes rasgos, se observó que moléculas largas de RNAdh eran cortadas en fragmentos pequeños de 21 a 25 nucleótidos. Tras el procesamiento de dímeros, una de las hebras es incorporada en complejos proteicos, sirviendo de guía hacia sus mRNA diana complementarios, cuya expresión es silenciada.

Todos estos descubrimientos dejaron claro que el silenciamiento inducido por RNAi es producto de la utilización de vías endógenas de silenciamiento destinadas al control de la expresión génica y a la protección del genoma frente a secuencias repetitivas de DNA (retroelementos y transposones). De hecho, ya en 1993 se describió el primer microRNA endógeno (*lin-4*), en *C. elegans* (22). Experimentos iniciales mostraron que las mutaciones en este gen producían alteraciones en el desarrollo del nematodo y los autores sugirieron que éstas eran consecuencia de la interacción RNA-RNA entre *lin-4* y la región 3' no traducida del mRNA de *lin-14*. Estos autores formularon una teoría según la cual el transcrito de *lin-4* de 60 pares de bases se doblaba, formando una horquilla a partir de la cual se escindía un miRNA maduro de *lin-4*. Es decir, predijeron con bastante exactitud la vía que se conoce en la actualidad como vía de silenciamiento de los miRNAs. Además, estos autores observaron que secuencias del miRNA *lin4* eran complementarias a secuencias de la región 3'UTR del gen *Lin14*, de lo que dedujeron que se producía una regulación de la síntesis proteica por interacción RNA-RNA.

En los últimos años, la comunidad científica ha realizado grandes esfuerzos para identificar pequeños RNAs endógenos capaces de mediar el silenciamiento de forma natural en distintos organismos. En la última actualización de la base de datos más consultada para la búsqueda de miRNAs (miRBase versión 21, año 2014) se recogen 28645 entradas correspondientes a moléculas precursoras de miRNAs (concretamente pre-microRNAs), que originan 35828 miRNAs maduros

repartidos en 223 especies distintas (<http://www.mirbase.org/>). Este dato no hace más que destacar el creciente interés por el mundo de los RNAs de pequeño tamaño.

1.1 TIPOS DE RNAs PEQUEÑOS NO CODIFICANTES (sncRNA)

Se han descrito varias clases de moléculas pequeñas de RNA que desencadenan el proceso de silenciamiento por interferencia.

Los RNAs endógenos capaces de mediar el silenciamiento (sncRNAs) pueden clasificarse en función de las proteínas que intervienen en su biogénesis, de su modo de regulación, o de su tamaño. Según estos criterios, En nuestro genoma se codifican al menos 3 clases de RNA pequeños que median fenómenos de silenciamiento. (*Tabla 1*). Las dos primeras clases, los RNA pequeños de interferencia (endo-siRNA) y los microRNAs (miRNAs), son RNAs de 20-25 pares de bases generados a partir de transcritos de doble cadena de mayor tamaño mediante la acción de Dicer, una ribonucleasa III. Éstos son cargados en un complejo denominado de silenciamiento inducido por RNA (RISC), en su forma citoplasmática, o complejo de silenciamiento transcripcional inducido por RNA (RITS), en su forma nuclear. RISC y RITS son complejos efectores que se dirigen a secuencias dianas homólogas a las que se unen mediante los RNAs pequeños (es decir, dirigidos por ellos). El centro de estos complejos es una proteína de la familia argonauta que se une al DNA de doble cadena y lo procesa, eliminando una de las hebras, de forma que queda unida a la que se denomina hebra líder. Tanto los endo-siRNA como los miRNA están implicados en fenómenos de silenciamiento génico co-transcripcional y post-transcripcional, mediante la degradación de RNA y la inhibición de la traducción. La principal diferencia entre los endo-siRNAs y los microRNAs es que los primeros son muy específicos, reconocen sólo a una diana con la que son totalmente complementarios, mientras que los microRNAs son menos específicos y por tanto pueden regular la expresión de cientos de proteínas (23).

Tabla 1. Tipos de sncRNAs.

	endo-siRNA	miRNA	piRNA
Tamaño (nucleótidos)	~21-25	~21-25	~24-31
Mecanismo de acción (silenciamiento)	Transcripcional Post-transcripcional: degradación de RNA bloqueo traduccional	Transcripcional (menos que siRNA) Post-transcripcional: degradación de RNA bloqueo traduccional	Transcripcional (menos que siRNA) Post-transcripcional: degradación de RNA
Eucariotas en las que se conservan	Plantas, animales, hongos, ciliados	Plantas y animales	Animales
Biosíntesis por Drosha	NO	Sí	NO
Biosíntesis por Dicer	Sí	Sí	NO
Tipo de proteína Argonauta	Ago	Ago	Piwi

Filogenéticamente, existen dos subfamilias o clases de proteínas argonautas: la subfamilia argonauta (Ago) y la subfamilia PIWI. Mientras que las dos clases de sncRNA descritos previamente se unen a proteínas de la subfamilia Ago, la tercera clase se une a proteínas de la subfamilia PIWI (pi-RNA). Los pi-RNA tienen una longitud de ~24-30 nucleótidos (mayor, por tanto, que los ya descritos) y regulan fenómenos de degradación de RNA y, en menor medida, procesos de silenciamiento génico co-transcripcional. La biosíntesis de este tipo de RNA pequeño no está mediada por proteínas DICER (24).

En Los siguientes apartados se realizará una revisión de los principales elementos y mecanismos que operan durante la biosíntesis de RNAs de pequeño no codificantes haciendo especial hincapié en los miRNAs, sus generalidades, mecanismos de acción entre otros.

1.1.1 miRNAs

Los miRNAs son RNAs pequeños con una longitud aproximadamente de 21-25 nt, que no codifican proteínas, generados a partir de transcritos endógenos que pueden formar estructuras en forma de horquilla (25). Conforman una gran familia de genes reguladores postranscripcionales que controlan muchos procesos celulares y del desarrollo en eucariotas, cumpliendo una gran cantidad

de funciones. Se estima que el 30% de todos los genes humanos son regulados por mecanismos dependientes de miRNAs (26) y que un solo miRNA puede regular alrededor de 200 diferentes transcritos que pueden funcionar en diferentes vías celulares (27), así como un mismo mRNA puede ser regulado por múltiples miRNAs.

- **Biogénesis y procesamiento de los miRNAs** (*Ilustración 1*)

Los miRNAs se originan a partir de moléculas precursoras de tamaño variable, doble cadena y bucles a modo de horquilla, capaces de originar RNA con estructuras secundarias (28,29), en un proceso secuencial de dos reacciones las cuales son guiadas por Drosha y Dicer.

Los miRNAs son inicialmente transcritos en el núcleo celular a partir de precursores largos de RNA llamados pri-miRNAs. Generalmente el miRNA es sintetizado por la RNA polimerasa II (30), sin embargo, cuando el miRNA está asociado a repeticiones Alu (son las secuencias móviles más abundantes del genoma humano las cuales constan de unos 300 pares de bases aproximadamente, juegan un papel importante en la estabilidad genómica y el control epigenético de la expresión génica), puede ser transcrito por la RNA polimerasa III (31). Un gran número de factores de transcripción asociados a RNA polimerasa II controlan la transcripción de miRNA, por lo que se trata de un proceso de regulación muy detallada según el tipo de célula y las condiciones específicas.

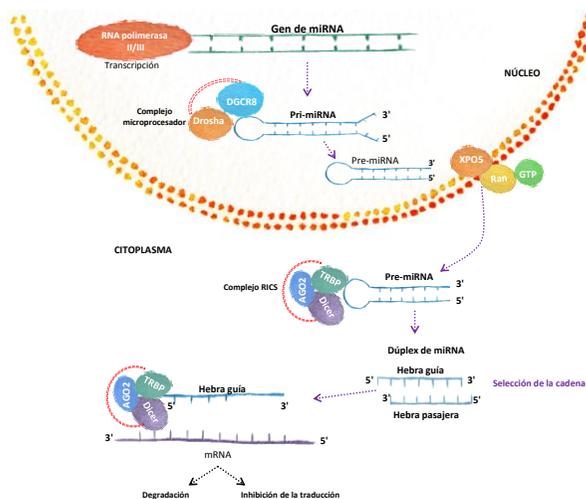


Ilustración 1. Biogénesis de miRNAs.

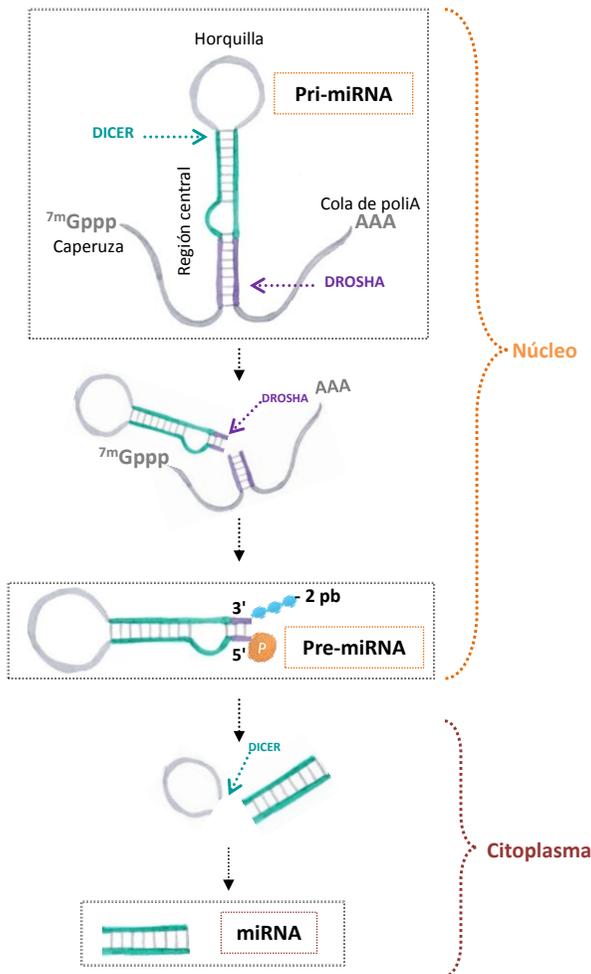


Ilustración 2. Estructura y evolución de los miRNAs

La mayoría de los pri-miRNAs presenta una caperuza ("cap") en la región 5' y una cola de adeninas en la región 3' (32), similar a la de los mRNA. Un pri-mirRNA estándar contiene una región central o troncal ("stem") de RNAdh, de unos 30-40 nucleótidos, un lazo u horquilla terminal ("loop") y dos regiones de RNA de cadena sencilla (RNAs) a cada extremo opuesto de la región central (*Ilustración 2*).

El primer paso del procesamiento consiste en el corte del pri-miRNA en el tallo de la estructura en forma de horquilla, liberándose lo que se denomina pre-miRNA. Este proceso se lleva a cabo en el núcleo, interviene el llamado complejo microprocesador en el que se incluyen dos proteínas: Drosha y la proteína denominada en humanos

proteína de la región del gen 8 crítica para el síndrome de DiGeorge (DGCR8) (*Ilustración 3*) (33–35). Ambas proteínas intervienen en el reconocimiento del pri-miRNA, gracias a la presencia de un dominio de unión a RNAdh en Drosha y de dos dominios de reconocimiento o unión a RNAdh presentes en DGCR8, mediante los que reconoce las zonas de pri-miRNA que solapan con segmentos de RNA cadena simple y de doble hebra. El corte del pri-miRNA es catalizado por Drosha gracias a dos dominios RNasa III en tándem. Como consecuencia se obtienen un RNA con un grupo fosfato en su extremo 5' y un extremo 3' en el que sobresalen 2 nucleótidos con un grupo hidroxilo final, denominado pre-miRNA (*Ilustración 2*).

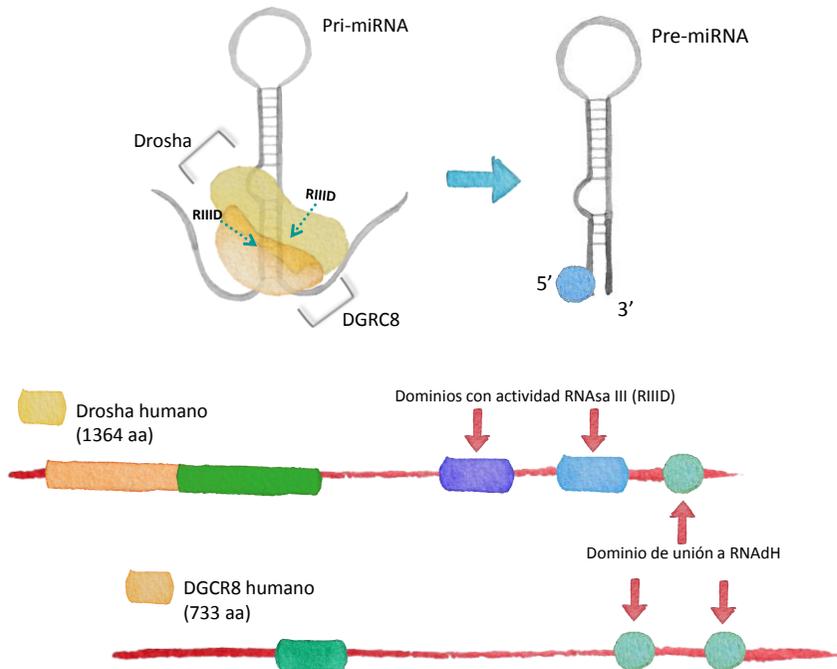


Ilustración 3. Complejo microprocesador

A continuación, los pre-miRNAs se exportan desde el núcleo celular hasta el citoplasma por medio de la proteína exportina5 (Xpo-5), una proteína nuclear miembro de la familia de receptores transportadores nucleares que reconoce el tallo de RNAdh y las bases que sobresalen en el extremo 3' del pre-miRNA (36,37). Su función es exportar pri-miRNA desde el núcleo al citoplasma. La exportina 5 se une cooperativamente al pre-miRNA y a un cofactor unido a GTP denominado Ran en el núcleo. Una vez en el citoplasma liberará al miRNA tras la hidrólisis del GTP (38).

En células humanas, una vez en el citoplasma, los pre-miRNAs se procesan nuevamente, y se unen al denominado complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), formado por las proteínas Dicer1 (39–41), TRBP (proteína TAR de unión a RNA) (42) y Argonata 2 (AGO2). Además de este complejo base trimérico pueden unirse otras proteínas auxiliares que modifiquen su función. Por ejemplo: proteínas que dirigen el mRNA a sitios generales de degradación. Una vez unido al RISC, el pre-miRNA es cortado cerca del lazo terminal por DICER1, produciéndose un corte cerca de las posiciones nucleotídicas que

flaquean la horquilla, dando como resultado un dúplex de miRNA de doble hebra de unos 22 pares de bases conocido como complejo miRNA::miRNA* (ver más adelante) que es procesado posteriormente por Dicer (43–45). Las proteínas Dicer son homólogos citoplasmáticos de las RNAsas III de aproximadamente 200 kDa y se caracteriza por poseer:

- a) Dos dominios con actividad RNasa III con los que corta cada una de las cadenas que conforman el pre-miRNA.
- b) Un dominio de unión a RNAdh.
- c) Un dominio con actividad helicasa.
- d) Un dominio denominado PAZ ("piwi/Argonaute/Zwile") que se une al extremo 3' de RNAs pequeños.

La distancia entre el dominio PAZ y los dos dominios con actividad RNasa III es de 25 pares de bases de RNA, por lo que se suele decir que Dicer es una "regla molecular".

Una vez cortado el RNAdh de ~22 pares de bases, una de las hebras del dúplex de miRNA::miRNA* permanecerá unida al complejo RISC (miRNA; hebra guía), mientras la otra será degradada (miRNA*; hebra pasajera), diversos estudios sugieren que la elección de una u otra cadena del dúplex se debe a motivos termodinámicos relacionados con la inestabilidad del apareamiento de bases en la región 5' de cada cadena que conforma el dúplex (46). Por ejemplo, se degrada la hebra que tiene la secuencia GU en su extremo 5' frente a la que tiene la secuencia GC. No obstante hay excepciones, ya que este proceso no es muy exigente. De hecho, al menos en algunos casos cualquiera de las dos hebras puede actuar como guía. El proceso de degradación de la hebra complementaria es catalizado por la proteína argonauta (AGO2), que en principio es la única de las 4 proteínas AGO descritas con actividad endonucleasa. Se ha indicado que AGO2 solo puede cortar el RNA cuando las dos hebras son complementarias (47), aunque algunos autores sostienen que este no es un requisito esencial. Por otra parte, la existencia de complejos RISC que contiene una proteína AGO distinta de AGO2 unida a miRNA monocatenarios ya procesados, indica la existencia de mecanismos independientes de RISC y AGO2 encargados de la eliminación de la hebra pasajera.

- **Regulación de la biogénesis de miRNAs**

La regulación de la biogénesis de miRNAs puede ocurrir a tres niveles:

- a) Durante la transcripción.
- b) Mediante el fenómeno de la edición de moléculas de RNAdh.
- c) Durante el procesamiento de los miRNAs por el complejo Drosha/Dgcr8 y por Dicer.

La transcripción de pri-miRNA es controlada por factores de transcripción que son específicos del pri-miRNA a expresar, del tipo celular, del proceso de desarrollo en que se encuentren las células y de la respuesta de las células a diferentes estímulos. Un ejemplo de este fenómeno es la existencia de un bucle de retroalimentación, en el que la activación del factor de transcripción NF- κ B es capaz de regular la expresión de miRNA 146a, y este a su vez regula a las proteínas amortiguadoras IRAK1 y TRAF6; convirtiéndose en un mecanismo de compensación eficaz para bajar el tono de la respuesta inflamatoria, asociada a estrés celular (48–53). Otro ejemplo se produce tras el inicio del daño en el DNA, P53 activa la transcripción del pri-miRNA-34 (pri-miRNA policistrónico que contiene varios miRNAs de la familia miRNA-34) y la expresión de los miRNAs de la familia del miRNA-34 induce la parada del ciclo celular (54) y un último ejemplo, asociado en este caso a células embrionarias sería, factores de transcripción específicos de células troncales embrionarias como Sox2 y Nanog, que regulan promotores de genes de miRNA, siendo estos miRNAs preferencialmente expresados en células troncales embrionarias (55).

Además la metilación de secuencias promotoras del genoma puede afectar a la expresión de los genes de miRNA del mismo modo que afecta al resto de genes de un organismo. Algunos miRNAs actúan como supresores de tumores y se han observado patrones de hipermetilación de estos miRNAs en líneas celulares cancerosas (56).

El fenómeno de "edición" de miRNAs genera modificaciones a nivel de la secuencia de nucleótidos de las moléculas precursoras de miRNA, aumentando la diversidad de formas maduras originadas a partir de un mismo gen de miRNA. La deaminación de nucleótidos de adenina, transforman estas bases púricas en inosinas, que son reconocidas por la maquinaria celular como guaninas, modificándose el apareamiento de bases de las moléculas precursoras de

miRNAs que sufren la edición. En dicho mecanismo, participan las proteínas de la familia ADAR. Las Adenosinas Deaminasas que actúan sobre RNAdh (ADAR) son una familia de proteínas capaces de modificar la secuencia de nucleótidos de las moléculas precursoras de miRNAs (57–62).

Los cambios introducidos a nivel de secuencia pueden afectar tanto a nivel del procesamiento de las moléculas precursoras durante la biogénesis de miRNAs, como a nivel del reconocimiento miRNA y el mRNA objeto de la regulación. Así, la edición del pri-miRNA-142 parece interferir en su posterior procesamiento por el complejo Drosha/Dgcr8, provocando una reducción de la expresión de las formas maduras miR-142-3p y miR-142-5p (63). Un caso parecido se observó en el procesamiento de las moléculas precursoras del miRNA-151 en cerebro (64).

También la actividad del complejo microprocesador y de Dicer puede ser modulada durante la biogénesis de miRNAs concretos. Por ejemplo, la ribonucleoproteína hnRNPA1 ("heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1") se une a la horquilla de pri-miRNA-18a facilitando su procesamiento por delante del resto de los miRNAs de su mismo grupo (grupo miR-17-92)(65). La activación de la proteína ERK (quinasas reguladas por señales extracelulares, por sus siglas en inglés) puede fosforilar a Trbp (proteína que forma un complejo con Dicer para el procesamiento de los pre-miRNAs), estabilizando la unión Trbp/Dicer y aumentando la eficiencia del procesamiento de pre-miRNAs (66).

Otro ejemplo lo tenemos en la relación de lin-28 y la familia de miRNAs let-7. Lin-28 es una proteína que ha sido caracterizada principalmente por la capacidad de promover la diferenciación celular (pluripotencia) regulando al miRNA let7 (67). El pri-miRNA-let-7 se expresa tanto en células en diferenciación como en células diferenciadas. Sin embargo, los miRNAs maduros de la familia let-7 sólo se detectan en células diferenciadas. Lin-28 parece impedir el procesamiento del complejo Drosha/dgcr8 mediante su unión a la región de la horquilla de pri-miRNA-let-7 (68,69). Además lin-28 también es capaz de unirse al pre-miRNA-let-7 y evitar su procesamiento por Dicer (70). Este complicado circuito regulatorio se cierra con la capacidad de las formas maduras de let-7 para regular postranscripcionalmente la cantidad de lin-28 (71,72).

A pesar de los avances en el conocimiento de los mecanismos que operan durante la biogénesis de miRNAs todavía estamos lejos de entender el proceso en su totalidad. Poco se sabe acerca de la estabilidad y la permanencia de las

moléculas maduras de miRNAs. Parece que los miRNAs unidos a Ago2 son relativamente estables, y la mayoría de ellos tienen una vida media de más de 14 horas (73,74). Sin embargo, algunos miRNAs parecen presentar cinéticas de degradación muy rápidas (73,75) sugiriendo la existencia de fenómenos de regulación específicos para cada miRNA o grupo de ellos.

Antes de explicar detalladamente los mecanismos de acción de los miRNAs, haremos un inciso para comprender de una forma más didáctica los mecanismos de la interacción entre los miRNAs y sus mRNA diana.

- **Interacción entre miRNAs y sus mRNAs diana**

Desde el descubrimiento del primer mRNA regulado por un miRNA a principios de la década de los 90, análisis bioquímicos, genéticos y bioinformáticos han revelado gran cantidad de regiones, dentro de la secuencia de los mRNAs, susceptibles a unión por complementariedad de bases a los miRNAs. La mayoría de estas regiones parecen estar localizadas en las regiones 3' UTR de los mRNAs (76,77). Por otra parte, la secuencia de nucleótidos de la región 5' de los miRNAs parece crítica para la especificidad de unión entre miRNA y su mensajero diana. A esta región se le denomina región "semilla" (seed region), está constituida por nucleótidos localizados entre las posiciones 2 y 7 en dirección 5'-3' de cada miRNA y ha de hibridar perfectamente con el mRNA diana, incluso aunque el resto de mRNA no lo haga (78–80). Los miembros de una misma familia de miRNAs presentan un alto grado de homología de secuencia en esta región. Ensayos in vitro han demostrado que los nucleótidos de la región "semilla" por sí solos podrían ser capaces de reprimir la traducción de mRNAs (81), y cómo variaciones dentro de la región "semilla" afectan a la actividad de los miRNAs, reduciéndose los niveles de represión traduccional de un mRNA determinado. Aunque la complementariedad de los nucleótidos de la región "semilla" es fundamental para la represión traduccional, uniones adicionales de los nucleótidos que flanquean la región semilla del miRNA, a la región 3' UTR del mensajero, aumentan la especificidad de la unión miRNA/mRNA y su estabilidad (82–85). Siendo lo más común un perfecto apareamiento de nucleótidos de la región semilla del miRNA con los de la región 3' UTR del mRNA diana, existen ejemplos donde se producen errores en el apareamiento de nucleótidos entre ambas regiones (76).

Además existen otro tipo de particularidades que influyen en la especificidad de la unión miRNA/mRNA. El aumento de bases AU cerca de la

región semilla, el apareamiento adicional de los nucleótidos en posición 13 y 16 del miRNA a la región 3' UTR del mensajero, la posición del sitio de unión del miRNA respecto del centro de la región UTR y del codón de parada, son todos factores que incrementan la eficacia de la degradación de mRNAs mediada por miRNAs (86,87).

- **Mecanismo de acción de los miRNAs**

El silenciamiento génico por miRNA se puede producir tanto a nivel co-transcripcional como post-transcripcional: por remodelación de la cromatina, por disminución de la estabilidad de mRNA o por inhibición de la síntesis proteica.

- Silenciamiento a nivel transcripcional

Existen dos mecanismos mediante los cuales el DNA se remodela y es accesible para la transcripción por RNAPol II:

a) Regulación del desplazamiento de los nucleosomas a lo largo del DNA mediante la hidrólisis de ATP.

b) Modificación covalente de las histonas. Las histonas H3 y H4 poseen aminoácidos cargados en sus extremos amino terminales, que condicionan su unión estrecha al DNA.

Se ha observado que estas colas pueden sufrir distintas modificaciones, como acetilaciones, metilaciones, fosforilaciones, ubiquitinación o sumoilación. Estas modificaciones se han denominado "código de histonas". Por supuesto, estas modificaciones afectan a la expresión génica. Desde el punto de vista mecanístico la modificación de histonas puede afectar a la frecuencia de transcripción bien permitiendo el acceso de factores de transcripción al DNA, bien por unión directa a proteínas (cofactores o factores de transcripción). Es bien conocido que la metilación de histonas produce silenciamiento transcripcional, mientras que la acetilación favorece la expresión génica.

Los tres tipos de sRNA existentes pueden producir silenciamiento transcripcional. No obstante, el mecanismo correspondiente a miRNA ha sido poco estudiado. Además y como hemos indicado antes se sabe que el silenciamiento transcripcional tiene lugar también en mamíferos (*Tabla 1*), pero los mecanismos implicados son poco conocidos y se han descrito en otros animales y en levaduras.

- Degradación de mRNA mediado por miRNAs

Además de actuar como inhibidores de la traducción y la transcripción (en menor medida), estudios relacionan el incremento en la cantidad de miRNAs con una reducción de la población de mRNAs (88–92). Al parecer se trata de un mecanismo importante ya que la desestabilización de los mRNA diana es la principal razón en la disminución de la síntesis proteica (93).

El miRNA puede producir silenciamiento mediante la degradación de mRNA diana bien en el citoplasma, bien en los llamados cuerpos de procesamiento (cuerpos P). La primera vía (degradación citoplasmática) se produce cuando el miRNA y el mRNA diana no son totalmente complementarios. La segunda vía se produce cuando el mRNA diana y el miRNA son totalmente complementarios e implica la localización del mRNA diana en cuerpos P.

Los cuerpos P son compartimentos celulares especializados que constituyen estructuras dinámicas de ribonucleoproteínas implicadas tanto en la degradación como en el almacenamiento de mRNA. Por tanto, los sRNA no solo pueden dirigir el mRNA a los cuerpos P para su degradación, sino que pueden secuestrarlos para que vuelvan a la maquinaria de traducción mediante mecanismos regulados una vez se desensambla el cuerpo P; por ello cambian de tamaño en respuesta a la actividad traduccional de la célula. La inhibición de la traducción conlleva un aumento del tamaño de los cuerpos P (94,95). Por el contrario, la inhibición de la ruta de biogénesis de miRNAs dispersa y reduce el tamaño de los cuerpos P, sugiriendo que la actividad de los miRNAs es esencial para la formación de grandes agregados de ellos. Este mecanismo también se ha relacionado con cambios en la represión y activación del ciclo celular, lo que ha llevado al concepto de que el miRNA no sólo silencia, sino que también podría activar la traducción. La degradación y el almacenamiento de los mRNA en los cuerpos P constituyen un mecanismo irreversible y reversible, respectivamente, de regulación de expresión génica (96–98).

Otro tipo de gránulos que participan en la degradación de mRNAs mediada por miRNAs, son los denominados gránulos de estrés (94,99). Se han relacionado con la eliminación de mRNAs unidos a complejos miRNP (complejo micro-ribo-nucleo-proteico, el miRNA unido al complejo RISC) en situaciones de estrés celular (100).

Aunque anteriormente hemos abordado tanto la Interacción entre miRNAs y sus mRNAs diana así como la degradación de los mRNA, queremos esclarecer que:

La elección entre la inhibición de la traducción o la degradación depende de la estructura miRNA-mRNA, concretamente el número, el tipo y la posición de las bases desapareadas, del número de apareamientos y de la distancia entre estos y de la posición de las secuencias semilla en la región 3'UTR. De hecho, un mismo miRNA unido a un mRNA diana distinto puede conducir a destinos totalmente diferentes en cada caso.

- Silenciamiento a nivel traduccional

En los organismos eucariotas la traducción desde los mRNAs a proteínas presenta tres etapas principales: iniciación, elongación, y terminación de las cadenas polipeptídicas.

La función del miRNA en el control de la síntesis proteica y de la degradación de mRNA está siendo objeto de intenso estudio, por lo que actualmente existen múltiples hipótesis al respecto. Dependiendo del modelo experimental empleado, el bloqueo de la traducción puede ocurrir a nivel de cualquiera de los tres pasos (101).

I. Represión de la síntesis de proteínas por miRNA

La mayoría de los estudios publicados coincide en que el miRNA puede reprimir la expresión de proteínas a dos niveles distintos:

I.I Inhibición del inicio de la traducción

Se han descrito al menos dos mecanismos mediante los cuales los miRNAs pueden inhibir el inicio de la traducción. Por una parte, es bien conocido que eIF4E (factor de inicio de la traducción) es esencial en la iniciación de procesos de traducción dependientes de Cap. En éstos, eIF4E se une a la caperuza de metil- guanosina trifosfato (m^7G), presente en el extremo 5' terminal de la mayoría de los mRNA de los eucariotas. Las proteínas argonautas poseen una secuencia con similitud sustancial a la de eIF4E, y hay datos que indican que las proteínas argonautas podrían competir con éste por la unión a la caperuza m^7G antes que se formen los polisomas. Algunos autores han descrito un mecanismo

que incluye la inducción de la degradación de la cola de poliA por RISC. Sin embargo, se ha observado que en algunos mRNA no es necesaria la cola de poliA para que se produzca la inhibición pero sí la m⁷G (102,103).

El segundo mecanismo consiste en la asociación de AGO2 con el F6 y con las subunidades grandes de los ribosomas, evitando el ensamblaje de las mismas (104).

I.II Inhibición de la elongación

Diversos estudios han observado que para que se produzca la inhibición de la traducción por miRNA de ciertos mRNA no es necesaria la presencia de la caperuza m⁷G y que la inhibición se produce una vez iniciada la traducción, en el proceso de elongación. No obstante, existen diferencias entre estos estudios que han llevado a formular distintas hipótesis que indicarían que los miRNA pueden actuar separando ribosomas del mRNA durante la elongación, o bien propiciando la degradación cotraduccional de la cadena polipeptídica naciente (105–108)

I.III Inhibición de la traducción por desadenilación

Por último, se ha observado que el miRNA puede inducir la desadenilación de mRNAs diana. Está bien demostrado que existe una proteína que se une a la cola de poli-A denominada PABPC1 (Poly-A-binding protein) que es capaz de interactuar con el factor de iniciación de la traducción 4G (eIF4G). Éste a su vez se une a la caperuza a través de eIF4E, formando un bucle en el mRNA diana. Esta interacción incrementa mucho el ritmo de traducción. La desadenilación de mRNA diana mediada por miRNA evita la formación de estos bucles y por tanto enlentece la traducción. No obstante, en humanos se ha observado que la represión de la traducción no depende de la eliminación de la cola de poliA (92,109)

2. FISIOLÓGÍA DEL INTESTINO

2.1. ANATOMÍA DEL INTESTINO

El tracto intestinal, desde el esófago hasta el recto, es básicamente un tubo, cuya pared está compuesta por cuatro capas de tejido dispuestas en forma concéntrica: mucosa, submucosa, muscular externa y serosa (110,111) (*Ilustración 4*).

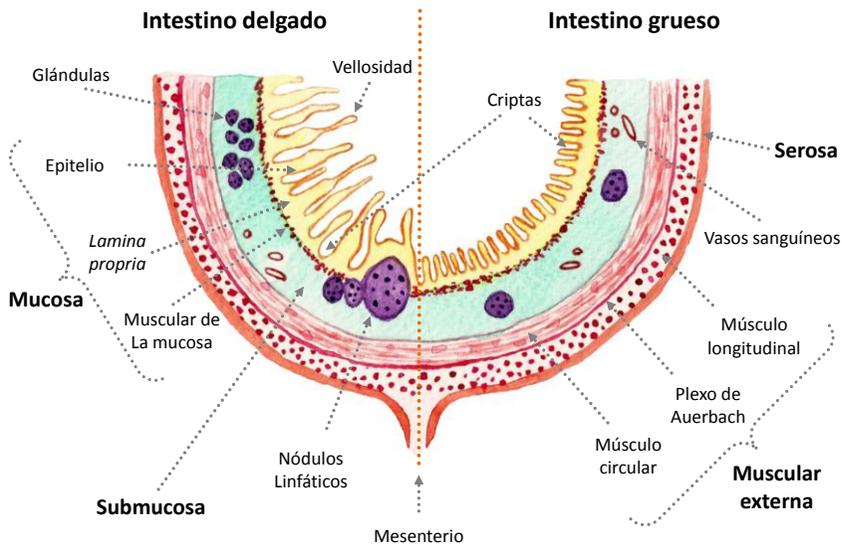


Ilustración 4. Representación esquemática de la estructura de la pared del tracto gastrointestinal

- **Mucosa**

La mucosa, a su vez consta de tres capas: una capa epitelial, una capa subyacente de tejido conectivo como soporte denominado *lamina propria* y una delgada capa de músculo liso, la *muscularis mucosae*.

- El tipo de **epitelio** va a depender de la función que éste desempeñe en el tracto intestinal. En algunos sitios es esencialmente protector (por ejemplo, el epitelio escamoso estratificado del esófago y el ano). En otros sitios, ejerce una función secretora (por ejemplo, el epitelio secretor de moco del

estómago) o de absorción (por ejemplo, el epitelio columnar de los intestinos delgado y grueso). El epitelio es responsable de la absorción y secreción de nutrientes y agua así, cometidos que se producen simultáneamente, además recae sobre el epitelio la importante tarea de la compactación de las heces, que depende de movimientos del agua a través del mismo. Este proceso está exquisitamente regulado para ofrecer un balance óptimo de ambos (110,111) Cuatro tipos de células diferenciadas median las funciones del epitelio intestinal (ver más adelante). La abundancia relativa de cada uno de estos tipos celulares varía notablemente dentro de los diferentes segmentos intestinales. El epitelio intestinal no se concibe como una capa plana, más bien, se caracteriza por poseer invaginaciones que se denominan criptas y prolongaciones llamadas vellosidades luminales, es importante destacar que esto ocurre sólo a nivel del intestino delgado, ya que en el colon sólo existen invaginaciones (criptas). Esta disposición aumenta enormemente la superficie epitelial del intestino delgado lo que permite la eficiente absorción de nutrientes en la luz intestinal. El proceso de proliferación celular surge a partir de células pluripotenciales situadas cerca de la base las criptas (112). La formación de nuevas células ocasiona el desplazamiento de las células ya existentes desde la base de las criptas, en dirección a la luz intestinal. A su vez, las células generadas se dividen varias veces, dando lugar a más células de su mismo linaje. En ambos intestinos (delgado y grueso), estas células pluripotenciales conforme van migrando se diferencian en cuatro tipos funcionales de células funcionales: **enterocitos**, **células caliciformes** (secretoras de moco), **células enteroendocrinas** (secretoras de hormonas) y **células de Paneth**, (*Ilustración 5*). Estas últimas a excepción de los otros tipos celulares se desplazan a la base de la cripta, donde permanecen durante un tiempo mayor que el resto de tipos celulares epiteliales y contribuyen decisivamente a la defensa antibacteriana (ver más adelante). En el intestino delgado, el proceso descrito culmina en la punta de las vellosidades, o de la parte superior de las criptas, se descaman a la luz intestinal, previo paso por un proceso de anoikis (una forma de muerte celular programada

inducida por el desprendimiento de matriz extracelular), dejando espacio para nuevas células. Este proceso de renovación epitelial ocurre cada 5-7 días (113,114). Una curiosidad interesante a destacar es que las Criptas pueden multiplicarse a través de la fisión lateral (115). A continuación se indican las principales características de los tipos celulares del epitelio intestinal:

- ❖ Los **enterocitos** son células epiteliales columnares, con un núcleo en posición basal. Son descritas como células polarizadas ya que presentan un polo apical absorptivo y digestivo, orientado hacia la luz (lumen), en contacto con el contenido intestinal y un polo basal secretorio, que está en contacto con el tejido conjuntivo, los vasos linfáticos y los capilares de la mucosa. Contienen numerosas microvellosidades paralelas a su superficie apical, las cuales forman una frontera estriada visible al microscopio óptico. Cada microvellosidad contiene un núcleo de microfilamentos de actina anclado a la membrana plasmática, que se extiende hasta la red terminal, otra red de microfilamentos situada inmediatamente debajo de las microvellosidades. Los enterocitos se unen entre sí, en sus polos apicales por uniones estrechas (TJ, por sus siglas en inglés). Estos complejos de unión incluyen uniones de oclusión que separan el lumen del espacio paracelular, y son más o menos permeables en función del segmento intestinal considerado. Como ya se ha mencionado anteriormente la impresionante capacidad funcional del intestino tanto para secretar y absorber agua es, en gran parte, el resultado de su extensa superficie funcional, debido al factor de amplificación provocado por las vellosidades y microvellosidades.

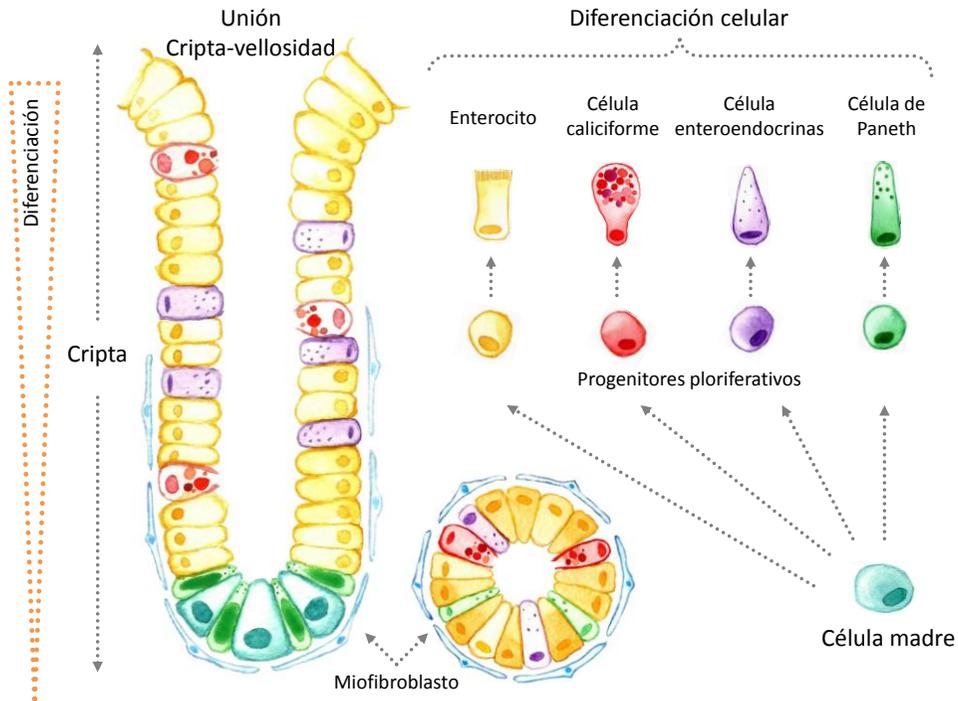


Ilustración 5. Tipos de células del epitelio intestinal.

- ❖ El número de células mucosecretoras o **células caliciformes**, se va incrementando a medida que se avanza en el tracto digestivo (proximal-distal). Son células epiteliales columnares simples, cuya función principal es la de secretar mucina, que se disuelve en agua dando como resultado una secreción viscosa (moco) generando humedad en la zona. La mucina evita la desecación del epitelio. El citoplasma de estas células, está ocupado en su mayoría por gránulos de mucina.
- ❖ **Células enteroendocrinas**, de Kulchitsky o enterocromafines representan una porción muy pequeña en el epitelio (<1%). Controlan parte de la fisiología intestinal a través de la secreción de una variedad de hormonas como la serotonina (estas contienen cerca del 90% de los depósitos de serotonina en el organismo), somatostatina, sustancia P, motilina,

péptido intestinal vasoactivo y secretina. Existen múltiples subtipos celulares que se definen específicamente por el tipo de hormona que generen (116).

- ❖ **Las células de Paneth** residen en la base de las criptas, principalmente en el intestino delgado. Se identifican microscópicamente por su localización adyacente a las células madre intestinales. La mayor parte de su citoplasma está ocupado por gránulos formados por varios compuestos antimicrobianos, tales como defensinas, criptidinas y lisozimas, conocidas por su importante papel en la inmunidad y en el control del microambiente microbiano intestinal.
 - ❖ Finalmente, cabe mencionar otro tipo de célula menos conocidas como las **células M** las cuales recubren las placas de Peyer's (117).
- **Lamina propia y el tejido linfoide asociado:** la *lamina propria* sostiene al epitelio y a su vez lo conecta con la *muscularis mucosae*. Contiene un gran número de linfocitos y nódulos linfáticos, a los que se le ha dado la denominación de tejido linfoide asociado al intestino (GALT, por sus siglas en inglés). También se incluyen células plasmáticas, eosinófilos y algunas otras células que migran desde el torrente sanguíneo. El tejido linfoide es una significativa fuente de células plasmáticas productoras de IgA, una clase de inmunoglobulina que es transportada hacia la luz intestinal a través de las células epiteliales. En el intestino delgado existen unos agregados granulares llamados Placas de Peyer's ubicados generalmente en el lado del tubo digestivo opuesto a la unión con el mesenterio. Asimismo la *lamina propria* provee a la superficie epitelial de capilares sanguíneos fenestrados y capilares linfáticos, concretamente a lo largo de las vellosidades intestinales en el intestino delgado, que aseguran que los productos de la digestión puedan absorberse rápidamente.

- ***Muscularis mucosae*** es la capa más externa de la mucosa y está compuesta por dos capas finas de fibras musculares lisas que están dispuestas en forma circular, en la capa interna y longitudinalmente en la capa externa. Su actividad contráctil permite el movimiento independiente y plegable de la mucosa, que ayuda en gran medida en la absorción y la digestión. Las fibras musculares lisas pueden extenderse desde la *muscularis mucosae* hasta la punta de cada una de las vellosidades intestinales. Su tono determina la altura de las mismas.

- **Submucosa**

Esta capa consta de tejido conectivo denso irregular fibroelástico, y conecta la mucosa con la *muscularis mucosae*, además es la vía por la que atraviesan capilares y vasos de mayor calibre sanguíneos y linfáticos, los cuales drenan y nutren a la mucosa y a la muscular externa. Esta capa contiene un significativo número de fibras elásticas formando un núcleo de pliegues en la mucosa. En el duodeno y el esófago, la submucosa también contiene glándulas secretoras de moco. Una importante propiedad de esta capa es que en su profundidad se encuentra un plexo de fibras nerviosas autónomas y células ganglionares conocido como plexo submucoso de Meissner.

- ***Muscularis externa***

La capa muscular externa se compone de dos capas de músculo liso; la interior es de tipo circular y la exterior de tipo longitudinal. El tono muscular de la capa circular interna determina el diámetro total del lumen intestinal. Además, la muscular externa experimenta contracciones peristálticas que impulsan el contenido intestinal hacia el ano. Al igual que la submucosa, contiene redes de fibras nerviosas y células ganglionares que constituye el plexo mesentérico de Auerbach, situado entre la capa circular y la capa longitudinal de la muscular externa.

- **Serosa**

Es la capa más externa de la pared del intestino y consta de una sola capa de epitelio simple llamado mesotelio y una pequeña cantidad de tejido conectivo subyacente, que es atravesado transversalmente por numerosos vasos sanguíneos. En las regiones en las que el intestino se une a tejidos adyacentes,

el tejido conectivo no está cubierto por células mesoteliales, sino que se mezcla con el tejido conectivo asociado a las estructuras circundantes. En estos casos, es comúnmente conocido como adventicia.

3. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

3.1 GENERALIDADES

La denominación enfermedad inflamatoria intestinal (EII) hace referencia a dos enfermedades distintas aunque ampliamente relacionadas entre sí, la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU) (118). Ambas tienen en común el ser enfermedades inflamatorias del intestino de carácter crónico y recurrente, de tratamiento difícil y cuya etiología es esencialmente

desconocida. Conjuntamente tanto la EC como la CU suelen cursar con síntomas similares como dolor abdominal, vómitos, diarrea, fiebre, hematoquecia y pérdida de peso, por eso en algunos pacientes, no es posible distinguir qué forma de EII está presente dando lugar al término Colitis indeterminada. Hay, sin embargo, diferencias importantes que distinguen estos procesos inflamatorios como la localización de la inflamación, la apariencia y perfil inmunológico (119) En las tablas 2 y 3 se resumen las diferencias.

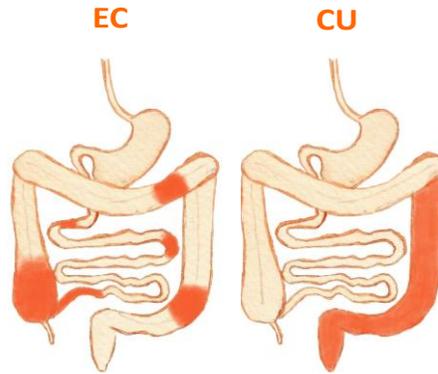


Ilustración 6. Distribución anatómica esquemática de la localización de la inflamación en la enfermedad de Crohn (CD) y la colitis ulcerosa (CU).

- **Localización de la inflamación:** En la EC, el proceso inflamatorio puede afectar a cualquier segmento del tubo digestivo, desde la boca hasta el ano (*Ilustración 6*). Aproximadamente, el 50% de los pacientes tiene afectado el íleon terminal, el 30% tanto el íleon como el colon y en un 20% la enfermedad se limita sólo al colon. En la CU el proceso inflamatorio afecta fundamentalmente al recto y se extiende en dirección proximal, restringiéndose el daño a la mucosa colónica (aunque en algunos pacientes, especialmente en pacientes pediátricos, puede verse afectado todo el colon).
- **Apariencia (Foto 1):** La EC se caracteriza por una inflamación transmural de la mucosa gastrointestinal y por lesiones no contiguas, la pared del colon puede estar engrosada y, debido al patrón intermitente de tejido enfermo y sano presenta apariencia

de "empedrado". Normalmente en la CU, la pared del colon es más delgada y se observa una inflamación continua de la capa mucosa, pudiendo también afectar ocasionalmente a la submucosa. A menudo, la CU se caracteriza por

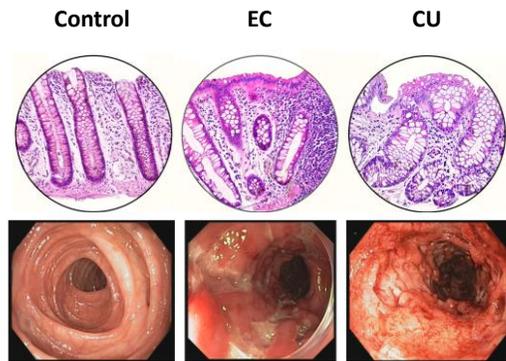


Imagen 1. Histología (Tinción hematoxilina y eosina) e imágenes de endoscopias de pacientes controles, con Enfermedad Crohn's (EC) y Colitis ulcerosa (CU) en intestino humano.

sangrado gastrointestinal. El estudio radiológico de pacientes con EC muestran la presencia de signos característicos como fistulas, abscesos abdominales, asimetría y afectación del íleon. En contraste, los pacientes con CU muestran un daño continuo, sin fistulas ni signos de daño a nivel del íleon.

- Perfil inmunológico:** Antes de entrar en materia, es importante acotar el origen de las células en el cual se basa el perfil inmunológico que presenta la EII. Las células T CD4+ coadyuvantes vírgenes (Th0) se diferencian en distintos linajes incluyendo Th1, Th2, Th17 y T reguladoras (Treg). El destino celular de las células Th depende del tipo y fuerza de los estímulos que estas reciben y de los subsecuentes patrones de expresión génica. Cada uno de estos linajes Th tiene funciones específicas en la homeostasis y defensa inmune. Tradicionalmente, la EII se ha regido en base al paradigma Th1 o Th2, dependiendo a la patología en estudio, la EC parece ser una respuesta exacerbada de tipo th1, con un incremento de células T productoras de Interferón Gamma (IFN γ , por sus siglas en inglés), interleukina (IL)-12 y Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α , por sus siglas en inglés), por el contrario, la CU ha sido calificada como de tipo Th2, con secreción de IL-4, IL-5, IL-13. Sin embargo como veremos más adelante, la idea excluyente entre Th1 y Th2 es demasiado simplista, y es posible que las dos respuestas coexistan hasta cierto punto. Además, la contribución de la respuesta Th17

como efector en la EII ha sido puesta de manifiesto, especialmente en el caso de la EC (120,121).

Tabla 2. Diferencias entre Enfermedad de Crohn y Colitis ulcerosa.

Diferencia	Enfermedad de Crohn	Colitis ulcerosa
Localización	La inflamación puede ocurrir en cualquier segmento a lo largo del tracto digestivo, desde la boca hasta el ano.	La inflamación ocurre exclusivamente en la capa mucosa del colon.
Inflamación	Inflamación asimétrica, en parches.	Inflamación continua del colon.
Apariencia	La pared del colon luce engrosada y semeja en apariencia a un "empedrado"	La pared del colon luce más delgada y enseña una inflamación continua
Grado de inflamación	Puede presentarse ulceraciones profundas a lo largo del tracto digestivo y lograr extenderse a todas las capas de la pared intestinal.	La inflamación sólo es capaz de afectar la capa de la mucosa.
Sangrado	No es común.	Puede haber sangrado rectal al momento de la defecación.
Perfil inmunológico	Perfil Th1	Perfil Th2

La severidad de la enfermedad en pacientes con EII es importante en el manejo clínico de la misma y puede predecir los resultados a largo plazo. Se puede evaluar objetivamente usando un índice de actividad de la enfermedad, la clasificación de Montreal. De esta forma la CU puede clasificarse en remisión clínica, colitis leve, colitis moderada y colitis severa. En el caso de la enfermedad de Crohn abarca otros parámetros como edad a la que se diagnostica dicha patología, su localización y la forma en que procede la misma.

Tabla 3. Síntomas de la Enfermedad de Crohn y la Colitis ulcerosa

Síntomas de la enfermedad de Crohn	Síntomas de la Colitis ulcerosa.
<ul style="list-style-type: none"> • Dolor abdominal, calambres o hinchazón • Anemia • Fiebre • Sangrado gastrointestinal • Dolor en las articulaciones • Malabsorción • Diarrea persistente o recurrente • Úlceras estomacales • Vómito • Pérdida de peso 	<ul style="list-style-type: none"> • Dolor o molestia abdominal • Anemia causada por hemorragia grave • Diarrea con sangre • Deshidratación • Fatiga • Fiebre • Dolor articular • Pérdida del apetito • Malabsorción • Sangrado rectal • Evacuaciones urgentes • Pérdida de peso

3.2 EPIDEMIOLOGÍA

Múltiples estudios han evaluado la epidemiología de la EII en varias zonas geográficas. Los análisis epidemiológicos demuestran que la EII presenta una prevalencia combinada de 300-400 casos por cada 100.000 habitantes en países desarrollados en la zona norte como en Norteamérica y Europa del norte, con tasas de incidencias que van desde 3-14 casos por cada 100.000 habitantes (122,123). Igualmente algunos estudios han indicado que la prevalencia es más baja en países subdesarrollados y aquellos que se encuentran en la zona sur, como América del Sur, el Sudeste de Asia y África (124), aunque recientemente se ha observado un rápido aumento en algunas de estas regiones, especialmente en Brasil y China. La variación en las tasas de incidencia por ubicación geográfica puede ser debida a factores ambientales, como la industrialización, el saneamiento, la higiene y el acceso a la atención sanitaria (124). Las tasas de prevalencia y de incidencia también difieren según la raza (ejemplo: Afroamericanos, Asiáticos, Hispanos y Caucásicos) y etnias (ejemplo: judíos frente a no judíos) (125,126), lo que implica un importante papel tanto de los factores ambientales como la influencia genética (127,128).

Con respecto a la variación estacional, algunos estudios apuntan que existe una mayor incidencia en primavera, sin embargo, la magnitud de esta asociación es débil, ya que los datos publicados al respecto son muy contradictorios (129–139).

La incidencia de la EII puede haber cambiado con el tiempo (140–144), de hecho, parece que la incidencia de EC se ha estabilizado y ahora es aproximadamente equivalente a la CU en América del Norte y Europa.

Por otro lado, existe una correlación entre la EII y la edad de inicio de la enfermedad, apareciendo la mayoría de los casos de CU y EC en la adolescencia y en adultos jóvenes. La mayoría de los estudios muestran un pico de la enfermedad entre los 15 y 25 años. Numerosas investigaciones sugieren también una distribución bimodal de la edad para ambos trastornos con un segundo pico entre 50 y 80 años (139). No está claro si este segundo pico está relacionado con una mayor susceptibilidad a la enfermedad como consecuencia de un aumento de la edad, de la expresión tardía de una exposición ambiental anterior o, como secuela de un mal diagnóstico.

La distribución de la enfermedad en relación al género, ha cambiado a lo largo del tiempo, aunque en la actualidad hay un ligero predominio de EC en el

género femenino y de CU en el género masculino (139,145). El predominio femenino, especialmente en mujeres en la adolescencia tardía y la adultez temprana, sugiere que factores hormonales pueden jugar un papel importante en la expresión de la patología (146,147).

3.3 ETIOLOGÍA

La EII es considerada una enfermedad idiopática y multifactorial. A lo largo de los años han sido propuestas un gran número de teorías para explicar la patogénesis de la misma que abarca desde causas infecciosas, psicosomáticas, sociales, metabólicas, vasculares, genéticas, alérgicas, inmunológicas y autoinmunes. En la actualidad existe un consenso general que afirma que la EII es el resultado de los efectos combinados de cuatro componentes básicos: cambios globales en el medio ambiente, aporte de múltiples variaciones genéticas, alteraciones en la microbiota intestinal y alteraciones de la respuesta inmune tanto innata como adaptativa. De igual manera también se ha acordado que ninguno de estos fenómenos por sí solos tendría la facultad de desencadenar o mantener una inflamación intestinal, pero la interacción de los mismos podría determinar que emergiera el fenotipo clínico de la EII. La coexistencia de estos factores provoca una respuesta inmunológica no regulada a nivel de la mucosa intestinal, dando lugar a una inflamación intestinal crónica.

- **Predisposición genética**

Múltiples variaciones genéticas han sido implicadas en la patogénesis de la EII. Aproximadamente del 10 al 25% de los individuos con EII tienen un familiar de primer grado con EC o CU (148–150). La evidencia más fuerte de que los factores genéticos contribuyen a una mayor susceptibilidad a padecer la enfermedad viene dada por estudios con gemelos (151,152). Sin embargo, no existe un 100% de concordancia entre gemelos monocigóticos, lo que refleja la influencia de otros factores (153–156). Aunque el componente genético es más fuerte en la EC que en la CU, y a pesar de poseer características clínicas distintas, alrededor del 30% de *loci* genéticos relacionados con la EII son compartidas por ambas afecciones, lo que podría indicar que estas enfermedades precisan vías comunes (157,158). El análisis de los genes y *loci* genéticos implicados en la EII muestran diferentes vías que son cruciales para la homeostasis intestinal, incluyendo la función barrera, restitución epitelial, defensa microbiana, regulación inmune innata, generación de especies reactivas de oxígeno,

autofagia, regulación de la inmunidad adaptativa, estrés del retículo endoplasmático y las rutas metabólicas asociadas con la homeostasis celular.

Además, la EII está notoriamente asociada con síndromes genéticos bien definidos, como el síndrome de Turner, el síndrome de Hermansky-Pudlak y la fibrosis quística en el caso de la EC (159). Aunque se ha observado que la alteración individual de ciertos genes en ratones, es capaz de producir un síndrome similar a la EII, estudios de asociación del genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés) han implicado a más de 160 *loci* de susceptibilidad en la EII.

El primer gen de susceptibilidad a EII que se identificó fue NOD2 (dominio de oligomerización por unión de nucleótidos que contiene la proteína 2) también llamado IBD1 o CARD15. Se han caracterizado tres mutaciones distintas en este gen (Arg702Trp, Gly908Arg y Leu1007insC). Estas mutaciones se relacionan con la localización ileal y no colónica, excluyendo de esta manera a la CU (160,161). NOD2/CARD15 se expresa en células epiteliales intestinales (IEC, por sus siglas en inglés) (incluyendo, en particular, células de Paneth), células mononucleares, y probablemente constituye un componente clave de la respuesta de la inmunidad innata en la mucosa a las bacterias luminales (162). La proteína codificada por este gen pertenece a la superfamilia de receptores de reconocimiento de patrones moleculares que detectan polisacáridos bacterianos y activa diversas vías inmunológicas entre ellas el factor de transcripción nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B, por sus siglas en inglés), componente clave en la respuesta inflamatoria.

Tanto en la EC como en la CU se han encontrado variaciones en el gen del receptor de IL-23 (IL23R) (163), desempeñando una actividad protectora en este caso (164). También han sido implicados componentes de señalización del receptor de IL-10 (IL-10R), incluyendo polimorfismos del gen IL10RA, estreptotricina-acetiltransferasa (SAT3), tirosina quinasa 2 (TYK2), Janus quinasa 2 (JAK2) y la interleukina 10 (IL-10) por se.

En el cromosoma 12q12 se han identificado tres genes asociados a autofagia ATG16L1, IRGM y LRRK2 relacionados con EC (165–167).

Asimismo, los cambios genéticos pueden afectar a secuencias de unión de factores de transcripción, accesibilidad a locus, eficiencia en la traducción y a

trans-reguladores tales como los ARN no codificantes y microRNAs (miRNAs). En este sentido los loci implicados en la EII contienen más de 10 secuencias codificantes para miRNAs, lo que apoya la idea de que la regulación de la expresión génica a través de miRNAs puede ser mecanísticamente relevante en la EII (164).

- **Factores ambientales**

Existen algunas causas ambientales como el consumo de tabaco, obesidad, lactancia y algunos medicamentos, las cuales se han establecido firmemente como influencia en el desarrollo de la EII, de igual forma coexisten datos contradictorios y el impacto preciso en alguna de estas causas sigue siendo poco claro.

- Tabaco: fumar es, probablemente, el factor ambiental más ampliamente estudiado y cuyos datos epidemiológicos son concluyentes, por tanto, esto permite establecer una relación taxativa con la EII. El hábito tabáquico aumenta el riesgo y la recurrencia de EC y puede tener un efecto protector en el desarrollo de la CU (168–171). El riesgo de padecer CU aumenta dos años después de dejar de fumar y persiste durante 20 años. La acentuación del riesgo asociado con dejar de fumar podría explicarse por pérdida del efecto protector del consumo de tabaco, lo que ocasiona la aparición o desenmascara los síntomas de la CU.

- Dieta: Dada la constante exposición intestinal a numerosos antígenos dietéticos lumenales, parece razonable postular una relación entre la dieta y la EII. Sin embargo, no se han identificado antígenos patógenos específicos. En gran parte el conflicto de dilucidar este aspecto puede deberse a la dificultad en reconstruir la dieta correspondiente. Existen estudios que han intentado asociar dietas específicas con el desarrollo de la EII y aunque se han obtenido resultados contradictorios, algunos datos sugieren que una dieta de estilo "occidental" (procesados, fritos y alimentos azucarados) se asocia con un mayor riesgo de desarrollar EC, y, posiblemente, CU. Algunas investigaciones han implicado factores de riesgo dietéticos con EII, como la hipersensibilidad a la proteína de la leche de vaca en la infancia (172), el consumo de azúcar refinado (173–175), disminución de la ingesta de verduras y fibra (174,176), aumento en la ingesta de grasa total, grasa animal, ácidos grasos poliinsaturados y la proteína de la leche (175–178). Además, varios estudios han apoyado el tratamiento de la EII con preparaciones a base de aceite de pescado que contienen ácidos grasos

esenciales poliinsaturados omega 3 (179,180). La ingesta dietética de estos ácidos grasos puede modular la respuesta inmune al disminuir la producción de citoquinas y leucotrieno B4, un mediador inflamatorio con potentes propiedades quimiotácticas de neutrófilos (181). Curiosamente, la incidencia de EII es más baja en Japón, un país con un alto consumo de pescado (176,182).

- Obesidad: No está claro si la obesidad pueda asociarse con un mayor riesgo de desarrollar EII (183,184). No obstante, la acumulación de grasa intra-abdominal puede contribuir a la inflamación de la mucosa y esto a su vez puede afectar la evolución de la EII ya establecida (185–187).

- Infecciones: Un desequilibrio o disbiosis en el microbioma intestinal puede contribuir al desarrollo de la EII. Se ha sugerido una correlación entre microorganismos específicos, gastroenteritis aguda y EII (188–191). Muestra de este hecho, se ha sugerido una asociación entre la susceptibilidad a EC y agentes infecciosos específicos (virus del sarampión, Mycobacterium paratuberculosis, paramixovirus) si bien, no ha sido demostrado actualmente (192–196). Existe la hipótesis que explica como la microflora intestinal normal puede contribuir al desarrollo de la EII en individuos susceptibles. Este acontecimiento se apoya en algunos estudios en los cuales se ha observado que animales que son manipulados genéticamente para ser susceptibles a la EII no desarrollan la enfermedad cuando son criados en un ambiente libre de gérmenes (197,198).

- Lactancia y otras circunstancias perinatales: La lactancia materna estimula el desarrollo y la maduración de la mucosa gastrointestinal, asimismo, se ha descrito que la leche materna posee propiedades inmunológicas per se (199–202) además de contar con la facultad de proteger de infecciones gastrointestinales en la infancia (203,204). Aunque, hay estudios que desestiman la asociación de la lactancia materna con la EC (205) o la CU, se ha confirmado el hecho de una elevada incidencia de enfermedades diarreicas en la infancia con un posterior desarrollo de CU (206)(207). Otro factor a considerar es el retraso en el consumo de la leche de vaca como consecuencia de la propia alimentación con leche materna. No obstante no se han encontrado evidencias de asociación entre alergias alimentarias y el desarrollo de EII (208,209).

- Antibióticos: Se ha planteado la hipótesis de que la alteración de la flora intestinal por el uso de antibióticos, es un factor de riesgo para la EII. Aunque el uso de antibióticos podría estar asociado con la EII, es importante recalcar que aun no se ha podido constatar si se trata de una asociación causal (205,210–

212). Sin embargo, estudios recientes muestran que, antibióticos a los que se le han conferido propiedades inmunomoduladoras como la minociclina, consiguen figurar como una ventaja en modelos experimentales de EII debido a su capacidad para restaurar el equilibrio microbiano en el intestino, mientras que hay un descontrol de la respuesta inmune alterada (213–215).

- Isotretinoína: Se han reportado casos que vincula el uso de tratamiento para combatir el acné vulgaris con Isotretinoína con el desarrollo de EII (216–223).

- Antiinflamatorios no esteroideos (AINES): Los AINES pueden aumentar el riesgo de desarrollar EII con una variedad de efectos que van desde inflamación asintomática de la mucosa a la estenosis, obstrucción, perforación y hemorragia grave (224). El mecanismo de acción de los AINES es bloquear la ruta de la ciclooxigenasa en el metabolismo del ácido araquidónico (225). Teniendo en cuenta el posible papel de las prostaglandinas en la inflamación intestinal, no es del todo sorprendente que estos fármacos puedan influir en la EII. Los datos disponibles relativos al uso de inhibidores selectivos de la COX-2 sugieren que la mayoría de los pacientes toleran el tratamiento, al menos, a corto plazo sin exacerbación de la enfermedad (226,227). El uso de AINES y aspirina puede interrumpir las acciones que ejerce la ciclooxigenasa a nivel de la barrera epitelial intestinal, lo que podría perturbar la interacción entre el microbioma intestinal y las células inmunes que se encuentran en el mismo. Además, los AINES y la aspirina alteran la agregación plaquetaria, la liberación de mediadores de la inflamación, y la respuesta al estrés microvascular, los cuales son acontecimientos clave en la patogénesis de la EII. Aunque varios estudios indican que los AINES aumentan el riesgo para el desarrollo de la EII (228,229) y pueden exacerbar la EII subyacente (230–233), el riesgo absoluto parece ser menor y algunos pacientes con EII parecen ser capaces de tolerar AINES, sobre todo cuando son administrados a bajas dosis (234,235).

- Anticonceptivos orales y terapia de reemplazo hormonal: pueden predisponer al desarrollo de la EII a través de efectos trombóticos en la microvasculatura. Sin embargo, dada la existencia de datos discordantes en relación con una asociación y, si está presente, el riesgo parece ser bajo (236–239).

- Apendicectomía: Un número de estudios han sugerido que la apendicectomía puede proteger contra el desarrollo de la CU, pero el

mecanismo del efecto protector es desconocido (191,240–243). Una hipótesis es que las alteraciones en la respuesta inmune de la mucosa que conducen a apendicitis o las resultantes de la apendicectomía pueden afectar a los mecanismos patogénicos de la CU (244,245).

- Factores psicosociales: Estudios sobre la asociación existente entre factores psicológicos y el riesgo de desarrollar EII han arrojado resultados inconsistentes (246–248). Sin embargo, el estrés parece tener un papel en la exacerbación de los síntomas en pacientes con EII establecida, posiblemente a través de la activación del sistema nervioso entérico y la producción de citoquinas proinflamatorias (249,250).

- **Factores inmunológicos y microbianos**

La barrera física del epitelio intestinal se complementa con la presencia en la mucosa de un sistema inmune innato perfectamente desarrollado, preparado para la defensa frente a la incursión de patógenos y a su vez limita la consecuente respuesta inflamatoria generada y así mantener un estado de hiporespuesta a las bacterias comensales. No obstante, también es un brazo efector que media la inflamación intestinal. Alteraciones en la respuesta inmune han sido ampliamente vinculadas a la patogénesis de la EII y son numerosas las investigaciones existentes acerca de la ejecución de estos roles (251).

Se ha propuesto como causa de EII en individuos genéticamente predispuestos, una respuesta inmune exagerada a componentes lumbinales, si bien, muchos aspectos de esta respuesta no se conocen con precisión hasta la fecha. En la caracterización de la respuesta inmune en la EII activa, predominan los linfocitos CD4+ de la mucosa (118,252). Tradicionalmente, en el contexto del paradigma Th1 / Th2, se estableció que la EC difería de CU en que la EC parecía estar mediada por citoquinas Th1 (IFN- γ (253,254) e IL-12 (255,256)), consecuencia de la activación del factor de transcripción transductor de señal y activador de la transcripción 4 (STAT-4, por sus siglas en inglés), necesario para la diferenciación de células Th vírgenes a células Th1 (257). Por el contrario, la CU se considera con frecuencia como una respuesta de tipo Th2, caracterizada por el aumento de la producción del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) e IL-5, pero sin alteración en la expresión de IL-4 (258).

Después de la identificación y caracterización de la nueva subpoblación de células T, las Th17, productoras de IL17 en pacientes con EC (259,260),

evidencias reciente sugiere que las observaciones atribuidas a las alteraciones en las poblaciones de Th1 y Th2 en realidad pueden resultar de la regulación de esta nueva población. Además, la microbiota tiene un papel importante en la localización preferencial de las células Th17 en el intestino (261).

Las citoquinas relacionadas con el espectro de Th1 / Th17 / Th2 son las principales responsables del tipo de inflamación que caracteriza a la forma de EII con la que están asociados. Hay, sin embargo, un grupo bien conocido de citocinas adicionales producidas por células epiteliales, células inmunes y células del músculo liso, tales como TNF α , IL-1 β e IL-6, que son más ambiguas en su función ya que están asociados con ambas formas de la EII en mayor o menor grado (252). Unido a esto, la reducción del número de células T reguladoras (Treg), caracterizada por CD4+, CD25+, y Foxp3, y que producen IL-10 y/o TGF- β , podrían ser igualmente importantes (262). La microbiota también tiene un papel en la promoción de la respuestas de células Treg intestinales, ya que, por ejemplo, en ratones libres de gérmenes la acumulación de éstas células se reduce a nivel colónico y se ve incrementada por la introducción de determinadas bacterias (263).

Por último, hay otros tipos celulares que pueden mediar el mantenimiento y desarrollo de la EII, como las células T CD8+ (264,265), células asesinas naturales T (NKT) (266), células asesinas naturales (NK) (267), células dendríticas (CD) (268,269) y las células productoras de anticuerpos o linfocitos B (270), entre otros. Un aumento de los procesos efectores y una disminución en la función reguladora de las células T y de diversas citocinas inflamatorias podrían conducir a un desequilibrio y la consiguiente inflamación crónica inmune.

3.4 TRATAMIENTO MÉDICO EN LA EII

El tratamiento médico de la EII no proporciona una cura para la enfermedad. Por lo tanto, el objetivo principal es inducir y mantener la remisión, para mejorar la calidad de vida del paciente y para prevenir complicaciones de la enfermedad. Existe una variedad de tratamientos, con diferentes ventajas y desventajas. El tratamiento médico actual de la EII se basa en el uso de medicamentos antiinflamatorios e inmunosupresores con especificidad restringida, efectos secundarios severos y beneficios a largo plazo limitados (271,272).

- **Aminosalicilatos:** El ácido 5-aminosalicílico (5-ASA), también llamado mesalazina, se ha caracterizado por ejercer efectos antiinflamatorios en la EII, especialmente en la CU, así como diversos fármacos que contienen y liberan dicha molécula y que han sido administrados desde hace algunos años para el tratamiento de esta patología, como ocurre en el caso de la sulfasalazina (5-ASA unido a sulfapiridina) (273–275), el primer fármaco que fue usado para provocar la remisión de la CU activa (276). Los aminosalicilatos generalmente no tienen problemas de tolerancia y presentan moderados efectos adversos (277). Su efecto depende de la porción 5-ASA (278,279), que en el caso de la sulfasalazina es liberada de la sulfapiridina a nivel colónico por medio de las azoreductasas de la flora intestinal, lo que justifica su ineficiencia en la EC manifiesta en el intestino delgado. Los aminosalicilatos actúan tópicamente por lo que su eficiencia depende de la concentración alcanzada en el lumen (277,280,281). Por tanto el fármaco ha de llegar intacto al lugar de la inflamación, por lo que generalmente la estrategia usada son las fórmulas de liberación controlada.

Aunque no está completamente dilucidado, su mecanismo de acción no se debe a la modulación de la síntesis de prostaglandinas, como ocurre en el caso de los salicilatos (282,283), sino que parecen alterar al factor de transcripción NF- κ B con la consiguiente modificación en la producción de mediadores inflamatorios. De este modo se ha demostrado que la sulfasalazina bloquea la degradación de I κ B α (284–286), mientras que la molécula de 5-ASA en su forma libre impide la fosforilación del factor de transcripción p65 o también llamado RelA, el cual se une a NF- κ B1 o NF- κ B2 para formar el complejo NF- κ B (287).

- **Glucocorticoides:** Estos fármacos son eficaces para el tratamiento de la EII activa y, a menudo se administran para inducir la remisión (288,289), pero no como una terapia de mantenimiento (290). Sin embargo, el tratamiento con glucocorticoides está asociado con efectos secundarios bien conocidos, tales como aumento de peso, hiperglucemia, diabetes, acné, estrías cutáneas, cataratas, osteoporosis, y trastornos en la conducta (291,292). La budesonida, un glucocorticoide de segunda generación, tiene menos efectos secundarios y una mayor actividad anti-inflamatoria, es un fármaco estándar para EC ileocolónica (292,293). Estos medicamentos pueden crear resistencia y causar dependencia, lo que limita su uso en la práctica clínica.

- **Inmunomoduladores:** 6-mercaptopurina, azatioprina (294,295), tacrolimus, ciclosporina (296) o metotrexato, son fármacos que se administran

opcionalmente para mantener la remisión cuando fracasan esteroides intravenosos (288,297). Este tipo de fármacos pueden provocar alergia y toxicidad grave. No obstante, alguno de ellos se usan cada vez más en el mantenimiento de la remisión.

- Anti-TNF: Infliximab, es un anticuerpo monoclonal quimérico humano-murino dirigido contra el TNF α , que se usa para inducir la remisión y en casos refractarios de la EII (298,299). Su uso conlleva un alto riesgo de contraer infecciones oportunistas como la tuberculosis, lo que ocasionaría la limitación del uso extensivo de tratamientos con anticuerpos para TNF α (300). Otros anticuerpos son: adalimumab, certolizumab y etanercept. Adalimumab se construyó a partir de un anticuerpo monoclonal totalmente humano y etanercept es una proteína de fusión que consta de una parte extracelular de 75kDa constituida por la porción de reconocimiento de ligandos del receptor al factor de necrosis tumoral (TNFr) y de otra parte constituida por la porción FC de la inmunoglobulina IgG1. El Certolizumab pegol es un fármaco anti-TNF formado por el fragmento Fab' de un anticuerpo monoclonal murino humanizado unido a dos moléculas de polietilenglicol. El certolizumab pegol reconoce y neutraliza el TNF- α humano, soluble y unido a membrana. Aunque estos fármacos significan un avance terapéutico en este campo, no dejan de causar desconcierto en cuanto al costo y los efectos negativos a largo plazo que pudieran generar. De igual forma es importante mencionar que existen otros fármacos anti-TNF α implicados, como los inhibidores de TNF de pequeño tamaño molecular.

- Otras categorías de modalidades de tratamiento incluyen antibióticos o probióticos.

A pesar de la amplia gama de fármacos utilizados en el tratamiento de la EII, las opciones terapéuticas disponibles actualmente no son completamente satisfactorias. Esta es la razón por la que la cirugía sigue siendo una alternativa terapéutica importante, como colectomía en el caso de la CU y anastomosis en el caso de la EC. La dilatación endoscópica con balón es una alternativa segura y eficaz para la resección intestinal en algunos casos (301)

Existen un gran número de estudios que se han centrado en la fisiopatología de la enfermedad en los que destacan nuevas dianas terapéuticas de crucial importancia.

En la última década se han publicado abundantes investigaciones que muestran la implicación de los miRNAs en la EII (302,303), este hecho ha abierto un gran campo de estudio, proporcionando una potencial herramienta farmacológica.

Se ha descrito que estos minúsculos reguladores genéticos ejercer su papel como posibles blancos en la terapia de la EII y al mismo tiempo pueden ser utilizados como biomarcadores en diferentes enfermedades incluyendo la EII (304–306), lo que indica que pueden participar tanto en el tratamiento como en el diagnóstico de la misma.

4. SISTEMA INMUNITARIO GASTROINTESTINAL

Uno de los aspectos más relevantes de la fisiología intestinal es el hecho de que el sistema inmunológico del intestino presenta unas características propias, que están dadas por las circunstancias especiales de un sistema que incorpora el paso al interior del organismo de microorganismos luminales y de sus componentes moleculares, al tiempo que absorbe agua y nutrientes. Siendo el objeto principal del sistema inmunitario, diferenciar lo propio de lo ajeno, es decir la amplia carga de antígenos procedentes de la alimentación y del número y variedad de bacterias y otros microorganismos asentados a lo largo del tracto gastrointestinal, supone una enorme presión antigénica difícil de controlar. Teniendo en cuenta que la mayoría de dichos antígenos no suponen un riesgo para el organismo, el reto consiste en mantener la capacidad para responder a organismos potencialmente patógenos, al tiempo que se tolera esa mayoría de antígenos no dañinos. A menudo, se utiliza el término "inflamación fisiológica" o "inflamación controlada" para referirnos al estado basal de activación del sistema inmunitario gastrointestinal, aunque se trate realmente de un oxímoron.

Dado que la mucosa intestinal constituye la interfaz física entre nuestro sistema inmunológico y los antígenos externos, no es de extrañar que albergue el tejido linfoide asociado a mucosas de mayor superficie y además contenga la mayor proporción de linfocitos del organismo. Asimismo cuenta con la microbiota bacteriana más abundante y diversa, de la que forman parte más de 500 especies de bacterias (307,308). Para entender de qué forma el sistema inmunológico gastrointestinal está alterado en la EII, es necesario conocer previamente su funcionamiento fisiológico.

- **Homeostasis inmunológica en condiciones intestinales fisiológicas**
(Ilustración 6)

La homeostasis intestinal depende de complejas interacciones, principalmente entre la microbiota que reside en el intestino, el epitelio intestinal y el sistema inmune del hospedador. A continuación se describirá desde distintos ángulos los componentes y procesos de la función de barrera intestinal que participan en el mantenimiento de este equilibrio de autorregulación.

- Microbiota intestinal y tolerancia oral: En general la microbiota intestinal tiene la capacidad de modular la expresión de genes involucrados en diferentes funciones intestinales tales como la absorción de nutrientes, el fortalecimiento de la barrera de la mucosa, el metabolismo de xenobióticos, la angiogénesis o la maduración intestinal postnatal (155). Durante mucho tiempo, se pensaba que durante un embarazo saludable el feto se desarrollaba en un ambiente estéril y la relación simbiótica se preestablecía los primeros 2 o 3 años de vida, sin embargo, se ha descrito la existencia de una interacción entre el feto y microorganismos presentes en la placenta (309,310). Por estas razones existe un interés creciente en la composición de la microbiota la cual está influenciada primariamente por la madre (microorganismos placentarios, parto vaginal o cesárea, la lactancia materna o el uso de fórmulas y factores genéticos) asimismo, las propiedades de la microbiota, vienen definidas por factores que dependen del individuo y de su entorno (particularmente su dieta). Los mecanismos responsables del establecimiento y mantenimiento de la tolerancia oral hacia la microbiota y hacia los antígenos procedentes de la dieta no están del todo esclarecidos y comprenden un complejo conjunto de factores anatómicos, celulares y humorales, que previenen la respuesta inmunológica contra estos antígenos, que si fueran presentados al sistema inmunológico por cualquier otra vía (distinta a la oral), desencadenarían una respuesta inflamatoria (311).

- Barrera epitelial: Originalmente se pensaba que la mucosa intestinal, y en general el epitelio, funcionaban únicamente como barrera ante una invasión bacteriana. Sin embargo, actualmente se reconoce que las IEC, junto con el resto de células del epitelio intestinal, mantienen una compleja y recíproca relación beneficiosa con la microbiota. Debido a que poseen una situación privilegiada al ser la primera línea en contacto con bacterias y antígenos procedentes de la dieta, no es de extrañar que, puedan actuar también como células presentadoras de antígenos (APC). Recientes estudios muestran cómo el epitelio intestinal no solo tolera la presencia de moléculas tipo PAMP (patrones moleculares asociados a patógenos, por sus siglas en inglés) procedentes de bacterias comensales sino que también, aprovecha señales procedentes de la microbiota entérica para el mantenimiento de la función barrera (1,5). Las IEC no sólo están en contacto con antígenos en la cara apical, en la cara basolateral tienen la capacidad de contactar con las principales poblaciones de linfocitos T del sistema gastrointestinal: los linfocitos intraepiteliales que se encuentran dispersos a lo largo del epitelio y los linfocitos T de la lámina propia. Un hecho

importante al cual hacer referencia es que las IEC en su cara apical presentan moléculas que pueden actuar como receptores de antígenos como FcRn (312) o DEC-205 (313), facilitando la entrada de antígenos al interior de la célula a través de endocitosis mediada por receptores. La presentación de antígenos a linfocitos T tiene como objetivo el mantenimiento de la barrera intestinal, la renovación de células epiteliales dañadas por estrés, infección o neoplasia, y la regulación de la respuesta a los antígenos de la superficie de la mucosa.

Cabe destacar que la barrera epitelial no es una estructura estática sino dinámica, regulada principalmente por citocinas que se encuentran en la mucosa intestinal. Diversos estudios *in vitro*, realizados en monocapas de células intestinales, muestran como IFN- γ , L-4 e IL-13 parecen atenuar la función barrera (314,315).

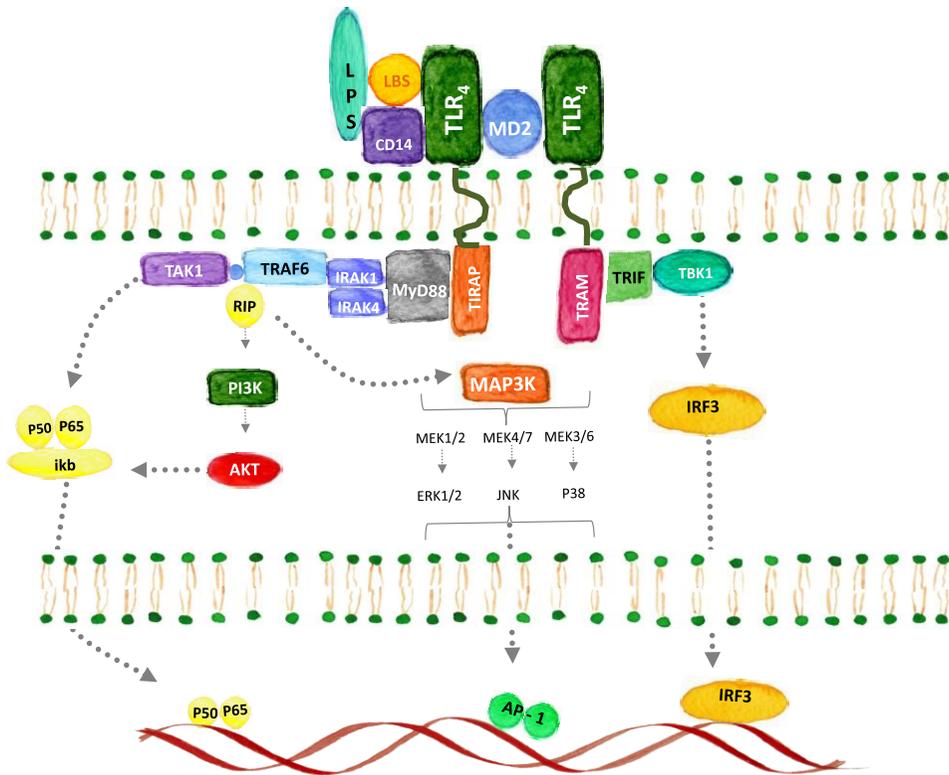
○ Reconocimiento antigénico e inmunoregulación: el reconocimiento y procesamiento de antígenos lumbinales comienza a nivel epitelial (316). La necesidad de desarrollar mecanismos reguladores entre el sistema inmunitario y la microbiota surge del reto que supone, por un lado, proteger frente a organismos patógenos y, por otro, tolerar aquellos organismos beneficiosos o al menos no dañinos para el organismo. El control de la microbiota recae en gran medida en el sistema inmunitario innato, que utiliza distintos receptores los cuales actúan como sistema de comunicación entre bacterias y hospedador. Estos son denominados receptores de reconocimiento de patrones (PPR, por sus siglas en inglés), o bien receptores de patrones moleculares o de patrones moleculares asociados a daño. Estos receptores tienen la capacidad de reconocer moléculas con componentes microbianos específicos tales como ácidos nucleicos exclusivos de los microorganismos como el RNA bicatenario que poseen los virus en proceso de multiplicación, secuencias de DNA CpG sin metilar que aparecen en las bacterias; ciertos rasgos propios de las proteínas presentes en los microorganismos, como su inicio por *N*-formilmetionina, típico de las proteínas bacterianas, y lípidos e hidratos de carbono complejos, sintetizados por los microbios, pero no por las células de los mamíferos, como los lipopolisacáridos (LPS) de las bacterias gram-negativas, los ácidos teicoicos de las gram-positivas y los oligosacáridos que llevan mucha manosa, existentes en las glicoproteínas microbianas, pero no en la de los mamíferos. Las tres grandes familias PRR incluyen los TLR (receptores tipo Toll, por sus siglas en inglés), los NLR (receptores tipo NOD, por sus siglas en inglés) y los RLR (receptores tipo RIG, por sus siglas en inglés). La estimulación de estos

receptores implica la activación de diversas vías de señalización que culminan en la producción de citocinas proinflamatorias y productos antimicrobianos (5).

Tabla 4. Patrón de expresión de TLR y sus ligandos.

TLR	Ligandos	Células	Localización celular
TLR1/2	Lipopéptido bacteriano Proteínas procedentes de protozoos parásitos (T cruzi Tc52, profilin)	Mayoría de las células incluyendo células dendríticas e IEC	Membrana plasmática
TLR 2	Lipoproteínas bacterianas/lipopéptidos, peptidoglicanos, ácido lipoteicoico, porinas, zimosán Proteínas víricas estructurales (Lipoarabinomano) Lípidos procedentes de helmintos Componentes de la pared celular de hongos HSP60 HSP70, HSP96 HMGB1, ácido hialurónico de carácter endógeno	IEC, células de Paneth, leucocitos mononucleares periféricos, células dendríticas, monocitos y células T	Membrana plasmática
TLR 3	RNA vírico, Poly-mRNA (I:C), Poly (I:C ₁₂ U) mRNA endógeno	IEC, células dendríticas, Endosomas Células NK y células T	Endosomas
TLR 4	Lipopolisacárido bacteriano proteínas de envoltura vírica Protozoos parásitos Glicoinositolfosfolípidos (<i>Trypanosoma cruzi</i>) Componentes de la pared celular de hongos HSP22, HSP60, HSP70, HSP96, HMGB, defensina 1β, dominio A de la fibronectina, ácido hialurónico, sulfato de heparina, fibrinógeno, proteína A surfactante	IEC, células de Paneth, macrófagos, células dendríticas y células T	Membrana plasmática
TLR 5	Flagelina	IEC, células de Paneth, monocitos, células dendríticas, células NK y células T	Membrana plasmática
TLR6/2	Lipopéptidos bacterianos, ácido lipoteicoico Modulina soluble en fenol, zimosán	IEC, alta expresión en células B y células dendríticas, baja expresión en monocitos y NK	Membrana plasmática
TLR 7	RNA de cadena simple de origen vírico RNA endógeno	IEC, células B, células dendríticas, monocitos y células T	Endolisosoma
TLR 8	RNA de cadena simple de origen vírico RNA endógeno	IEC, monocitos, células dendríticas, células NK y células T	Endolisosoma
TLR 9	Motivos CpG no metilados procedentes de bacterias, virus o protozoos parásitos Hemozoina procedente de protozoos parásitos (<i>Plasmodium</i>) Oligodesoxinucleótidos CpG endógenos	IEC, células de Paneth, células dendríticas, células B, leucocitos mononucleares periféricos, macrófagos, células NK y células microgliales	Endolisosoma y membrana plasmática
TLR 10	Desconocido, podría interactuar con TLR2 y TLR1	Células B, células dendríticas, monocitos y células T	Intracelular
TLR 11	Superficie celular de bacterias uropatógenas, Moléculas tipo profilina de <i>Toxoplasma gondii</i>		Membrana plasmática

Los receptores tipo Toll son receptores transmisores de señales de membrana que ocupan un lugar fundamental en la defensa innata contra los microorganismos. Los genes de los TLR han permanecido muy conservados durante la evolución y están presentes en *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* y en mamíferos, de hecho estos fueron descritos por primera vez en *Drosophila melanogaster* (317,318). Existen de 10 a 15 receptores del tipo TLR (dependiendo de la especie) identificados hasta la fecha, estos están individualmente especializados, pero considerados como un conjunto son capaces de reconocer la mayor parte de los PAMP. Pueden localizarse tanto en la superficie como intracelularmente, según el tipo. La localización y sus ligandos más comunes se describen en la *Tabla 4*. Estructuralmente los TLR presentan una región extracelular que contiene repeticiones ricas en leucina (LRR) (319,320), y una región intracelular denominada dominio TIR (debido a su similitud con la familia de receptores de IL-1), encargada de transmitir la señal. Una vez unido el ligando, se produce una homo- o heterodimerización del receptor. Existen 5 proteínas adaptadoras que contienen el dominio TIR y que actúan en distintas combinaciones dependiendo del TLR (MyD88, TIRAP, TRIF, TRAM y SARM) (321). Todos los TLR presentan MyD88 como proteína adaptadora, a excepción de TLR3. El reclutamiento de distintas proteínas conlleva a la activación de diversos factores de transcripción y la consiguiente producción de citoquinas proinflamatorias y otras acciones. TLR4, es, probablemente, el TLR más estudiado, responde a LPS mediante una vía dependiente y otra vía independiente de MyD88. A través de la vía dependiente de MyD88, IRF5, NF- κ B y AP1 son activados, iniciándose la transcripción de genes proinflamatorios. La vía independiente de MyD88 implica la activación de NF- κ B e IRF3 y la consiguiente producción de interferones tipo I (322). (*Esquema 1*)



Esquema 1. Ruta de señalización

Con la finalidad de examinar la relación existente entre las IEC y las bacterias comensales, se han realizado un gran número de trabajos que tratan de dilucidar si el epitelio intestinal expresa TLR en condiciones fisiológicas y, de ser así, si dicha expresión en el epitelio es de tipo espacial o regional. Debido a la expresión de estos receptores en diferentes tipos celulares como macrófagos, células dendríticas, células B, células T y células estromales, resulta complejo determinar la expresión de TLR, específicamente en IEC, partiendo de tejidos intestinales. Es por esto que técnicas como inmunohistoquímica, separación enzimática de células epiteliales intestinales o microdissección por captura láser han sido utilizadas para demostrar que las IEC pueden expresar débilmente tanto TLR2 como TLR4 en tejidos sanos de colon humano (323–325). TLR3 parece expresarse abundantemente en intestino delgado y colon humano sano, mientras que TLR5 se expresa predominantemente en colon (324). Algunos estudios indican que en IEC de intestino delgado humano se expresan TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 y TLR9 (323).

En la EII se producen alteraciones en la expresión de TLR. IEC procedentes de pacientes con EII mostraron una expresión muy elevada de TLR4 y similar o baja expresión de TLR2, TLR3, TLR5 y TLR9 (324,326–328). Por otro lado se ha demostrado que las citocinas inflamatorias y antígenos bacterianos regulan la expresión de TLR en IEC (328–331) lo que puede dar lugar a una expresión selectiva de los receptores en función del tipo de peligro (332). Estudios actuales muestran que IFN- γ y TNF- α inducen la transcripción de TLR4 y su correceptor LY96 (antígeno 96 de linfocito, por sus siglas en inglés, también conocido como MD2[proteína de diferenciación mieloides]) (328,330) mientras que IL-4 e IL-13 disminuyen la respuesta de las IEC a LPS, ligando del TLR4, lo que sugiere que las citocinas tipo Th2 podrían disminuir la expresión de TLR4 por parte de las IEC (329,333). Estudios que comparan ratones libres de gérmenes (germ-free) con ratones convencionales revelan que las bacterias comensales inducen la expresión de ciertos TLR (TLR2, TLR4 y TLR5) (334). Mediante inmunohistoquímica se ha detectado la expresión de TLR9 en la cara apical del borde en cepillo de colon de ratones con microbiota entérica, pero no en ratones libres de gérmenes (335).

La expresión de TLR en el intestino también está regulada de manera espacial, es decir existe expresión polarizada, apical o basolateral. Si bien la expresión de TLR2 y TLR4 es baja en colon adulto sano (324), TLR4 tiene una alta expresión en la cara apical de IEC colónica procedentes de pacientes con EC, aunque no en CU (324). El análisis de IEC polarizadas humanas *in vitro* indican que TLR5 se expresa solamente en la cara basolateral, donde puede desencadenar la producción de citocinas y quimiocinas en respuesta a flagelina basolateral (336–338). En consecuencia la flagelina luminal sólo podría activar al TLR5 tras daño en la barrera epitelial (338), sin embargo otro estudio indica que TLR5 está presente en la cara apical de íleon de ratón (339). En cuanto al TLR9, su estimulación apical da lugar a una inhibición de NF- κ B, mientras que una estimulación basolateral lo activa. De hecho, la activación apical de TLR9 inhibe la respuesta inflamatoria desencadenada tras la estimulación basolateral, alcanzando lo que se conoce como un estado de tolerancia cruzada (Cross-tolerance). Esto sugiere que no solo la localización, sino también la función de los TLR puede ser polarizada (337).

Estas respuestas divergentes de los TLR en función de la exposición apical o basolateral al ligando son consistentes con la hipótesis de que las respuestas

inmunológicas de los TLR hacia los PAMP varían en función de la existencia o no de una brecha en la barrera epitelial.

Tras el reconocimiento antigénico, los TLR desencadenan una respuesta tanto innata como adaptativa, mediante vías de señalización intracelulares que culminan en la activación de factores de transcripción como NF- κ B, y proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK, por sus siglas en inglés), lo que induce la producción de citocinas proinflamatorias. En ausencia de patógenos, la interacción de los TLR con la microbiota está relacionada con la proliferación de células epiteliales, la producción de IgA, el mantenimiento de las uniones estrechas y la expresión de péptidos antimicrobianos, contribuyendo así a la homeostasis intestinal y al mantenimiento de una barrera intestinal intacta (340).

Los NLR aportan mecanismos de defensa adicionales en la mucosa intestinal (341,342). NOD1 y NOD2 se expresan en el citosol celular de células presentadoras de antígenos (APC) expuestas a patógenos que contienen peptidoglicano (343). A nivel basal, la expresión de NOD1 y NOD2 en células epiteliales intestinales es baja o nula, aunque esta expresión se incrementa en casos de inflamación o en presencia de citocinas proinflamatorias (344,345). En el intestino delgado, los mayores niveles de expresión de NOD2 se dan en células de Paneth (346,347). En modelos de sobreexpresión de NOD2, la estimulación con muramildipéptido se traduce en la activación de NF- κ B, lo que, junto con la habilidad de las citocinas inflamatorias como TNF- α para activar NOD2, sugiere que este participa en la respuesta inmune innata contra patógenos microbianos (344,348,349). Sin embargo la función de NOD2 es objeto de debate ya que estudios con roedores y humanos han mostrado resultados discordantes: tanto una pérdida como una función excesiva del receptor en células que contienen mutaciones en el gen CARD15 (350). Específicamente, la función de NOD2 en células epiteliales intestinales esta insuficientemente caracterizada, aunque la producción reducida de α -defensinas en ratones con mutaciones en el gen CARD15 sugiere que éste regula la función de células de Paneth (351,352). Sin embargo, la importancia de este hecho es incierta, ya que ratones sin la forma activa de las α -defensinas o sin células de Paneth no desarrollan espontáneamente inflamación intestinal crónica (352,353).

○ Procesamiento antigénico: La respuesta inmunitaria en el GALT se genera primariamente en las placas de Peyer's, estructuras constituidas por folículos linfoides localizados en la submucosa del intestino, caracterizados por una elevada población de linfocitos, macrófagos, DC y células M. La superficie luminal consta de un epitelio especializado denominado epitelio asociado a folículo (FAE, por sus siglas en inglés), Formado por células M y otras células situadas en las inmediaciones. El FAE presenta unas características estructurales y funcionales que facilitan el acceso de antígenos luminales, como ausencia de microvellosidades, la reducción de hidrolasas y un número reducido de células de Paneth y caliciformes (354). Las células M desempeñan un rol importante en el paso de antígenos a lo largo de la barrera epitelial; no obstante, no poseen complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC II, por sus siglas en inglés). En consecuencia, se supone que no cuentan con la capacidad de procesar antígenos, limitándose a liberarlos intactos a la región subepitelial de las placas de Peyer's, donde son procesados y presentados por APC profesionales (355). Aunque las células M son la vía más estudiada y conocida para el paso de antígenos, a través del epitelio intestinal, en el intestino delgado concretamente, existen otras vías (356). Así por un lado podemos encontrar una vía de paso asociada a células caliciformes o por otro, las denominadas fugas paracelulares (paracellular leak), mediante las cuales los antígenos de pequeño tamaño (menores a 10 kDa), que no pueden ser captados por DC de la *lamina propria*, llegan directamente a los nódulos linfáticos mesentéricos donde las DC residentes los captan y se desarrolla la respuesta inmunológica; además, las DC de la *lamina propria* tienen la capacidad de penetrar a través de las uniones estrechas de las células epiteliales, exponiendo las dendritas a la luz intestinal, adquiriendo la propiedad de reconocer antígenos directamente a ese nivel (357). Aunque los linfocitos B y los monocitos/macrófagos pueden actuar como APC, las DC han sido descritas como las más eficientes del organismo.

Las DC son células clave en el control de la inmunidad o la tolerancia hacia bacterias comensales. En individuos sanos, tras el reconocimiento de antígenos comensales las DC muestran un fenotipo inmaduro, caracterizado por una alta capacidad fagocítica y una baja expresión en su superficie de moléculas MHC-II y de miembros de la familia B7: CD80 y CD86, por lo que no se induce una respuesta en las células T naïve (Th0), fenómeno denominado anergia (358). Las DC son activadas directamente a través de antígenos bacterianos que se unen a reconocedores de patrones como TLR, o indirectamente a través de citocinas proinflamatorias producidas por macrófagos, como TNF- α o IL-1. Como

consecuencia de estos estímulos se transforman en APC potentes caracterizadas por una baja actividad fagocítica, y una elevada expresión tanto de MHC-II como de moléculas co-estimuladoras. En este estado las DC tienen la capacidad de captar, procesar y presentar los antígenos transportados a través de la barrera epitelial por las células M. Asimismo como hemos mencionado anteriormente, las DC tienen la capacidad de expresar proteínas asociadas a TJ lo cual les permite irrumpir a través de la barrera epitelial sin dañarla, entrando en contacto directo con los antígenos del lumen. Una vez han madurado migran hacia los ganglios linfáticos, lugar en el cual activan a linfocitos T naïve hacia respuestas de tipo Th1, Th2 (359–361), Th17 o bien Treg. Igualmente participan en el proceso de cambio de isotipo a IgA en células B a través de BAFF y APRIL o indirectamente a través de un incremento en la producción de IL-6 (362).

- Diferenciación de células T colaboradoras: Una vez que los antígenos son procesados por las APC, estas tienen la capacidad de enseñar los péptidos resultantes a través de MHC-II a las células T naïve (Th0), lo que genera su activación y seguidamente su diferenciación. La naturaleza del antígeno que activa a los linfocitos, provocará la liberación de un tipo u otro de citoquinas por parte de las APC y, de la misma forma, en función de la naturaleza de estas citoquinas se producirá la diferenciación a uno u otro linaje de células T colaboradoras. Continuando este patrón, las citoquinas IL-12, IL-18, IL-23 y TNF- α dirigen la polarización de las células Th0 hacia el subtipo Th1, de forma tal que cuando ocurra la activación exhibirán un fenotipo Th1 y producirán altas cantidades de citoquinas Th1 (IL-2, IFN- γ , TNF- α), las cuales participan en la perpetuación de la reacción inflamatoria; la diferenciación hacia el subtipo Th17 se encuentra mediado por IL-6 y cantidades reducidas de TGF- β (363–366). Estas células presentarán un fenotipo caracterizado por la expresión de IL-17, IL-22 o IL-21, entre otras. La inducción del subtipo celular Th2 está a cargo de la IL-4, que a su vez, como ocurre en el caso de la respuesta Th1, es la principal citoquina en la respuesta Th2, junto a IL-5 o IL-13. En cuanto a las células Treg, la inducción es protagonizada nuevamente por TGF- β pero en esta ocasión en altas cantidades, generando la secreción de citoquinas antiinflamatorias (IL-10, TGF- β), con el propósito de sosegar o contrarrestar la respuesta inflamatoria, pero que en el contexto de la EII no van a ser suficientes, primando la respuesta de carácter proinflamatorio. El subtipo Th3 desarrolla funciones de carácter protector y antiinflamatorio, ya que también son capaces de generar TGF- β . Aparte de tener un papel importante en la activación linfocitaria previamente descrita, las citoquinas generadas por las APC poseen propiedades

proinflamatorias per se, causando la activación de diferentes tipos celulares, como linfocitos presentes en la *lamina propria*, IEC y macrófagos residentes en la mucosa intestinal, difundiendo y prolongando así la reacción inflamatoria. Además hay una producción de quimiokinas debido a la activación de macrófagos y células epiteliales, lo que causa la formación de un gradiente quimiotáctico que favorecerá la extravasación y el movimiento de leucocitos desde el torrente sanguíneo hasta el foco inflamatorio (367).

- **Disfunción del sistema inmunológico intestinal (Figura 6)**

Partiendo de la hipótesis que acepta que la EII resulta de una respuesta inadecuada del sistema inmunológico de la mucosa intestinal hacia la microbiota entérica y otros antígenos lumenales, no es de extrañar que emerjan distintas incógnitas acerca de este particular escenario. El cómo y por qué estos elementos son capaces de generar una respuesta inflamatoria inapropiada sigue siendo un interrogante a día de hoy. La evidencia experimental de estudios *in vitro*, con animales y en humanos sugiere que varios eventos individuales pueden iniciar alteraciones inflamatorias cuya perpetuación hará que converjan en una serie de eventos finales comunes (eventos secundarios).

- **Eventos primarios:** La función barrera intestinal se construye sobre la base del epitelio, el cual constituye una barrera física que separa el dominio luminal del interior de la mucosa, y que regula en buena medida el funcionamiento de los demás componentes, que incluyen la capa de mucus, los péptidos antimicrobianos, la IgA secretora y el sistema inmunológico intestinal. En sentido amplio, podemos considerar asimismo la propia microbiota como parte de este sistema, en la medida en que su composición (y su propia presencia) influye decisivamente en la capacidad de contención de la mucosa intestinal. Desde finales de los años 70 se conoce la relación entre las alteraciones de la permeabilidad a macromoléculas y la EII. Esta alteración es compleja, debido a que la propia inflamación tiende a aumentar dicha permeabilidad, de forma que es difícil separar causa y efecto (368–371). No obstante, se han identificado alteraciones de la permeabilidad en parientes consanguíneos de pacientes de EII (que presentan mayor riesgo) previamente a la aparición de la enfermedad, así como otras similares en modelos animales de colitis no inducida por medios químicos (en los que la colitis se instaura de forma gradual) (1). Algunos de los mecanismos que podrían explicar el daño en la función barrera y que por ende implica alteración en la resistencia y la

permeabilidad de esta, son la ruptura de las TJ por parte de las células T o una alteración del sistema nervioso entérico (369)(372).

Otro hecho destacable es que el sistema inmunitario innato en el epitelio en la EII no funciona con normalidad. Una de las causas, es la modificación de la comunicación entre el sistema inmunitario y la microbiota en la que, como se ha indicado anteriormente, los PRR (TLR, NLR) juegan un papel clave. Un mal funcionamiento de estos puede derivar en la pérdida del control de la inflamación causando la instauración de la EII. Actualmente existen datos con carácter controvertido en lo que respecta al desempeño de los TLR. Depleción de TLR4, Myd88 o del modulador esencial de NF- κ B (NEMO, por sus siglas en inglés) en IEC o en células no hematopoyéticas implican un defecto en la defensa contra la infecciones bacterianas o la inflamación (373)(374)(375), sin embargo la expresión de TLR4 está aumentada tano en la EC como en la CU (376). Por otra parte, TLR3 se encuentra disminuido en pacientes con EC pero no en CU, posiblemente, debido a su expresión en la cara basolateral; en cuanto a la expresión de TLR5, generalmente se encuentra suprimida en la EII, aunque en la mucosa dañada la flagelina puede acoplarse al receptor y agravar la inflamación. Pese a todos estos datos, muchos estudios han demostrado un aumento en la expresión de TLR en la mucosa en EII.

Los estudios genéticos han revelado la importancia de NOD2 en la EII. Se ha observado un incremento en la expresión de éste en IEC, lo que puede desencadenar la activación de la cascada de NF- κ B, hecho que comprometería la habilidad que posee la mucosa de eliminar eficientemente patógenos, dando lugar a la consiguiente inflamación crónica. Diversas citocinas proinflamatorias como TNF- α e IFN- γ pueden ser responsables del aumento en la expresión de este receptor, además un dato relevante es que como consecuencia de un exceso en respuesta al LPS bacteriano existe un aumento en los niveles de expresión de MD2, TNF- α e IFN- γ en el intestino inflamado (377). Al igual que con el TLR4, la relación que existe entre el desarrollo inflamatorio y la alteración de NOD2, en cuanto a mayor o menor eficiencia en su funcionalidad, es bastante debatida. Algunos datos sugieren que el progreso de la EII es el resultado de una menor eficiencia de NOD2 como consecuencia de la alteración genética (165). Sin embargo, como se ha descrito al inicio de este apartado, un aumento en la función de NOD2 potenciaría la actividad de NF- κ B; aunado a esto, un estudio reveló la posible participación de este receptor, no solo a la hora de potenciar la actividad de NF- κ B, sino que además podría estar

involucrado en el procesamiento de la IL-1 β , hecho que ha sido desarrollado en un modelo experimental (378).

Otros mecanismos alterados en el sistema inmunitario en la EII, es el reconocimiento y presentación de antígenos por parte de APC profesionales. Estudios *in vivo* e *in vitro* sugieren que las células dendríticas reconocen de forma incorrecta las bacterias comensales posiblemente debido a una respuesta alterada o exacerbada de los PRR, induciendo una respuesta inflamatoria tipo Th1 y posiblemente Th17. De hecho se ha observado un incremento en la expresión de TLR4 en células dendríticas en la EII (379). Se ha demostrado un aumento en la frecuencia de APC con fenotipo activo o maduro en la mucosa inflamada (379), así como la escasez de APC circulantes inmaduras, potencialmente tolerogénicas (380). En células dendríticas humanas procedentes de pacientes con EII se ha observado un incremento en la expresión de marcadores de destino al intestino (en inglés “gut homing”) y una respuesta aberrante a estímulos tipo LPS o CpG (380). La incapacidad de regulación por parte de estas células podría contribuir a la activación repetitiva de células T de memoria, ocasionando la permanencia de la inflamación.

Las APC no profesionales, como las IEC, que en condiciones normales inducen anergia en células T CD4+, en presencia de citocinas como IFN- γ y TNF- α adquieren un fenotipo activo y aumentan la expresión de moléculas de histocompatibilidad (381). En pacientes con EII se ha observado que las IEC expresan moléculas coestimuladoras alternativas de linfocitos T como CD1d, que inducen la estimulación mediante vías no dependientes de MHC-II, siempre y cuando los antígenos alcancen la cara basolateral de las IEC donde se expresa esta molécula (382).

En el paciente de EII se instaura una respuesta de tipo crónica debido la incapacidad de controlar el estado de inflamación fisiológica en el intestino. Además, existe un desequilibrio entre células T reguladoras y efectoras. En periodos activos de la enfermedad, las células T efectoras (Th1 y Th2) predominan sobre las células Treg. La EC se caracteriza por ser una respuesta inmunitaria principalmente dominada por linfocitos Th1, mientras que en la CU predomina la respuesta Th2. En *lamina propria* en la EC prevalecen los linfocitos T CD4+ CD45RO+. Las células T CD4+ son principalmente Th1 y producen TNF- α , IFN- γ e IL-6. No obstante en la CU predomina la IL-5 y en menor medida IFN- γ . En la EC, la activación de células T podría ser el resultado de la liberación de IL-

12, IL-23 e IL-18 por células dendríticas y macrófagos (256). Sin embargo en la CU una de las citocinas claves sería la IL-13 (383). Otras citocinas de carácter antiapoptótico como IL-2, IL-6, IL-5, IL-17 e IL-18 también están presentes en la EII.

Asimismo, la subpoblación de linfocitos Th17 también es responsable de la inflamación en la EII. Las citocinas implicadas en este subtipo son la IL-17, IL-22 e IL-21. En pacientes con EC se ha observado un incremento en IL-17 e IL-22 (384,385). Estudios en animales sugieren que la mejoría observada en la terapia con anti-IL-12 podría deberse a la IL-23, ya que comparten la subunidad p40. La depleción del gen que codifica la proteína IL-23 p19 inhibe la colitis producida en el modelo de ratones con delección génica de IL-10^{-/-}, mientras que la depleción de IL-12p35 no, sugiriendo que la IL-23 y no la IL-12 es importante en el efecto beneficioso observado en este modelo (386).

- Eventos secundarios: Las vías inflamatorias iniciadas por los acontecimientos anteriormente descritos convergen en una serie de eventos finales comunes. En primer lugar, en la EII el reconocimiento de antígenos por parte de las APC profesionales provoca la migración de células del sistema inmunitario provenientes del torrente circulatorio a la mucosa. El inicio de este procedimiento está a cargo de moléculas quimioatrayentes tales como IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES (Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted, por sus siglas en inglés), MCP-1 (proteína quimotáctica de monocitos 1), MCP-2 (proteína quimotáctica de monocitos 2) y MCP-3 (proteína quimotáctica de monocitos 3), las cuales induce cambios conformacionales en moléculas de adhesión en linfocitos, (integrina α 4 β 7 o el receptor de quimioquinas 7) y granulocitos (L-selectinas). Los macrófagos activados producen citocinas proinflamatorias como IL-1 o TNF- α provocando el aumento en la expresión de ligandos de moléculas de adhesión en el endotelio vascular de los vasos sanguíneos de la mucosa (E-selectinas y P-selectinas, ICAM-1, VCAM-1, CACAM-1, VEGF-A), promoviendo la adhesión de leucocitos y la extravasación al tejido (387,388).

En la mucosa se acumulan gran cantidad de metabolitos y mediadores de inflamación que dañan el tejido como óxido nítrico, radicales de oxígeno, prostaglandinas, leucotrienos, histaminas y metaloproteasas (389–391).

Además de la inflamación intestinal, la EII se asocia a una variedad de síntomas que afectan a distintos órganos más o menos distantes del tracto

gastrointestinal. La mayor parte de estos síntomas se deben al efecto generado por las citocinas proinflamatorias que se han producido en exceso durante la inflamación intestinal. Entre ellos se encuentran la respuesta de fase aguda, la caquexia o la pérdida de peso (392,393), alteración de los hábitos alimenticios como la anorexia (394) o fiebre (395). Las consecuencias hematológicas son múltiples: anemia (396–404), alteraciones de la coagulación, cambios en los factores hemostáticos, trombocitosis, y aumento de la agregación plaquetaria, o leucocitosis (405). Existe una gran controversia en lo que se refiere a las leucemias o linfomas asociados a la EII, ya que existen evidencias que apoyan que el mayor riesgo observado se debe al uso de terapias inmunosupresoras y no a la propia afección (406–408).

Por último la EII está asociada con el riesgo de padecer cáncer colorrectal, como consecuencia del mantenimiento sostenido del proceso inflamatorio crónico. El riesgo es directamente proporcional a la duración, la extensión y gravedad de la EII (409–411). La base molecular que explica la relación en cuestión está siendo dilucidada en profundidad en la actualidad. Estudios han sugerido que el factor de transcripción nuclear NF- κ B podría jugar un papel muy importante como elemento clave en dicho fenómeno (412), ya que controla la transcripción de genes que codifican para moléculas implicadas en el proceso inflamatorio y a su vez han demostrado una relación con el desarrollo de cáncer. Así mismo, las rutas que se encuentran por encima de la activación de NF- κ B pueden desempeñar un rol importante en el desarrollo del proceso maligno, como por ejemplo la interacción entre los TLR y sus respectivos ligandos que, en ciertos casos dan lugar a la activación de dicho factor de transcripción.

Con la finalidad de ampliar la comprensión de esta patología, se explicaran concisamente las vías de señalización más representativas que están relacionadas con la EII.

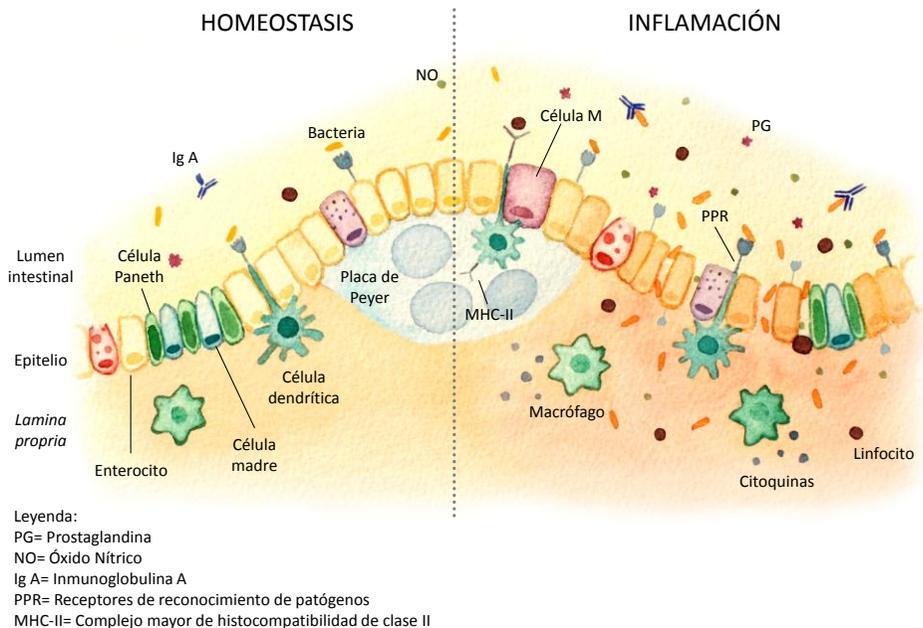


Ilustración 7. Homeostasis y disfunción del sistema inmunológico gastrointestinal.

4.1 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR RELACIONADAS CON LA INFLAMACIÓN EN EII

Existe una gran diversidad de vías de señalización que culminan en la activación de diversos factores de transcripción, dando lugar a la expresión de genes inflamatorios inducibles. Para un mayor entendimiento de los mecanismos de señalización de cada agente, debe definirse el amplio repertorio de transductores de señal y sus interacciones en este sistema. Esto incluye la producción de segundos mensajeros, la activación de proteína quinasa y la distribución subcelular de estos transductores, poniéndolos en contacto con sus dianas apropiadas.

Para efectos de esta Tesis Doctoral, se expondrán a grosso modo las vías de se **Ilustración 7.** Homeostasis y disfunción del sistema inmunológico gastrointestinal. de este trabajo experimental.

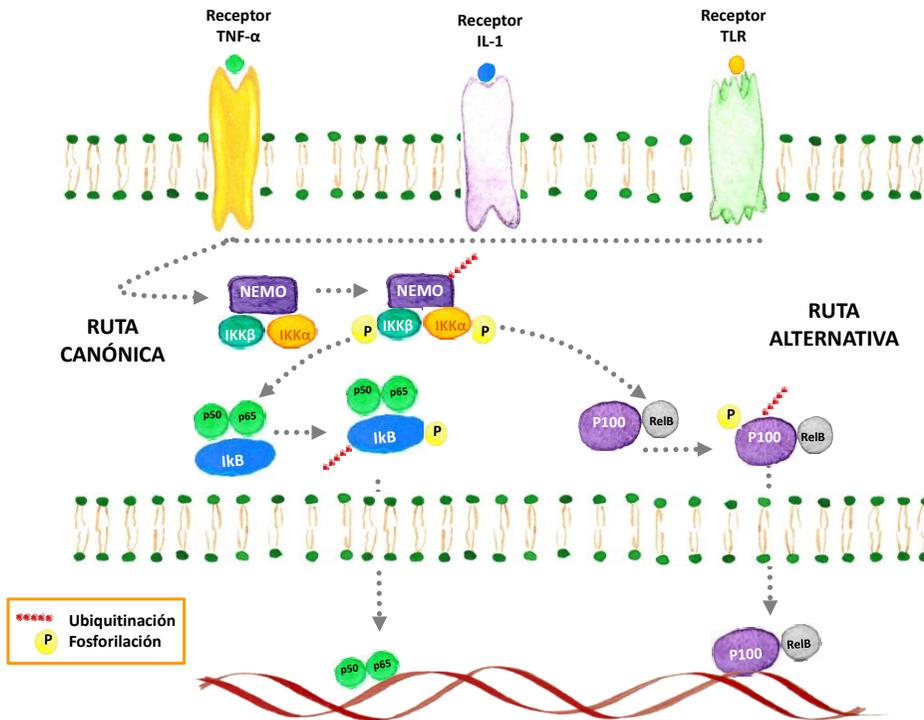
4.1.1 FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NUCLEAR KAPPA B (NF-κB)

NF-κB es un factor de transcripción que ha sido implicado en una gran variedad de fenómenos celulares como la proliferación celular, la diferenciación y la respuesta inmunitaria tanto innata como adaptativa (413,414). Fue descubierto como parte de la maquinaria de transcripción de los genes de la cadena κ de las inmunoglobulinas en linfocitos B (de ahí su nombre). La familia NF-κB está formada por factores de transcripción diméricos que contienen dominios RHD (en inglés “Rel-homology domains”) capaces de unirse a secuencias de DNA, conocidas como elementos de respuesta a NF-κB (5'-GGGRNNYCC-3'; R, purina; Y, pirimidina; N, cualquier nucleótido), que están presentes en las regiones promotoras y amplificadoras de varios genes. En células de mamíferos, la familia NF-κB está compuesta por 5 miembros: p65 (RelA), RelB, C-Rel, p105 (NF-κB1; precursor de p50) y p100 (NF-κB2; precursor de p52) (415–418). Las proteínas NF-κB forman homo o heterodímeros, regulando la expresión de diferentes genes, involucrados en la respuesta inmunológica innata y adaptativa, la inflamación, fenómenos anti-apoptóticos, la proliferación celular y el estrés. La localización citoplasmática de NF-κB es regulada por una familia de proteínas inhibidoras denominadas IκB, cuyos principales miembros son IκBα, IκBβ e IκBε (419–421) (*Esquema 2*). Diversos estímulos (citocinas, productos bacterianos, estrés oxidativo, entre otros.) conducen a la activación del complejo IKK, compuesto por dos subunidades efectoras, IKKα e IKKβ y una subunidad reguladora, IKKγ o NEMO (422,423). La activación de IKK finalmente dará lugar a la activación de NF-κB y posterior translocación al núcleo. La activación de NF-κB puede producirse a través de dos vías distintas: la vía clásica o canónica y la vía alternativa (424). La vía clásica implica la fosforilación de IKKβ, y la consiguiente fosforilación por esta de IκB, su ubiquitinación por la subunidad 26S del proteosoma y degradación, liberando el dímero NF-κB en su forma activa (425,426). El heterodímero compuesto por p50/RelA (o variantes de esta fórmula) translocan al núcleo, lugar en el que regula la expresión génica. Algunos de los estímulos de la vía clásica son capaces de accionar la vía alternativa a través de la activación de IKKα y NIK. Esta vía implica el procesamiento de p100 dando lugar a p52. IKKγ no es estrictamente necesario en la activación de esta vía. La ubiquitinización de p100 no implica su degradación completa por el proteosoma, sino que genera un producto activo capaz de unirse al DNA: p52. IKKγ no es estrictamente necesario en la activación de esta vía. La ubiquitinización de p100 no implica su degradación completa por el proteosoma, sino que genera un producto activo capaz de unirse al DNA: p52.

Este proceso es más lento que la activación de la vía clásica e implica una activación retardada de complejos que contienen p52 como p52/RelB. La activación de la vía alternativa parece estar restringida a algunos miembros de TNFR y virus oncogénicos (427–429).

La estimulación de la mayoría de los TLR induce la translocación de NF-κB al núcleo, lugar en el que regula la expresión de diversos genes implicados en la respuesta inflamatoria innata y adaptativa. Se ha relacionado la activación constante de NF-κB con el desarrollo de inflamación crónica y daño tisular. Diversos modelos experimentales de colitis en animales manifiestan una activación de NF-κB y, en concordancia con estos datos, el bloqueo de dicho factor supone una mejoría del estado de los animales y de la colitis (430,431).

Por el contrario, la activación de NF-κB también está implicada en el mantenimiento de la integridad del epitelio y ofrece protección frente a la muerte celular mediante la inducción de la expresión de proteínas antiapoptóticas (432,433). La falta de activación de NF-κB en ratones con delección génica de NEMO en epitelio intestinal supone el desarrollo de una inflamación crónica grave (373), de forma que la estimulación de NF-κB podría ser beneficiosa para el mantenimiento de la integridad del epitelio y jugar un papel protector en el desarrollo de la colitis. De hecho, una de las teorías más aceptadas recientemente formula que es necesario un estado de activación basal para el correcto funcionamiento del sistema inmunitario intestinal.



Esquema 2. Ruta de señalización de NFκB.

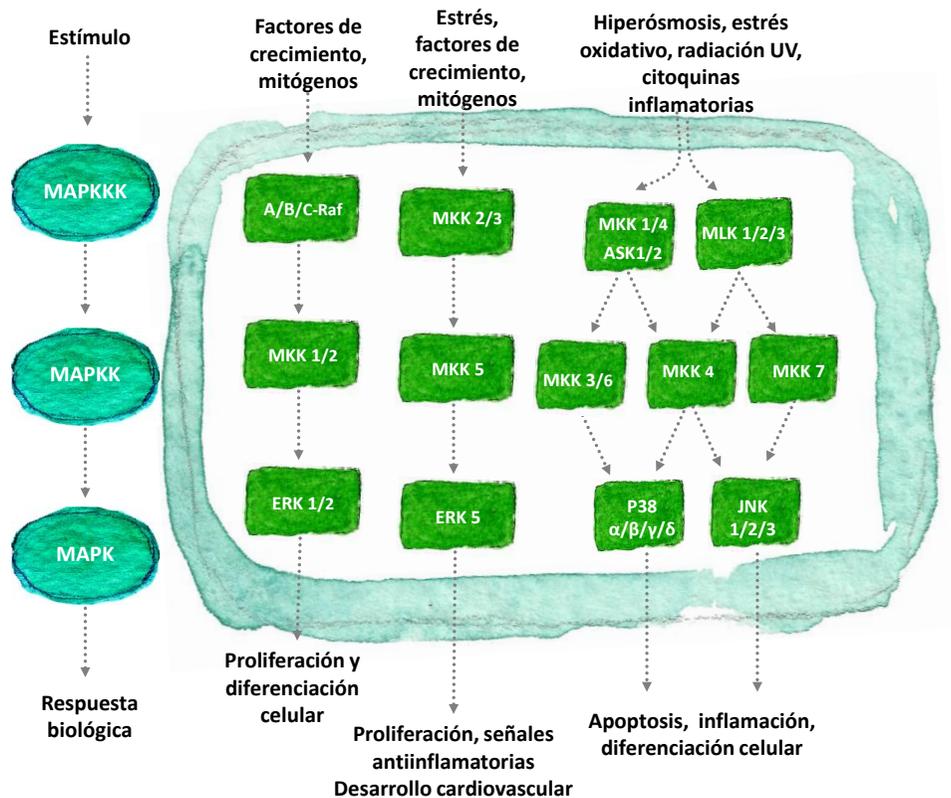
4.1.2 MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE (MAPK)

Las MAPK son componentes de cascadas de señalización en las cuales distintos estímulos extracelulares (estrés celular, factores de crecimiento, citocinas, etc.) confluyen para iniciar una respuesta inflamatoria (434). Son un grupo heterogéneo de enzimas responsables de la fosforilación de aminoácidos de serina y treonina en distintas proteínas. Existen siete familias de MAPK que pueden dividirse en dos grupos: las MAPK clásicas (ERK1/2, p38, JNK y ERK5) y las MAPK atípicas (ERK3, ERK4, ERK7 y NLK) (435,436).

La unión del ligando a un receptor inicia una cascada de sucesos responsables de distintas respuestas celulares. Las MAPK actúan como intermediarios durante este proceso. Después de la activación del receptor, MAP3K es activada y fosforila a MAP2K. Esta a su vez activa a MAPK, la cual tiene la capacidad de unirse y fosforilar otras proteínas, de translocarse al

núcleo para activar mecanismos moleculares como la transcripción de distintos genes o inducir otras acciones como la migración celular (437). (Esquema 3)

La regulación de la acción de las MAPK es producida a diferentes niveles, por una parte, controlando, la presencia o ausencia de alguna proteína en concreto que pertenece a la cascada (435,438) o por medio de la acción de fosfatasa que actúan como reguladores negativos de las MAPK (439).



Esquema 3. Ruta de señalización de las MAPK.

El papel de MAPK en procesos inflamatorios en el sistema gastrointestinal ha sido justificado en diversos estudios, siendo ERK, p38 y JNK las MAPK más estudiadas. Existen estudios que indican que la participación de ERK5 potencia las señales antiinflamatorias y a su vez promueve la proliferación y supervivencia de macrófagos (440)(441). La activación de ERK1/2 conlleva a la

activación de proteínas proinflamatorias como fosfolipasa A y de factores de transcripción como Ets-1, Elk y c-myc. Estos factores de transcripción están implicados en procesos inflamatorios como la migración y la proliferación celular (442)(443)(444). ERK1/2 participa en vías de señalización inducida por IL-21 e IL-1 (445)(446). El papel regulador de p38 en la producción de citocinas ha sido demostrado tanto en colonocitos *in vitro* como en macrófagos en un modelo de colitis experimental en ratones (447)(448)(449). P38 puede activar distintos factores de transcripción como PPAR α o Cdx-2, este último implicado en la diferenciación de células epiteliales intestinales (450)(451). Además, diversos genes relacionados con la respuesta inmunitaria innata en el sistema gastrointestinal e incluso el factor de transcripción anteriormente descrito NF- κ B son regulados por p38 (448)(452)(453). JNK es responsable de la fosforilación de c-jun, perteneciente a la familia de factores de transcripción AP1 responsables de la transcripción de una gran cantidad de genes incluyendo genes que modifican diversas citocinas (454)(455)(456)(457)(458).

4.2 MODELOS EXPERIMENTALES EN EII

En los últimos años se ha producido un notable avance en el conocimiento de los factores involucrados en la iniciación y perpetuación de la EII. No obstante, hoy por hoy no se han logrado identificar con exactitud los complejos mecanismos fisiopatológicos implicados en esta enfermedad. Las limitaciones analíticas y el hecho de no disponer de modelos experimentales que reproduzcan con fidelidad la etiopatogenia de la enfermedad en humanos, son algunas de las causas del desconocimiento actual de la EII. Sin embargo, la aparición de la proteómica y la tecnología de microarrays posiblemente paliaran las deficiencias en el conocimiento de las alteraciones genéticas y epigenéticas asociadas. No obstante, para profundizar en la fisiopatología de esta afección, actualmente se dispone de sistemas experimentales que son de gran utilidad ya que entre otras cosas nos permiten estudiar el posible efecto terapéutico de nuevos compuestos. La mayoría de estos modelos están basados en la inducción química, transferencia de células del sistema inmunitario o modificaciones genéticas. En algunos casos la enfermedad surge espontáneamente. Podemos clasificar los modelos animales en tres categorías de acuerdo al defecto en la inmunidad que desencadena la enfermedad:

Defectos en la integridad y/o permeabilidad de la mucosa: modelos de colitis inducida por agentes químicos (DSS, TNBS u oxalazona), ratones mutantes quiméricos para N-cadherina, ratones deficientes en keratina 8, ratones

deficientes en MDR1, ratones deficientes en IKK- γ /IKK $\alpha\beta$ en células epiteliales del intestino y modelos de inflamación espontánea (ratones SAMP1/Yit).

Defectos en el sistema inmunitario innato: ratones deficientes en STAT3 en células mieloides, ratones deficientes en A20.

Defectos en el sistema inmunitario adaptativo: ratones TNF^{AARE}, modelo de transferencia de células CD45RB^{hi}, ratones transgénicos para STAT4, ratones deficientes en IL-10, ratones con delección génica de TCR α (459).

4.2.1 COLITIS INDUCIDA POR SULFATO DE DEXTRANO SÓDICO (DSS)

Este modelo fue descrito por Okayasu en 1990 (460). La administración de DSS en el agua de bebida induce una colitis aguda que se caracteriza por diarrea sanguinolenta, ulceraciones e infiltración de granulocitos (461). El DSS es tóxico para las células del epitelio intestinal de las bases de las criptas, afectando directamente a la integridad de la membrana. La respuesta aguda se caracteriza por un aumento en la producción de citocinas secretadas por macrófagos (IL-6, TNF- α , IL-1 β y GM-CSF). El modelo DSS es especialmente útil para estudiar la contribución del sistema inmunitario innato en colitis, así como los mecanismos de reparación intestinal. La inmunidad adaptativa no parece estar implicada de forma obligatoria en este modelo de colitis (al menos en la fase aguda) dado que en ratones deficientes en células T y B C.B-17^{scid} o Rag1^{-/-} también se produce inflamación (462). En determinadas cepas la administración de DSS durante varios ciclos provoca una colitis crónica que puede ser combinada con una dosis inicial y única del carcinógeno azoximetano (AOM) dando lugar a un modelo de inflamación asociado a cáncer colorrectal (463). En la fase crónica, la inflamación está mediada por linfocitos Th1 y Th2 productores de IFN- γ e IL-4 que han sido activados en la fase aguda (464).

4.2.2 COLITIS INDUCIDA POR ÁCIDO TRINITROBENCENOSULFÓNICO (TNBS)

El modelo de colitis por TNBS fue descrito originariamente por Morris et al. En el año 1989, en ratas (465). 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%, el cual daña al epitelio y permite el acceso del TNBS a la mucosa. Se consiguen efectos similares si el TNBS es inyectado directamente en la mucosa (sin etanol). El TNBS se comporta como un hapteno, desencadenando una respuesta de hipersensibilidad retardada previa reacción con las proteínas tisulares (haptención). 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 de TNBS/etanol produce una respuesta que se prolonga durante semanas (hasta 8 semanas con una dosis de 30 mg/mL). El modelo fue adaptado posteriormente al ratón, el cual parece presentar una respuesta inmunológica más "pura" de tipo Th1, frente al carácter mixto del modelo en rata, y una respuesta inicial al etanol más leve (466). En el modelo en ratón la cronicidad sólo se consigue a través de un protocolo con administraciones repetidas y periódicas, o mediante un proceso de presensibilización (467).

En ambos casos se desarrolla una inflamación transmural, con pérdida de peso, anorexia y diarrea. Se produce una necrosis epitelial, seguida de una inflamación de la mucosa, con formación de granulomas y una marcada fibrosis, además de alteraciones funcionales como trastornos en el transporte hidroelectrolítico y en la motilidad. La mucosa presenta un infiltrado caracterizado por la presencia de linfocitos T CD4+ que liberan grandes cantidades de IFN- γ e IL-12, pero no IL-4 (466) así como también células productoras de IgG e IgM (468). Los linfocitos T reguladores tienen la capacidad de inhibir la colitis de tipo Th1 desarrollada en este modelo (468)(469).

4.2.3 MODELO DE COLITIS INDUCIDA POR TRANSFERENCIA CELULAR

La reactividad de linfocitos T hacia autoantígenos existe normalmente, aunque está controlada mediante mecanismos de inmunoregulación. Powrie y col. demostraron que la inyección de células T CD4+ CD45^{hi} a ratas atímicas, daba lugar a un proceso inflamatorio inexistente en el caso de una inyección con células T CD4+ no fraccionadas (con mezcla de células CD45^{hi} y CD45^{lo}), sugiriendo la actuación de un mecanismo inmunoregulador que evita la inmunoreactividad. Más tarde, Morrissey y col. demostraron los mismos hallazgos tras la inyección de dichas poblaciones celulares en ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID, por sus siglas en inglés) (470)(471). Aunque existen diferentes variaciones de este modelo (472), básicamente el proceso inflamatorio desencadenado se caracteriza por una hiperplasia severa de células epiteliales intestinales. Pasadas unas semanas tras la transferencia, los ratones comienzan a perder peso y a presentar diarrea. Esta colitis no remite y da lugar eventualmente a la muerte del animal. El colon presenta un marcado engrosamiento debido tanto a la hiperplasia del epitelio como a la infiltración de linfocitos y macrófagos en la *lamina propria* y la mucosa. El intestino delgado no se ve afectado, solamente se observa una infiltración difusa de células

mononucleares en la *lamina propria*. La enfermedad se puede prevenir por medio del tratamiento con anti-IFN- γ , anti-TNF- α o IL-10 (473), lo que indica que es una colitis mediada por células efectoras de tipo Th1.

5. IMPLICACIÓN DE LOS MIRNAS EN ENFERMEDADES

Como se ha mencionado inicialmente, los miRNAs están implicados en diversos procesos biológicos celulares esenciales, como el desarrollo, la diferenciación y proliferación, entre otros (474). No obstante, se ha confirmado que la desregulación en la biogénesis y función de los miRNAs contribuye al desarrollo de enfermedades, por lo que estos pequeños reguladores genéticos han emergido en las últimas décadas como potenciales biomarcadores y dianas terapéuticas en una amplia variedad de patologías. Algunas patologías a las que se han asociado estos reguladores genéticos son: cáncer, enfermedades vasculares, enfermedades inmunes, infecciones, entre otras (475,476).

La primera evidencia que relaciona la detección de anormalidades en la expresión de miRNAs en seres humanos fue en el año 2002, y proviene de un estudio realizado en pacientes con leucemia linfocítica crónica (CLL, por sus siglas en inglés) (477), en el que se examinó una deleción recurrente localizada en el cromosoma 13q14.3; encontrándose que la región común más pequeña de la deleción codifica para 2 miRNAs: miR-15a y miR-16-1, lo que sugiere su papel como genes supresores de tumores (478); cuando estos miRNAs se expresan normalmente se unen a la región 3' UTR del mRNA de la proteína anti-apoptótica BCL2, lo que provoca la inhibición de su traducción, y pueden activarse los mecanismos usuales de muerte celular programada; la ausencia de miR-15a y miR-16-1 induce niveles elevados de esta proteína y el bloqueo de la apoptosis (479,480). Otros ejemplos de miRNAs que funcionan como supresores tumorales son las familias de let-7 (481) y miR-34 (482,483).

Los miRNAs también pueden actuar como oncogenes. El ejemplo mejor estudiado es el del clúster miR-17-92. Este incluye 6 miRNAs maduros (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR19b-1, miR20a y miR-92-1) que comparten un transcrito primario común generado del loci 13q31.3 (484). El clúster está amplificado en varios tipos de linfomas y también en cáncer de pulmón, colon, páncreas y próstata (485–487). Su expresión puede ser regulada directamente por los factores de transcripción c-myc y E2F (488)(489). La sobreexpresión de este clúster se asocia con el desarrollo de tumores. De igual forma, miR-21 (490–492)

miR-155 (493) y miR-272/miR-273 (494) son otros ejemplos de miRNAs que actúan como oncogenes.

Recientemente patrones de expresión de miRNAs se han reportado en muchos cánceres humanos. Se estima que más del 50% de los genes humanos de miRNAs se encuentran en las regiones asociadas o en sitios frágiles de los cromosomas, que son puntos críticos para supresión génica, amplificación y mutaciones (495).

En síntesis, podría decirse que cuando se altera la expresión de los miRNAs se desencadena la ganancia o pérdida de función en las células cancerígenas, por lo que las definiciones de oncogenes y supresores tumorales se han ampliado para incluir a los miRNAs, además de los clásicos genes que codifican proteínas (496,497). Otro aspecto de interés es que los patrones de expresión de los miRNAs son tejido-específicos, por lo que un mismo miRNA puede actuar como un oncogén o un supresor tumoral dependiendo del contexto (498).

Aunque la mayor parte de los estudios realizados con miRNAs han sido en cáncer, trabajos recientes han señalado que los miRNAs también desempeñan un rol importante en la regulación de la inflamación. Se ha demostrado que cambios en la expresión de miRNAs pueden actuar sobre la respuesta inflamatoria en humanos y que la sobreexpresión y/o la inhibición de estas moléculas regulan la liberación de gran número de citocinas inflamatorias. Distintos miRNAs como miR-132, miR-146a y miR-155 pueden ser regulados por mediadores inflamatorios como NF- κ B, TNF- α , IFN- β y componentes microbianos como los PAMP, dando lugar a la expansión y desarrollo de granulocitos/monocitos durante la inflamación (499,500). Otro ejemplo lo constituye miR-9 que puede ser inducido por agonistas del TLR-2 y TLR7/8 y por las citocinas proinflamatorias TNF e IL-1 β , pero no por el IFN- γ (501). Asimismo se ha puesto de manifiesto que ciertas modificaciones en el incremento de concentraciones de microRNA-146a y microRNA-223 en estados sépticos, son debidas al síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (502,503). En este sentido, existen muchas evidencias que respaldan que los miRNAs están involucrados en el desarrollo de células inmunes y en el control de sus funciones, sugiriendo su implicación directa en el desarrollo de la inflamación y de las enfermedades autoinmunes (EAI) (500,504–510). Además, diferentes EAI como la artritis reumatoide (AR), el lupus eritematoso sistémico (LES), el síndrome de Sjogren, la esclerosis múltiple (EM), la púrpura trombocitopénica

idiopática, la psoriasis (PS) o la EII, se han asociado con diferentes patrones de expresión de miRNAs (506,508–511).

La expresión aberrante de miRNAs en algunas de estas enfermedades inflamatorias y autoinmunes ha sido motivo de amplia investigación, ya que podrían afectar transcritos claves en la aparición de estas patologías (512). Por ejemplo, en la artritis reumatoide, se ha descrito que miR-155 y miR-146 están sobreexpresados en fibroblastos sinoviales de pacientes en relación a sujetos sanos. La expresión de miR-155 es aumentada por moléculas proinflamatorias tales como TNF e IL-1 β , aumento que produce un efecto inhibitorio en la expresión de metaloproteínas en fibroblastos sinoviales (513). Por otro lado, miR-146, miRNA cuya función más descrita es restringir la vía NF- κ B, es sobrerregulado por citocinas proinflamatorias (514,515). En el caso de psoriasis, se ha descrito una sobreexpresión de miR-21 y miR-146a en muestras de piel de pacientes en relación a individuos sanos. En el caso del LES, se ha demostrado que la mayoría de los genes relacionados a esta patología contienen al menos un sitio blanco para miRNAs. Por ejemplo, una de las propiedades que se le ha atribuido a miR-146a es la de actuar como regulador negativo de la señal de TLR, y se ha observado que su expresión está disminuida en pacientes con LES. También, este miRNA ha sido descrito como un regulador negativo de la vía de señalización de IFN tipo I, llevando a cabo su función a través de la regulación del factor de regulación de interferón 5 y de la proteína de transducción de señales y transcripción, STAT1; por lo tanto, la disminución de la expresión de miR-146a en las células mononucleares de sangre periférica podría contribuir al aumento en la producción de IFN tipo 1 en el LES (516). Existen otros estudios en los cuales se ha demostrado que los miRNAs podrían ser la causa de la citotoxicidad mediada por citocinas de las células β pancreáticas. Esta toxicidad es alcanzada cuando IL-1 β y TNF inducen la expresión de miR-21, miR-34a y miR146a en los islotes pancreáticos, produciendo daño en las células β como consecuencia del aumento en la producción de citocinas proinflamatorias (517).

Estos estudios revelan que los miRNA no regulan solamente el desarrollo de células de la inmunidad innata o adaptativa, sino que también acompañan el delicado equilibrio de su respuesta (303,509). El conocimiento del papel de los miRNAs en la regulación de la inflamación es un campo de estudio importante que puede significar una comprensión más profunda de la patogénesis de la EII.

5.1 IMPLICACIÓN DE LOS miRNAs EN EII

Como se describe en los párrafos anteriores, emergentes manifestaciones han ilustrado que los miRNAs juegan un rol crucial en el desarrollo de un gran número de enfermedades mediante la regulación de diversas moléculas y vías centrales de señalización (84,518). Hasta la fecha, el efecto y función de los miRNAs en la EII, es poco conocido, sin embargo se ha sugerido la existencia de miRNAs relacionados con EII los cuales podrían contribuir a el establecimiento de la homeostasis inmunológica a nivel de la mucosa intestinal (519).

Actualmente existen pocos estudios y revisiones que analicen patrones de expresión de miRNAs en pacientes con EII (302,520–526). El primer estudio en CU donde el miRNA fue directamente examinado en la mucosa de estos pacientes fue realizado por Wu y col. (520). En este trabajo se analizó la expresión de miRNAs en pacientes con CU activa e inactiva, EC, síndrome de intestino irritable (SII), colitis infecciosa (CI) y colitis microscópica (CM), así como en sujetos sanos. Se identificaron diferencias en los patrones de expresión de miRNAs en la mucosa de pacientes con CU en brote de actividad comparando con inactividad y de individuos sanos. Se demostró que los niveles de miR-192 estaban significativamente disminuidos en los pacientes con CU activa. Además se observó que el miR-192 se expresaba predominantemente en las células epiteliales colónicas y que regulaba la expresión del péptido inflamatorio de macrófagos 2 alfa (MIP-2 α), citoquina expresada por las células epiteliales. Así pues, en las células epiteliales del colon, el TNF inducía la expresión de MIP-2 α provocando una reducción de la expresión de miR-192. Otros miRNA analizados como miR-21, miR-375, miR-422 y miR-23a, tenían patrones de expresión distintos según el tipo de patología (SII, CI, CM, EC) y al ser comparados con tejidos de sujetos sanos. Todos estos hallazgos demuestran que cada miRNA puede estar interviniendo en los diferentes aspectos de la inflamación y que además son moléculas capaces de regular la expresión de las citokinas expresadas por las células del epitelio intestinal.

Posteriormente, otro estudio realizado en mucosa de 12 pacientes con CU activa confirmó el aumento de miR-21 e identificó además un aumento del miR-155 (521). Otro tercer estudio también llevado a cabo en mucosa, pero esta vez en CU y en EC, identificó diferencias en los patrones de expresión de los miRNAs entre ambas enfermedades así como entre la mucosa inflamada y no inflamada y al compararlas con sujetos sanos control (522). Todos estos datos apoyan la idea de que las alteraciones en la expresión de miRNAs preexisten en la mucosa no inflamada de los pacientes con EC y CU y que podrían tener un papel crucial

en la sensibilización de la mucosa quiescente a factores ambientales y/o inductores de la EII (flora comensal) y en el inicio y/o recaída de la inflamación.

El grupo de Wu F y colaboradores ha publicado dos trabajos (523,524) realizados en pacientes con EC y con CU en diferentes estadios y distintos patrones de la enfermedad, uno en mucosa y otro en sangre periférica, siendo este último el primer estudio llevado a cabo en sangre periférica de pacientes con EII. En cuanto al estudio realizado en mucosa (523), se identificaron diferentes regiones en el colon-intestino (recto, sigma, colon transverso, ciego e íleon terminal) con patrones de expresión específicos en cada una de ellas y, además, se hallaron patrones de expresión distintos entre los diferentes subtipos de EC (EC de colon y EC ileal). Finalmente, se identificaron 5 miRNAs expresados de forma distinta en la mucosa de los pacientes con EC activa de colon al comparar con mucosa de sujetos sanos y, de igual forma, se encontró que existía un aumento significativo en la expresión de 4 miRNAs en la mucosa de pacientes con EC activa ileal. En la **(tabla 5)** se recoge un resumen de cada uno de los estudios mencionados en este apartado, donde se plasman los distintos miRNAs en función de su expresión y tipo de patología inflamatoria intestinal.

Tabla 5. Resumen de los estudios de microRNA en Enfermedad Inflamatoria Intestinal. CUa: colitis ulcerosa activa; CUI: colitis ulcerosa inactiva; Ctr: control; ECa: enfermedad de Crohn activa; ECi: enfermedad de Crohn inactiva; miR-: microARN; ↑: aumento de expresión; ↓: disminución de expresión

Referencia	miRNA	Expresión y enfermedad
(519) Mucosa	miR-16, miR-21, miR-23a, miR-24, miR-29a, miR-126, miR-195, Left-7f	↑ en CUa vs Ctr
	miR-192, miR-375, miR-422b	↓ en CUa vs Ctr
(520) Mucosa	miR-21, miR-155	↑ en CUa vs Ctr
(522) Mucosa	miR-23b, miR-106, miR-191	↑ en ECa colon vs Ctr
	miR-19b, miR-629	↓ en ECa colon vs Ctr
	miR-16, miR-21, miR-233, miR-594	↑ en ECa íleon vs Ctr
(521) Mucosa	miR-29a, miR-29b, miR-126*, miR-127-3p, miR-324-3p	↑ en CUI y CUa vs Ctr
	miR-188-5p, miR-215, miR-320a, miR-346	↓ en CUI y CUa vs Ctr
	miR-196a	↑ sólo en CUI vs Ctr
	miR-7, miR-31, miR-135b, miR-223	↑ sólo en CUa vs Ctr
	miR-26a, miR-29b, miR-30b, miR-34c-5p, miR-126* miR-127-3p, miR-133b, miR-155, miR-196a, miR-324-3p miR-21, miR-22, miR-29c, miR-31, miR-106a, miR-146amiR-146b-5p, miR-150	↑ en ECa y ECi vs Ctr
	miR-9*, miR-30a*, miR-30c, miR-223	↑ sólo en ECi vs Ctr
	miR-9, miR-126, miR-130a, 181c, miR-375	↑ sólo en ECa vs Ctr
	miR-29a, miR-29b, miR-30c, miR-126* miR-127-3p, miR-196a, miR-324-3p	↑ en ECi y CUI vs Ctr
	miR-29a, miR-29b, miR-126*, miR-127-3p, miR-324-3p	↑ en CUa y ECa vs Ctr
	miR-150, miR-196b, miR-199a-3p, miR-199b-5p miR-223, miR-320a	↑ en ECa vs Ctr
	(523) Sangre	miR-199a-5p, miR-362-3p, miR-532-3p, miRplus-E1271
miRplus-F1065		↓ en ECa vs Ctr
miR-340*		↑ en ECa y ECi vs Ctr
miR-149*		↓ en ECa y ECi vs Ctr
miR-28-5p, miR-151-5p, miR-199a-5p, miR-340*, miRplus-E1271		↑ en CUa vs Ctr
miRs-103-2*, miR-362-3p, miR-532-3p		↑ en CUa y CUI vs Ctr
miR-505*		↓ en CUa y CUI vs Ctr
miR-28-5p, miR-151-5p, miR-103-2*, miR-340* miRplus-E1153, miR-532-3p, miR-149*		↑ en CUa vs CDa
miR-505*	↓ CUa vs ECa	

En relación al estudio que se realizó en sangre periférica (524), se demostró que existen diferencias entre patrones de expresión de miRNAs en individuos sanos y pacientes que cursaban con diferentes subtipos de EII. En consecuencia, se observó que 7 miRNAs fueron expresados de forma diferente en los pacientes

con EC activa comparado con individuos sanos, sin diferencias al hacer subgrupos de pacientes con EC (ileal y cólica). Asimismo, entre los pacientes con CU activa e individuos controles, 9 miRNAs fueron expresados de forma diferente, sin observar tampoco diferencias en los subgrupos de CU (pancolitis y colitis distal). Finalmente, se encontraron 8 miRNAs que permiten distinguir EC activa de CU activa (7 aumentados y 1 disminuido significativamente en CU activa comparado con EC activa (*Tabla 5*)).

Se asume que la inflamación crónica que se produce en la EII es una situación preneoplásica con elevado riesgo de degeneración. La incidencia de cáncer colorrectal (CCR) en la EII está aumentada, siendo en el caso de la CU de 3/1.000 personas/año, 5 veces superior a la población general (527,528). Se ha publicado un estudio que revela que los niveles elevados de miR-31 se correlacionan con la progresión de inflamación crónica a displasia y cáncer en la mucosa colónica de la EII, siendo capaz de distinguir el cáncer esporádico del asociado a la EII (529). Estos hallazgos sugieren que miR-31 podría ser útil como biomarcador de detección precoz o predicción de displasia y CCR. Además se ha observado que miR-31 regula la expresión del factor inhibidor del FIH-1 (factor inducido por hipoxia), el cual está muy implicado en la angiogénesis y la progresión tumoral.

La evidencia que existe hasta el momento del papel de los miRNAs en la EII demuestra que tienen una función importante en la patogenia de la enfermedad todavía a la espera de dilucidar en profundidad. Existen patrones de expresión específicos para la EC y la CU, que permiten diferenciar ambas patologías y sus distintos estadios evolutivos (actividad-quiescencia).

5.2 miRNA 146a Y EII

La familia miR-146 está compuesta por dos miembros, miRNA-146a y miRNA-146b, en humanos se localizan en los cromosomas 5q33.3 y 10q24.32, mientras que en ratón reside en cromosoma 11 y 19 respectivamente; ambos poseen la región semilla idéntica y mRNA diana putativos, pero difieren en su forma madura sólo por dos nucleótidos en la región 3' y en la estructura secundaria (tallo-bucle). En 2006 David Baltimore y col. Publicaban un estudio que resultó muy significativo para la investigación de miRNAs, plantearon la existencia de un bucle de retroalimentación que implicaba a miRNA 146a con la señalización a través de TLR. El estudio consistía en evaluar las posibilidades de participación que miRNAs podían tener en la respuesta inmune innata, para ello,

analizaron la expresión de 200 miRNAs a través de la activación de TLR4, posterior a la exposición con LPS, (499), como resultado encontraron que la inducción de la transcripción de miR146a tanto por LPS, como por TNF e IL-1 β era dependiente de NF-kB, además que a su vez, la familia de receptores asociados a factor de necrosis tumoral (TRAF6) y la interleucina-1 asociada al receptor quinasa (IRAK1), resultaron ser dianas potenciales de miR-146a, lo que significa que este miRNA puede actuar como un regulador negativo y ofrecer un fino ajuste de la respuesta inmune. Una respuesta exacerbada o demasiado prolongada puede tener efectos perjudiciales, lo que deriva en trastornos inflamatorios agudos y crónicos. En este sentido, el estudio anteriormente citado demostraba el estricto rol que ejercen las células del sistema inmunológico a diferentes niveles para controlar la respuesta inmune. Asimismo esta investigación (499) dio a conocer un sistema de retroalimentación delicado por el cual el reconocimiento de componentes bacterianos por parte de TLR desencadena la activación de NF-kB, el cual acaba regulando a los propios genes de miRNA 146a, y a su vez regula de manera negativa a las proteínas amortiguadoras IRAK1 y TRAF6; un mecanismo de compensación eficaz para bajar el tono de la respuesta inflamatoria, que al no ser controlada, podría desatar una sucesión de efectos adversos.

El miR-146a ha sido ilustrado como una de las moléculas clave de la respuesta inflamatoria y, además, ha sido relacionado con poseer un papel central en la oncogénesis (48,530).

La implicación de miRNA 146a en la EII ha sido poco estudiada, sin embargo estudios como los que se han reseñado a lo largo de este trabajo y estudios actuales confirman la estrecha relación de este regulador genético con esta afección, principalmente con el carácter inflamatorio de la misma, ya que es evidente que es un elemento importante en la respuesta inmunitaria, así como distintas cascadas de señalización relacionadas con la fisiopatología de la EII.

Objetivos

El intestino es el hogar de la más amplia colección de microorganismos. La capacidad que posee el sistema inmunológico para co-evolucionar con la microbiota durante la vida postnatal permite que el hospedador y la microbiota coexistan en una relación mutuamente beneficiosa (531). La homeostasis intestinal depende fundamentalmente de la interacción que surge entre el epitelio intestinal y las bacterias. Este hecho se manifiesta claramente en las enfermedades inflamatorias intestinales en las cuales se sabe que la disbiosis juega un papel patogénico (1). Además, la disbiosis se ha relacionado con enfermedades sistémicas como el hígado graso, la obesidad o la diabetes (2,3). Actualmente se conoce que el sistema inmune intestinal y la microbiota mantienen una alianza de colaboración en el que la microbiota modula al sistema inmunológico y, a su vez, este último tolera la microbiota y combate las bacterias patógenas invasoras (4). Esta sociedad es posible en gran medida debido a la señalización de antígenos de naturaleza bacteriana sobre los receptores de reconocimiento de patrones microbianos conservados (PRR, por sus siglas en inglés) que se expresan en las células del sistema inmune innato. Entre estos receptores se encuentran: los RLR (receptores tipo RIG-I; gen de ácido retinoico inducible I), los NLR (receptores tipo NOD, nucleotide-binding-oligomerisation) y los TLR (receptores tipo Toll) que son los mejor caracterizados (5,6).

Las células epiteliales intestinales (IEC) son consideradas componentes del sistema inmune innato intestinal, las cuales ejercen un rol importante en la comunicación que se establece con la microbiota y el desarrollo de la tolerancia. De hecho, las IEC expresan TLR, pero en condiciones homeostáticas la expresión es baja y los efectos de sus ligandos se corresponden a un comportamiento tolerante ante dichas señales (7,339), proporcionando el mantenimiento de la barrera epitelial a través de inducción de fenómenos como la proliferación celular, la producción de IgA, la conservación de las uniones estrechas y la expresión de péptidos antimicrobianos (340). Sin embargo, en condiciones inflamatorias la expresión de TLR se incrementa y contribuye a la inflamación y la tolerancia inmune.

En los últimos años se ha demostrado la participación de los microRNA (miRNA) en la regulación de la respuesta inflamatoria en consecuencia a los antígenos derivados de la microbiota. Estos pequeños ARN no codificantes regulan la expresión de genes y, en virtud de ello, están involucrados en la patogénesis de varias enfermedades. Un mecanismo de acción común de los

miRNAs implica la regulación de la expresión proteica tanto a nivel transcripcional como a nivel traduccional. Entre los miRNAs asociados a la respuesta inflamatoria y la microbiota, está miR-146a, fuertemente inducido por la endotoxina a través de la estimulación de TLR4 en diferentes tipos celulares. Además, se ha demostrado su participación en la regulación de la respuesta inmune limitándola, previniendo de esta manera la sobreestimulación de la misma. En este sentido, miR-146a es considerado un efector negativo de la respuesta inmune innata. Sin embargo no existen muchos estudios que evalúen el papel de miR-146a en la inflamación intestinal y los más recientes han sido controvertidos.

Atendiendo a las premisas anteriormente formuladas, se establecen los siguientes objetivos para la presente tesis doctoral:

1. Determinar los cambios en la expresión de miRNA en células humanas del epitelio intestinal, en función del estadio de diferenciación celular y de inflamación.
2. Estudiar la expresión de miRNA-146a en tres modelos animales de colitis, que difieren en la participación de la barrera intestinal y por consiguiente en el nivel de contacto con la microbiota intestinal.
3. Estudiar el efecto de antígenos bacterianos y citocinas sobre la expresión de miRNA-146a en líneas celulares del epitelio intestinal.
4. Confirmar la hipótesis de la posible contribución de miRNA-146a en la prevención de la sobreestimulación de la respuesta inmune.
5. Estudiar el efecto de antígenos bacterianos y citocinas sobre la expresión de miRNA-146a en el modelo de cultivo de organoides intestinales.

Material y Métodos

MATERIALES

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

1. ENSAYOS *IN VIVO*

2.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y MODELOS DE EII.

Durante la elaboración de esta tesis doctoral se emplearon ratas y ratones de diferentes cepas.

- **Ratas**

Se emplearon ratas Wistar hembras con un peso medio de 180-220 g, suministradas por Harlan Laboratories® (Barcelona, España). Dichos animales se mantuvieron en jaulas de Makrolon® (3-4 ratas por jaula) equipadas con filtros de 45 µm (Tecniplast, 1290D420R) sometidas a ciclos de 12 horas de luz y oscuridad, a una temperatura constante de (22-25 °C) con libre acceso a agua autoclavada y comida (Harlam-Tekladd 2014). Todos los experimentos realizados han sido aprobados por el Comité de Bienestar Animal de la Universidad de Granada y se han llevado a cabo en conformidad con la Directiva para la Protección de Animales Vertebrados utilizados para la Experimentación y para otros fines Científicos de la Unión Europea (86/609/EEC).

- **Modelo de colitis experimental por ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS)**

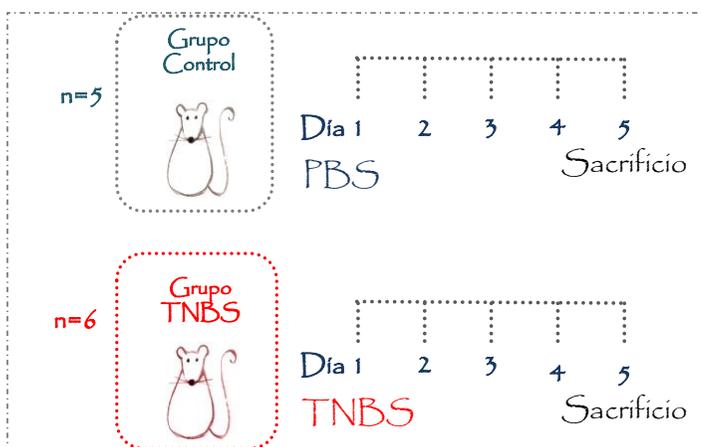
La colitis fue inducida de acuerdo al método descrito por Morris y Col. (465) con modificaciones menores. Resumiendo, la colitis fue inducida en ratas en ayuno (8 horas previas a la inducción) y anestesiadas con isoflurano, mediante la administración intrarrectal de 10 mg de TNBS disuelto en 0.25 mL de etanol al 50% (v/v), por medio de una cánula de teflón insertada aproximadamente 8 cm a través del ano. Las ratas del grupo control (grupo no colítico) recibieron 0.25 mL de PBS. Una vez retirada la cánula, se esperaron 30 seg adicionales antes de ser colocadas en la jaula. Durante el desarrollo del protocolo experimental fueron registrados diariamente: el consumo de agua y comida, peso corporal y

la presencia de diarrea. El sacrificio de las ratas se realizó 5 días después de la inducción de la colitis.

❖ Diseño experimental de la inducción de colitis por TNBS (*Esquema 4*)

En el caso del modelo de colitis por TNBS, tras un período de aclimatación de 7 días, las ratas (de aproximadamente 200g) fueron distribuidas al azar en 2 grupos: Control (n= 5) y TNBS (n= 6). El grupo control (no colítico) recibió un enema de solución salina en la misma cantidad y condición que las ratas que recibieron TNBS. El sacrificio de los animales se realizó 5 días después de la inducción de la colitis por dislocación cervical previa anestesia con isoflurano. A continuación, se procedió a extraer el colon y se limpio con PBS para eliminar los restos de heces. Así mismo se retiraron las adherencias mesentéricas. El tejido se mantuvo sobre una superficie refrigerada hasta su posterior congelación. Las muestras colónicas fueron pesadas, y la longitud fue determinada al someterlas a un peso constante de 2 g. Posteriormente, el colon fue abierto longitudinalmente y se realizó la valoración del daño macroscópico por parte de un observador ajeno al experimento. Para evitar posibles sesgos, se documentó mediante fotografía el aspecto del mismo por su cara mucosal, y se evaluó el daño a posteriori por otros observadores cegados respecto a la identidad de la muestra.

En algunos casos se utilizó el programa Image J (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA) para cuantificar el porcentaje de área dañada.



Esquema 4. Modelo de colitis inducido por TNBS en rata

El criterio de valoración del daño colónico macroscópico fue calculado basándonos en una escala de 0-25 de acuerdo con los siguientes criterios: adherencias (0-3), obstrucción (0-2), hiperemia (0-3), fibrosis (rigidez y deformación, 0-5), necrosis (0-5) y otras características (dilatación proximal, fragilidad y cicatrización, 0-4). El colon fue dividido en cinco segmentos longitudinales para la determinación posterior de diversos parámetros, que fueron congelados en nitrógeno líquido y conservados a -80°C hasta su uso; de igual modo se obtuvo un segmento transversal adyacente al daño que se empleó para la extracción de RNA, y que se mantuvo a -20°C en RNAlater™. Todas las determinaciones bioquímicas se realizaron dentro de 2 las dos semanas posteriores a la recolección de las muestras.

- **Ratón**

Ratones C57BL/6J Wild Type y RAG1 knock out (KO) hembras, con una edad comprendida entre 8-10 semanas, suministrados por Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Dichos animales fueron alojados por grupos, en condiciones específicas libres de patógenos (SPF, por sus siglas en inglés), en jaulas de Makrolon® sometidas a microventilación automática y a ciclos de 12 horas de luz y oscuridad, a una temperatura constante de (22-25 °C) con libre acceso a agua autoclavada y comida (Harlam-Tekladd 2014). Todos los experimentos realizados han sido aprobados por el Comité de Bienestar Animal de la Universidad de Granada (referencia 150-2007) y se han llevado a cabo en conformidad con la Directiva para la Protección de Animales Vertebrados utilizados para la Experimentación y para otros fines Científicos de la Unión Europea (86/609/EEC).

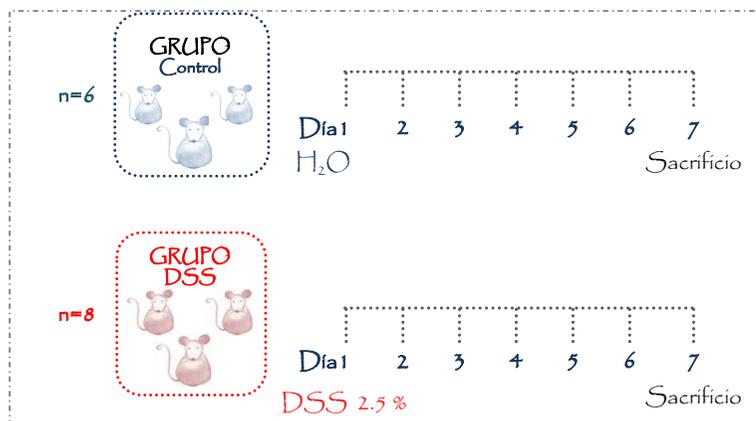
- **Modelo de colitis experimental por sulfato de dextrano sódico (DSS)**

La colitis fue inducida mediante la administración de DSS (36-50 KDa, ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA) en el agua de bebida. Para ello se utilizó una concentración del 2.5% ($m \cdot V^{-1}$) por un período de 7 días. El estado de los animales fue monitorizado, controlando diariamente la apariencia general, el peso corporal, el consumo de agua y comida, así como la posible presencia de sangre en heces y consistencia de las mismas, que son signos destacados en la patología de este modelo.

❖ Diseño experimental de la inducción de colitis por DSS (*Esquema 5*)

La colitis se indujo mediante la administración de DSS al 2.5% (P/V) en el agua de bebida durante 7 días a ratones C57BL/6J WT hembras, momento en el cual son sacrificados. Los ratones fueron distribuidos en dos grupos: control no colítico (n=6) y DSS 2.5% (n=8). Diariamente se registró el peso corporal y la ingesta total de agua y comida en ambos grupos. Una vez sacrificados los animales por dislocación cervical previa anestesia con isoflurano, se procedió a extraer el colon y se limpió con PBS para eliminar los restos de heces. Así mismo se retiraron las adherencias mesentéricas. El tejido se mantuvo sobre una superficie refrigerada hasta su posterior congelación. Las muestras colónicas fueron pesadas, medidas bajo un peso constante de 2 g y sometidas a una valoración macroscópica focalizada esencialmente en dos parámetros: Fibrosis e hiperemia. El colon fue dividido en cinco segmentos longitudinales para la determinación posterior de diversos parámetros, que fueron congelados en nitrógeno líquido y conservadas a -80°C hasta su uso; de igual modo se obtuvo un segmento transversal de la región distal que se empleó para la extracción de RNA, y que se mantuvo a -20°C en RNAlater™. Además, se obtuvieron fracciones de tejido de aproximadamente 0.5 cm² para ser cultivados en medio de cultivo DMEM (ver explantes de tejido colónico). Todas las determinaciones bioquímicas

se realizaron dentro de las 2 semanas posteriores al momento de la recolección de las muestras.



Esquema 5. Modelo de colitis inducido por DSS en ratón

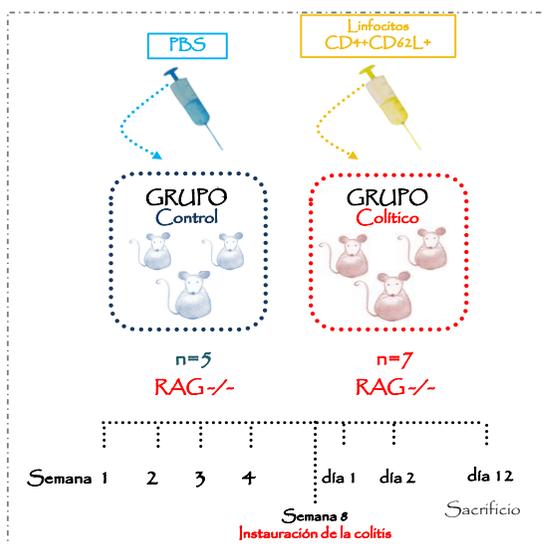
- **Modelo de colitis experimental por transferencia linfocitaria**

La colitis fue inducida mediante la transferencia de una subpoblación purificada de células T *naïve* (vírgenes o no diferenciadas) CD4+ CD62L+ a ratones RAG1 KO (ratones que carecen de linfocitos T y B maduros). Las células T *naïve* CD4+ CD62L+ fueron obtenidas por separación magnética en columnas (Miltenyi Biotec®, Bergisch Gladbach, Alemania) a partir de esplenocitos aislados de ratones C57BL/6J WT. Una vez obtenidos, estos esplenocitos han de ser cernidos utilizando un filtro de 70 µM (cell strainer BD Falcon™) para obtener así una suspensión monocelular con la cual 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+ por selección negativa mediante el marcaje de células no CD4+ con anticuerpos específicos (anti-CD8α, anti-CD45R, anti-CD11b, anti-CD25, anti-CD49, anti-TCRγ/δ y anti-Ter-119). En un segundo paso, el marcaje específico CD62L permitió el aislamiento de células T *naïve* CD4+ CD62L+ mediante selección positiva. Las células T *naïve* CD4+ CD62L+ purificadas fueron lavadas, resuspendidas en PBS 1X frío a 1.5X10⁶/mL y finalmente inyectadas intraperitonealmente en un volumen de 0.2 mL a ratones RAG1 KO. El grupo control recibió el mismo volumen pero sólo de PBS. Los ratones fueron monitorizados durante 8 semanas tras la transferencia, siendo controlado semanalmente el peso corporal de cada uno de ellos, calculando el porcentaje de pérdida respecto al día de la inyección de células T *naïve* CD4+ CD62L+ o PBS (Valor inicial de peso corporal). Además, también se evaluaron semanalmente parámetros como diarrea, presencia de sangre en heces (Hemocult Sensa, Beckman Coulter, Miami, Florida, EEUU) y valores hematológicos. La transferencia de linfocitos T CD4+ CD62L+ a ratones RAG1 KO da lugar a una progresiva pérdida de peso, siendo significativa entre las semanas 4 y 8 tras la transferencia. Los animales mostraron una media del 10% de pérdida peso alrededor de la semana 8, lo cual junto con los parámetros anteriormente mencionados, permite establecer el índice de actividad de la enfermedad (DAI) el cual ayuda a determinar el momento óptimo de los animales para dar inicio a algún tratamiento farmacológico. La evaluación del DAI se establece de la siguiente manera: consistencia de heces (0: sin sangre, 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 DAI comprendido entre 2.5 y 3.5, basándonos en la evaluación anteriormente descrita, se

considera instaurada una colitis clínicamente significativa. Los datos del estudio de expresión de miR-146a reflejados en el apartado de Resultados de esta tesis doctoral, fueron obtenidos de dos estudios farmacológicos en ratón. El sacrificio de los animales se realizó 12 días después de la instauración de la colitis. Las muestras de ratones control y ratones colíticos seleccionadas para el análisis realizado fueron escogidas al azar. Parte de estos resultados se ven reflejados en la publicación anexa a esta tesis doctoral.

❖ Diseño experimental de la inducción de colitis por transferencia linfocitaria (*Esquema 6*)

En el modelo de inducción de colitis por transferencia linfocitaria, los ratones fueron distribuidos en dos grupos diferentes: un grupo control (n=5) los cuales fueron inyectados intraperitonealmente con PBS y un grupo de animales colíticos (n=7) que recibió intraperitonealmente la transferencia linfocitaria usando como vehículo PBS. La colitis se indujo a ratones RAG1 KO. Una vez sacrificados los animales por dislocación cervical previa anestesia con isoflurano, se procedió a extraer el colon y se limpió con PBS para eliminar los restos de heces. Igualmente, se retiraron las adherencias mesentéricas. El tejido se mantuvo sobre una superficie refrigerada hasta su posterior congelación. Las muestras colónicas fueron pesadas, medidas bajo un peso constante de 2 g, y posteriormente fueron cortadas en tiras longitudinales para la determinación posterior de diversos parámetros, que fueron congelados en nitrógeno líquido y conservadas a -80°C hasta su uso; de igual modo se obtuvo un segmento transversal de la región distal que se empleó para la extracción de RNA, y que se mantuvo a -20°C en RNAlater™. Todas las determinaciones bioquímicas se realizaron dentro de 2 semanas desde el momento de la recolección de las muestras.



Esquema 6. Modelo de colitis inducido por transferencia linfocitaria en ratón

- **Histología**

Uno de los fragmentos transversales de tejido procedente de colon de ratones del grupo control (RAG1 KO) y ratones del grupo transferencia (RAG1 KO transferidos con células adoptivas procedentes de ratones WT) fue fijado en paraformaldehído 4% (p/v). Se elaboraron bloques de parafina que sirvieron como soporte para la realización de cortes de aproximadamente 5 μm de sección mediante un micrótopo. Los cortes fueron montados en portas y sometidos a una tinción de eosina-hematoxilina con el objetivo de estudiar la morfología e integridad del tejido. Las imágenes fueron captadas por un microscopio Leica DMI3000B acoplado a una cámara Leica DFC420.

2. ENSAYOS *IN VITRO*

1.1 LÍNEAS CELULARES

Las dos líneas celulares del epitelio intestinal empleadas (Caco-2 e IEC18) fueron obtenidas del Servicio de Cultivo Celular de la Universidad de Granada. En todos los casos se empleó como medio de cultivo DMEM (Dulbeccos's Modified Eagle Medium), suplementado con suero bovino fetal (10%), L-glutamina (2mM), antibióticos (1%: penicilina (100 U/mL), estreptomycin (0.1 mg/mL) y anfotericina B (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Los diversos cultivos se mantuvieron en una atmósfera con el 5% de CO_2 y a 37°C. Las células fueron mantenidas en placas de 78 cm^2 hasta su confluencia. El medio de cultivo fue renovado cada 2-3 días. Los estímulos empleados fueron Lipopolisacárido (LPS, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Flagelina (FLA, 100 ng/ml), CpGDNA (fosfato de guanina citosina, 50nM), Peptidoglicano (PDG, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y Muramildipéptido (MDP, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) suministrados por Hycult Biotech®, Holland, en el caso de IEC18. En cuanto a la línea celular Caco-2 se empleó IL1- β (10ng/ml) y TNF (20ng/mL) para la estimulación de la línea celular. Las células no tratadas se utilizaron como control negativo.

En general, los experimentos con IEC18 y Caco-2 se llevaron a cabo al alcanzar la confluencia, excepto en tres casos: un experimento en el que se cultivaron células Caco-2 a 2, 7 y 17 días de confluencia con la finalidad de observar la implicación de diferentes miRNAs en diferenciación y proliferación celular; un experimento en el que se emplearon células silenciadas mediante partículas lentivirales (ver más adelante), en el que se evitó la confluencia con el fin de impedir la aparición de células satélites, y otro experimento que implica la

transfección con lipofectamina de miRNA 146a imitador, en el que las células son sembradas a una determinada concentración, tal y como se detalla más adelante.

1.2 ESTUDIO DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN: NF- κ B

Para determinar las diferentes vías de señalización, las células IEC18 fueron tratadas con Bay 11-7082 (10 μ M), un inhibidor selectivo de la fosforilación de I κ B- α , wortmanina, (1 μ M) un inhibidor de la fosforilación de PI3K que inhibe la vía de señalización de Akt, e inhibidores de MAPK como: p38 (SB203580, 10 μ M), ERK1/2 (PD 98059, 10 μ M) y JNK (SP 600125, 10 μ M). Todos los inhibidores se disolvieron en DMSO.

1.3 SILENCIAMIENTO DE LA EXPRESIÓN DE GENES MEDIANTE PARTÍCULAS LENTIVIRALES

El silenciamiento de la expresión de genes (knock-down) en la línea celular de enterocitos IEC18 se realizó mediante la transfección de partículas lentivirales las cuales contienen horquillas denominadas shRNA (short hairpin RNA) que expresan siRNA funcionales (RNA de interferencia) tras su procesamiento mediante la enzima Dicer. El silenciamiento en cuestión se

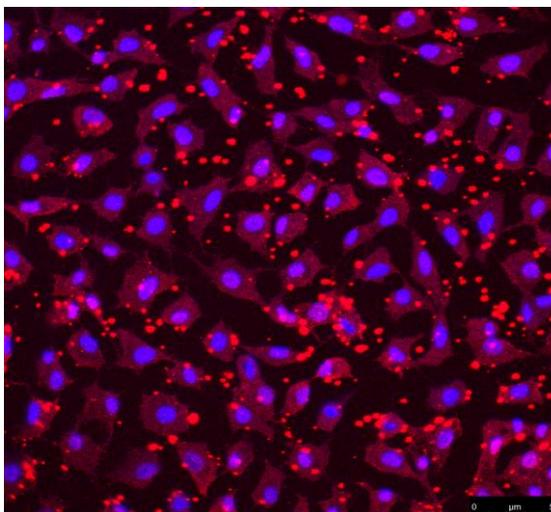


Imagen 2. Células IEC18 . Control de transfección usando BLOCK-iT™ Alexa Fluor® Red Fluorescent Oligo

realizó siguiendo el protocolo establecido por Santa Cruz Biotechnology, Inc®. Las células diana, IEC18 en nuestro caso, fueron sembradas en placas de 12 pocillos con medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suplementado con suero bovino fetal (10%), L-glutamina (2mM), antibióticos (1%: penicilina [100 U/ml, estreptomycin [0.1 mg/ml] y anfotericina B [2.5 ug/ml]), 24 horas antes de la transfección. Al día siguiente, cuando las células alcanzaron el 50% de confluencia se les añadió Polybrene® (sc-134220) a una concentración final de 5 ug/ml. El Polybrene® es un polícatión capaz de

neutralizar las interacciones por cargas producidas entre la cápside viral y la membrana celular, incrementando la unión entre ambas. A continuación las células fueron infectadas con partículas lentivirales shRNA control (sc-108080), shRNA MyD88 (sc-106986-V) y shRNA TLR4 (sc-156001-V), en cada caso. La eficiencia de la transfección fue comprobada utilizando partículas lentivirales copGFP (sc-108084). Tras 24 horas de la transfección las células fueron lavadas con DMEM suplementado sin Polybrene® e incubadas de nuevo 24 horas. Para seleccionar los clones estables en la expresión del shRNA, las células fueron divididas 1:3-1:5 e incubadas durante 24-48h más. A continuación la selección de los clones estables para la expresión de shRNA fue realizada mediante selección con puromicina dihidroclorhídrica (sc-108071) en un rango de concentración entre 2 y 10 $\mu\text{g/ml}$ añadida al medio de cultivo. Éste fue reemplazado cada 3-4 días con puromicina añadida de forma extemporánea, hasta que las colonias resistentes fueron identificadas. Una vez seleccionadas, las colonias fueron expandidas y se comprobó la expresión estable de shRNA mediante RT-PCR y western blot.

1.4 TRANSFECCIÓN DE RNA PEQUEÑO miRNA-146a IMITADOR EN CÉLULAS IEC18 Y Caco2

Antes de iniciar los experimentos de transfección fueron establecidas las condiciones óptimas de la misma usando BLOCK-iT™ Alexa Fluor® Red Fluorescent Oligo (Invitrogen), un oligonucleótido marcado con fluorescencia, el cual puede evidenciar la inserción del RNA de doble hebra en la célula usando lípidos catiónicos (Lipofectamina® RNAiMAX Transfection Reagent, Invitrogen™) de esta manera se puede evaluar cualitativamente la transfección en células vivas mediante microscopía de fluorescencia, como puede verse en la *Imagen 2*.

Las células IEC18 y Caco-2 fueron sembradas en placas de 12 pocillos a una concentración de 2×10^5 y 4×10^5 respectivamente. Transcurridas 24 horas las células fueron transfectadas con mirVana™ miRNA-146a Mimic (secuencia corta de doble cadena de RNA modificada químicamente, la cual imita la función del miRNA endógeno) y su correspondiente control negativo a una concentración de 30 nmol en el caso de IEC18 y 60 nmol en el caso de Caco-2 usando Lipofectamina® RNAiMAX Transfection Reagent (Invitrogen™).

3. ENSAYOS *EX VIVO*

AISLAMIENTO DE VELLOSIDADES, CRIPTAS Y CULTIVO DE ORGANOIDES DE YEYUNO DE RATÓN

Los organoides de ratón fueron generados a partir de criptas aisladas de yeyuno de ratón y mantenidas en cultivo.

- **Aislamiento de vellosidades:** El yeyuno aislado de ratones Wild Type (WT, por sus siglas en inglés), fue abierto longitudinalmente, y lavado con tampón fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés). A continuación, el tejido fue dispuesto exponiendo la mucosa para realizar un legrado de las vellosidades de la superficie con la ayuda de un cubre-objetos y seguidamente se procedió al aislamiento de RNA.
- **Aislamiento de criptas** El yeyuno aislado de ratones WT, fue abierto longitudinalmente, lavado con PBS y cortado en trozos de aproximadamente 5 mm. A continuación, se lavó nuevamente con PBS frío y dichos fragmentos fueron incubados en EDTA 2mM (en PBS) durante 30 min, bajo rotación lenta (40 xg) a 4°C. Una vez finalizada la incubación se eliminó la solución de PBS/EDTA y se resuspendieron vigorosamente los fragmentos en PBS frío con una pipeta de 10 mL. De esta forma, las vellosidades quedan suspendidas en el sobrenadante, el cual puede ser descartado o reservado para el posterior aislamiento de RNA. El sedimento restante fue resuspendido con PBS de igual forma que en el paso descrito anteriormente y centrifugado (500 xg 5 min), de forma que el sobrenadante resultante queda enriquecido en criptas. Esta fracción fue pasada a través de un filtro de 70 mm (cell strainer BD Falcon™) para eliminar el material residual de las vellosidades y esta última porción fue centrifugadas a 200 xg durante 3 min para separar las criptas de otros tipos celulares. La fracción final está formada fundamentalmente por criptas, la separación de criptas, que serán utilizadas a continuación para el cultivo de organoides o para aislamiento de RNA.

- **Cultivo de organoides (17,532):** Un total de 500 criptas fueron mezcladas con 50µL de Matrigel™ (BD Bioscience) y sembradas en placas de 24 pocillos.

Después de la polimerización del Matrigel™, se añadieron 500µL de medio

de cultivo para Criptas (Advanced DEMEM/F12 (invitrogen, Barcelona, España)) al que fueron adicionados factores de crecimiento (10-50 ng/mL EGF (Petrotech), 500 ng/mL R-sponding 1 (medio condicionado de células HEK293T transfectadas de forma estable con Rspo1, las cuales fueron proporcionadas por CJ. Kuo, Departamento de Medicina de la Universidad de Standford, California) y 100 ng/mL de noggin (Petrotech). El medio de cultivo junto con estos factores fue renovado cada dos días. Para realizar el pase de los organoides, estos son separados del Matrigel™ disociándolos mecánicamente en dominios de criptas individuales y posteriormente fueron transferidos a Matrigel™ fresco. Este procedimiento fue realizado cada 1-2 semanas a una ratio de división de 1:4. Un ejemplo de la evolución del crecimiento en el tiempo se muestra en la **ilustración 8**.

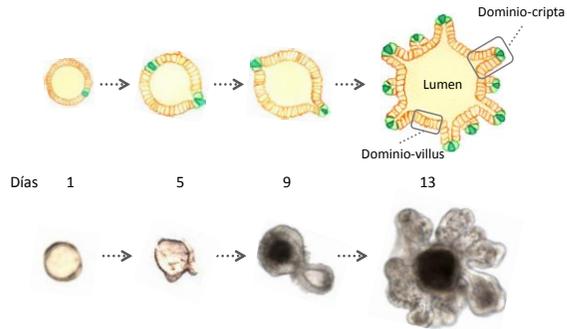


Ilustración 8 e imagen 3. Establecimiento de organoides intestinales procedentes de yeyuno. **Ilustración 9.** Representación esquemática de organoide intestinal de yeyuno con el lumen, el cual corresponde al lumen intestinal. **Imagen 3.** Evolución temporal del aislamiento de una cripta.

EXPLANTES DE TEJIDO COLÓNICO

En este experimento se utilizaron los ratones hembras de 8 a 10 semanas C57BL/6J WT a los que se les indujo la colitis administrándoles DSS al 2.5% en el agua de bebida y su correspondiente grupo control al que se le administro agua de bebida sin DSS, tal como se ha descrito previamente (ver Diseño experimental de la inducción de colitis por DSS). Una vez extraído el colon y lavado, se abre longitudinalmente y se realiza un corte transversal de un

fragmento en la zona próxima al extremo distal que es dividido en fragmentos de aproximadamente 0.5 cm^2 . 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. 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], estreptomina [0.1 mg/ml] y anfotericina B [2.5 $\mu\text{g/ml}$]) e incubados durante 24 horas en una atmósfera con el 5% de CO_2 y a 37o C. Para terminar, el medio de cultivo fue recogidos y 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 citocinas por ELISA.

4. TÉCNICAS EXPERIMENTALES

5.1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD MIELOPEROXIDASA (MPO) Y FOSFATASA ALCALINA (AP) 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⁻¹). Se tomó una alícuota para determinar la actividad AP y el resto de la muestra se sometió a un triple proceso de congelación-descongelación-sonicación, proceso que facilita la ruptura de las estructuras celulares, favoreciendo de este modo la liberación de la enzima. Tras la última descongelación, se centrifugó el homogenado a 7000g durante 10 min a 4°C y se procedió a la determinación de la actividad MPO. Ésta se llevó a cabo mediante un método espectrofotométrico basado en el uso de o-dianisidina y H_2O_2 , según describió Krawisz en 1984 (533), con mínimas modificaciones. Para ello se añadieron 50 μL del sobrenadante a 150 μL del reactivo de coloración preparado de forma extemporánea, y compuesto por clorhidrato de o-dianisidina (0.668 mg. mL^{-1}) y peróxido de hidrógeno al 0.0005% (V.V⁻¹) en tampón fosfato sódico (50 mM, pH 6). El incremento de absorbancia se determinó a 450 nm. La actividad MPO se calcula por interpolación de una curva patrón, realizada con peroxidasa de rábano. Una unidad de MPO (U) se define como la cantidad

necesaria para degradar 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ de peróxido de hidrógeno a 25°C. Los resultados se expresaron como mU/mg de proteína.

Por otro lado, la actividad fosfatasa alcalina fue determinada usando el método espectrofotométrico descrito en 1946 por Bessey (534) y que posteriormente fue adaptado por Sánchez de Medina y colaboradores en 2004 (535). En dicho protocolo la AP actúa sobre el p-nitrofenilfosfato sódico dando lugar a fosfato y a anilina, la cual presenta color amarillo, que se puede cuantificar espectrofotométricamente. Para ello se incubaron por duplicado 5 μL de muestra con 10 μL de agua, 25 μL de tampón glicina 50 mM con 0.5 mM MgCl_2 y 50 μL de reactivo (p-nitrofenilfosfato sódico 5.5 mM en tampón glicina) a 37°C durante diferentes periodos de tiempo en función del tipo de muestra biológica. Asimismo, se determinó rutinariamente la sensibilidad a la inhibición por levamisol in vitro, midiendo en paralelo la actividad enzimática en presencia de distintas concentraciones de levamisol (0.1, 1 y 10 mM). Tras el tiempo necesario de incubación, se paró la reacción con 120 μL de NaOH 2N y se midió la absorbancia a 405 nm. Los resultados se expresan como mU/mg de proteína. Una unidad de AP (U) se define como la cantidad necesaria para degradar 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ de p-nitrofenilfosfato sódico en condiciones estándar.

5.2. AISLAMIENTO DE RNA Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE RT-qPCR

Diferentes protocolos iniciales se llevaron a cabo, dependiendo de la naturaleza del experimento. Así:

- Tejido proveniente de rata y ratón fue recolectado y conservado en RNAlater™ a -20°C hasta ser procesados para el aislamiento de RNA total.
- Las muestras procedentes de distintos tipos celulares aislados de ratón, como criptas y vellosidades, fueron procesados directamente para el aislamiento de RNA total.
- Las células IEC18 y Caco-2 fueron cultivadas hasta alcanzar la confluencia, momento en el que se adicionan al medio de cultivo diferentes estímulos o citocinas proinflamatorias (dependiendo del

modelo celular) durante 24 horas. Seguidamente, las células son procesadas para el aislamiento de RNA total.

- Los organoides provenientes de intestino delgado de ratón fueron cultivados durante 2-4 semanas, sembrados en placas de 48 pocillos y crecidos durante dos semanas. Una vez transcurrido este tiempo, diferentes citocinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF e IFN γ 1g/mL, eBioscience) fueron adicionadas durante 24 horas al medio de cultivo. A continuación los organoides fueron procesados directamente para el aislamiento de RNA total.

En todos los casos, el RNA total fue obtenido mediante Trizol (Invitrogen, Alcobendas, España). La cuantificación y la integridad del RNA se comprobó mediante el espectrofotómetro nanodrop ND-1000 (ratio de absorbancia 260/280 nm) y electroforesis en gel de agarosa 1% utilizando midori green (Nippon Genetics Europe, Dueren, Alemania) como marcador. A continuación, un 1 μ g fue retrotranscrito (en organoides el cDNA fue generado a partir de 500 ng), usando iScript cDNA synthesis kit Bio-Rad (Madrid, España). Para realizar la reacción en cadena de la polimerasa se utilizó Sybr green como fluoróforo (Promega Madison, WI, EEUU). Los genes de referencia elegidos fueron la subunidad 18s del RNA ribosómico, GAPDH o β -actina en algunos casos y U6 en el caso de miRNA-146a. Como la administración de DSS oral puede interferir con la amplificación de cDNA mediante RT-PCR (536), para evitar este inconveniente se utilizó el kit de purificación de mRNA Dynabeads (Life Technologies, Alcobendas, Madrid) que se basa en la complementariedad entre los residuos de poly A del extremo 3' del mRNA y los residuos de oligo (dt)₂₅ unidos covalentemente a la superficie de las bolitas magnéticas. En las muestras de mRNA purificado se utilizó como gen de referencia GAPDH. Las secuencias específicas de RNA fueron amplificadas con el dispositivo CFX96 (Biorad Laboratories®, California, EEUU). Los distintos cebadores empleados se describen en la *tabla 6*.

El programa de PCR incluyó una etapa de pre-incubación a 95 °C durante 10 min para activar la Taq-polimerasa antes de 40 ciclos de desnaturalización (95 °C, 30 seg), hibridación (x^* °C, 1 min) y extensión (72 °C, 30 seg). El ciclo umbral (C_T) del gen de interés se sustrajo de la media geométrica de los C_T de los genes de referencia (18s, β - actina, GAPDH y U6) para obtener ΔC_T . La expresión relativa de mRNA se calculó utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ utilizando 18s, β -actina, GAPDH o U6 como genes de referencia (537).

x *: La temperatura de hibridación depende de la secuencia del cebador a amplificar. Consulte la *tabla 6*.

Tabla 6. secuencia de cebadores utilizados en la PCR cuantitativa a tiempo real.

Humano	Nombre del gen	Hebra sentido (5'-3') *	Hebra sentido (3'-5') *	Temperatura de hibridación
	pri-miR-146a	GCTTTGAGAAGTGAATTCATGGGT	CGATGACAGAGATATCCAGCTGAAG	61
	U6	GCTCGCTTCGGCAGCACATATACTAA	ACGAATTTGCGTGTACTCTTGCG	61
Rata				
	18s	GGACACGGCAGGATTGAC	TCGCTCCACCACTAAGAAC	60
	S100A8	GCCACCCTTATCACCAAC	TGCCCTCAGTTTGTGCAGAA	60
	IL-1β	AATGACTGTCTTTGAGGCTG	CGAGATGCTGCTGTGAGATTTGAAG	60
	ICAM1	GTCAAACGGGAGATGAATGG	TCTTCTCTGGCGGTAATAG	60
	TNFα	GTCGTAGCAAAACCCAA	GCTGACTTTCTCTGGTATG	60
	CCL2/MCP-1	TCGGCTGGAGAATACTAA	CTGAAGCTCTAGGGTTGATG	60
	IL-6	GCTCTGGTCTTCTGGAGTTCCG	TTGGATGGCTTTGGCTTAGCC	59
	CXCL1	GCTCTGAGACAATGAACGCTACAC	TTCTTCCACATCTATGCCTTTGAG	60
	TLR2	AAAAACTGCTGAGATTTTGC	TACTAACATCCAAACCTCC	60
	TLR4	GATCAGAACTCAGCAAAGTC	TGTTCAATTTACACACTGG	58
	TLR5	AAAAGCAGCAGTATTGAGG	ACTAGGAAACCCTCTTATG	60
	TLR9	CCTTGGTTCCAGTAACATC	CAGAAGTCCATATTCACAGTTC	60
	NOD2	AACCTCAGCCATAACATCC	ACTTCCAGCAGTAAGTCTAC	60
	TGFβ	CGTGGCTTCTAGTCTGACG	ACTGGCAGCCTTAGTTTG	61
	FOXP3	CCCAGGAAAAGACAGCAACCTT	CTGCTTGGCAGTCTTGAGAA	62
	Pri miR-146a	GCTCTGAGAAGTGAATTCATGGGT	ATGACGATAGAGCTATCCAGC	61
	U6	GCTCGCTTCGGCAGCACATATACTAA	ACGAATTTGCGTGTACTCTTGCG	61
Ratón				
	S100A8	GCCCTTACAAGAATGACTTCAAG	ATCACCATCGCAAGGAACTCC	60
	IL-22	ATCAGTGCTACTGATGAAG	CATTCTTCTGGATGTTCTGG	60
	IL-17A	ACGTTTCTCAGCAAACCTTAG	CCCTTTTACACCTCTTTTTC	60
	IL-27	AATCTCGATTGCCAGGAG	CTCAGAGTCAGAGAGGGTG	60
	IAP	CATGGACATTGATGTGATCC	AGACTGGTACTGTCACTTG	60
	TLR2	CTAGAAGTGGAAAAGATGTCCG	TAGCATCTCTGAGATTTGAC	60
	TLR4	GATCAGAACTCAGCAAAGTC	TGTTCAATTTACACACTGG	60
	IL-1β	AAGGGCTGCTTCAAACCTTTGAC	TGCCCTGAAAGCTTGTGTGATGTC	60
	IL-6	AAGAAATGATGGATGCTACC	GAGTTTCTGTATCTCTGGAAG	60
	IFNγ	GCTCTGAGACAATGAACGCTACAC	TTCTTCCACATCATGCCACTTGAG	60
	TNFα	CGTGGAACTGGCAGAAGAGG	CAGGAATGAGAAGAGGCTGAGAC	60
	CXCL1	CGATGTGGATGCGTTTCA	CACACATTTCTCACCTTAAC	60
	iNOS	GATGTGCAGTCTATTGGTC	GCATCGTCCCAACTCTGGTCTC	60
	COX-2	AGTCAAAGACACTCAGGTAGA	GAGTCTGCTGGTTTGGAAATAG	60
	REG3γ	CAGAGGTGGATGGGAGTGGAG	CACAGTGATTGCCCTGAGGAAGAGA	60
	MMP3	GCCTTGGCTGAGGGGTAGAGTC	GACGATGATGAACGATGGACAGAG	60
	CTR	GGAAAGATGATGGTGAAGTACAG	AGGCAGAGCTAGTGAAGAA	60
	NKCC1	CTGCTGCAACTGGTATTCT	GTTTGTGAGCTGTGTGAATG	60
	NHE3	AAGCGCTGGAGTCTTTAAGTCA	ATGCTGCTATTCCTCCGCTTGT	60
	DRA	ACTTTGAAGACAGTTTGGCGTGG	TATTTGAGGAGATACACGCTGGCA	60
	pri-miR-146a	GCTCTGAGAAGTGAATTCATGGGT	AGCTGAAGAAGTGAATTTACAGGTC	61
	U6	GCTCGCTTCGGCAGCACATATACTAA	ACGAATTTGCGTGTACTCTTGCG	61
	18s	TGGTGGAGCGATTTGTCTGG	ACGCTGAGCCAGTCAGTGTACG	60
	HPRT	AGGGATTTGAATCACGTTTG	TTTACTGGCAACATCAACAG	60
	β-actina	GATGTATGAAGGCTTTGGTC	TGTGCACCTTTATTGGTCTC	60

5.3. MICROARRAY: extracción de RNA, hibridación del microarray y análisis de los datos

En el caso de este ensayo se realizaron dos experimentos independientes. En el primero de ellos las muestras de mRNA aisladas fueron obtenidas a partir de monocapas de células Caco-2 cultivadas a 2, 7 y 17 días de confluencia, considerando el grupo de 2 días de confluencia como grupo control. El segundo experimento se realizó en células Caco-2 al alcanzar la confluencia que fueron distribuidas en tres grupos, un grupo control y dos grupos bajo condiciones inflamatorias que se obtuvieron añadiendo IL1- β y TNF al medio de cultivo, considerando como grupo control células que no recibieron ningún tipo de estimulación. Como se ha descrito anteriormente, en ambos casos, el RNA se purificó con miRneasy Mini kit, siguiendo las instrucciones del fabricante. El control de calidad del RNA se realizó por medio del espectrofotómetro nanodrop ND-1000 (ratio de absorbancia $A_{260}:A_{230}$ mayor o igual a 1.7. y ratio $A_{260}:A_{280}$ mayor o igual a 2.0.) y mediante electroforesis en gel de agarosa 1% utilizando midori green (Nippon Genetics Europe, Dueren, Alemania) como marcador. Posteriormente se realizó la retrotranscripción usando el kit suministrado por QIAGEN (RT² miRNA first strand kit); este proceso incluyó: incubación a 37 °C durante 120 min, luego un calentamiento de la muestra a 95 °C durante 5 min para inactivar la transcriptasa inversa, enfriamiento de la muestra en hielo al menos durante 1 min y adición de agua libre de RNAsas (cantidad indicada en el kit); finalmente, se analizó el perfil de expresión de 84 miARNs por PCR, utilizando un *array* de desarrollo y diferenciación celular (RT² miRNA PCR Array, MAH-103) suministrado por QIAGEN, es importante acotar que en ambos experimentos se utilizaron *arrays* que contenían los mismos miRNAs y estos fueron suministrados por la misma casa comercial, aunque los genes control variaron.

El perfil térmico del array incluyó una etapa de pre-incubación a 95 °C durante 10 min antes de 40 ciclos de desnaturalización (95 °C, 15 seg), hibridación (60°C, 30-40 seg) y extensión (72 °C, 30 seg). La validación del análisis del array de miRNA fue desarrollada siguiendo las recomendaciones del fabricante, exportando los valores recogidos a una plantilla de análisis de datos habilitada por la casa comercial (Analyzing miScript miRNA PCR Array). La expresión individual de cada miRNA fue normalizada en relación a la expresión de la media de SNORD44, SNORD47, SNORD48 y U6 en el caso del array de distintos días de confluencia y SNORD44, SNORD47, SNORD48 y RNU6-2 en el

caso del array bajo condiciones inflamatorias. El análisis funcional de los microarrays fue llevado a cabo mediante el programa MeV (MultiExperiment Viewer), el cual permite analizar datos de microarrays incorporando algoritmos para la agrupación, visualización, clasificación y análisis estadístico en formato de mapa de calor o heatmaps.

5.4. DETERMINACIÓN DE CITOKINAS

Tras el cultivo de las distintas líneas celulares con los diferentes estímulos usados dependiendo de cada caso y los explantes colónicos, el sobrenadante se recogió y centrifugó a 10000 rpm 5 min, para eliminar restos celulares. Las distintas alícuotas se almacenaron a -80 °C hasta su posterior uso. Diversos kits comerciales fueron empleados para la determinación de las concentraciones de citokinas en dichos sobrenadantes mediante la técnica de enzimo-inmuno ensayo (ELISA, por sus siglas en inglés). Para ello se llevó a cabo un protocolo de medida basado en las indicaciones del fabricante del kit en cada caso. Los kits empleados fueron suministrados por: eBiosciences®, San Diego, CA, EEUU (IL-22, IL-6 e IL-17A, todos ellos de ratón) BD Biosciences®, Erembodegem, Bélgica (MCP-1 humana, de rata y ratón e IL-8 humana), y R&D System, Abingdon UK (GRO α de rata). Como control negativo se usaron células sin ningún tratamiento con estímulos.

5. 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 se realizó mediante la plataforma informática GraphPad Prism (California, EEUU).

Resultados

En los últimos 20 años, diversas investigaciones han tenido éxito en la identificación de genes de susceptibilidad para la EII a través de estudios de asociación de genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés) e immunochip (<http://www.ibdgenetics.org>) (538). Estos estudios han sido de gran importancia ya que han puesto en relieve vías mecanísticas, especialmente en la autofagia y la inmunidad innata en la EC y disfunción de la función barrera epitelial en la CU, además de proporcionar pistas sobre nuevas estrategias terapéuticas. En la actualidad existe un creciente interés en la exploración de los mecanismos epigenéticos de las enfermedades en general, con un notable progreso en los estudios de metilación de DNA, modificaciones de las histonas, secuencias largas intergénicas de RNA no codificante y en la caracterización de la contribución de los miRNAs.

Publicaciones de alto impacto han revelado interacciones funcionales entre los miRNAs y mecanismos claves implicados por GWAS en la EII (539,540). Uno de los principales objetivos de esta tesis doctoral fue realizar un estudio más profundo del papel de los miRNAs, concretamente en nuestro caso del miRNA-146a en la inflamación intestinal, con la finalidad de un mayor entendimiento de la función de este RNA de pequeño tamaño en la patogénesis de la EII, ya que esta ha sido poco descrita.

Por tanto en primer lugar nos planteamos como objeto dilucidar si existe una relación en la expresión de miRNAs en condiciones de diferenciación e inflamación.

1. miRNAs: DIFERENCIACIÓN E INFLAMACIÓN

Entre las líneas celulares de intestino, las células Caco-2 son muy utilizadas porque, a pesar de su origen cancerígeno, se diferencian en cultivo alcanzando un fenotipo parecido al de IECs (enterocitos). De hecho, se considera que en las células Caco-2 se produce el fenómeno de inhibición de su proliferación por contacto y que una vez inhibida la proliferación comienzan a diferenciarse. Se cultivaron células Caco-2 de modo que a los 7 días de cultivo llegasen a confluencia, por lo que a los 17 días de cultivo las células se encontraban diferenciadas. Como control se obtuvieron células cultivadas durante 2 días. Con el fin de confirmar el grado de diferenciación de las células, se determinaron las actividades fosfatasa alcalina y sacarasa/isomaltasa. Éstas son enzimas que se expresan en el borde en cepillo de enterocitos diferenciados (541). Como era de

esperar, la actividad de ambas enzimas se vio incrementada al aumentar el tiempo en cultivo (*Figura 1*).

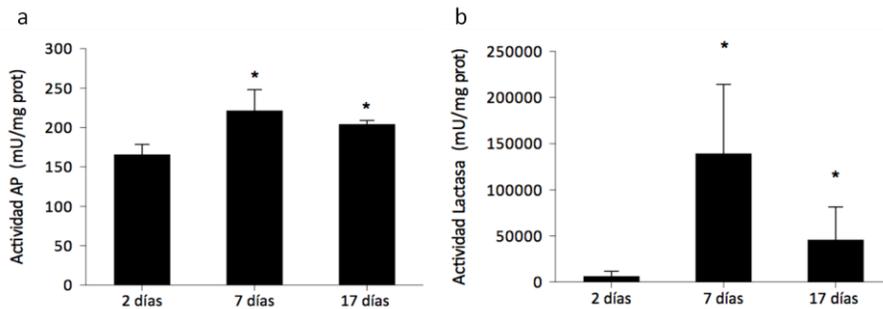
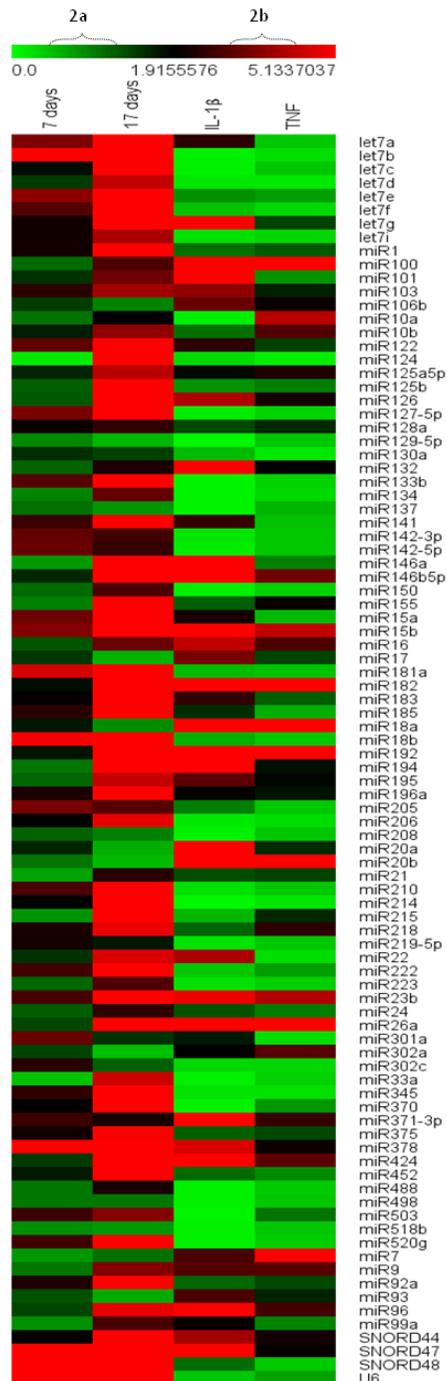


Figura 1. Variación de marcadores de diferenciación en células Caco-2 cultivadas durante 2, 7 y 17 días. (a) Actividad fosfatasa alcalina (mU/mg prot), (b) Actividad Lactasa (mU/mg prot), $n=3$. Las células fueron cultivadas a 2 (pre-confluencia), 7 (confluencia) y 17 (post-confluencia) días. Como grupo control se usaron las células cultivadas durante 2 días (pre-confluencia). Los datos se representan como media \pm SEM; * $p<0.05$

Utilizando un *microarray* específico para miRNAs involucrados en la diferenciación, que contenía 84 miRNAs, observamos que, en comparación con la muestra control, 40 miRNAs en la muestra recogida a los 7 días y 75 miRNAs en la muestra recogida a los 17 días se encontraban sobreexpresados (*Figura 2*). Se consideró sobreexpresión cuando el Fold Change (FC, por sus siglas en inglés) del grupo vs el grupo control era mayor de 2. Por otra parte, la expresión de 56 miRNAs se incrementó cuando las células Caco-2 fueron cultivadas durante 17 días en comparación con las cultivadas durante 2 días. En este caso el incremento se consideró cuando la diferencia entre el FC a los 17 días y el FC a los 2 días fue al menos de dos unidades. Es importante destacar que el patrón de expresión observado en la *figura 3* corresponde a la agrupación de miRNAs por familias según miRBase (<http://www.mirbase.org/>) indicando que miRNAs presentes en el *array* pertenecen a las familias Let7, miR1, miR15 o miR10. Por último, entre los miRNAs no pertenecientes a estas familias cuya expresión se encontró más incrementada se encontraron miR370 (FC=556,40), miR215 (FC=48,50) miR-378 (FC=39,67), miR181a (37,78), miR127-5p (FC=35,02), miR192 (FC=30,09), miR122 (16,56) y miR26a (FC=13,8).

Figura 2. Perfil de expresión de genes implicados en la diferenciación. Análisis de expresión de 84 genes de miRNAs en (a) células Caco-2 cultivadas a 2, 7 y 17 días de confluencia, considerando el grupo de 2 días de confluencia como grupo control (n=3). (b) Células Caco-2 cultivadas bajo estímulos proinflamatorios adicionando al medio de cultivo IL-1 β (10ng/ml) y TNF (20ng/mL) durante 24 horas, considerando como grupo control células que no recibieron ningún tipo de estimulación (n=3). El análisis funcional fue llevado a cabo mediante el programa MeV (MultiExperiment Viewer). La expresión de los genes se muestra como un mapa de calor (heatmap). Se consideró sobreexpresión cuando el FC del grupo estudiado vs el grupo control era mayor de 2 e inhibición cuando el FC del grupo estudiado vs el grupo control fue menor de 0.5.



No se localizaron miRNAs cuya expresión se encontrara disminuida respecto al control (FC<0.5 vs grupo control), con la excepción de miR302a, cuya expresión se encontró inhibida tanto a los 7 días como a los 17 días (FC=0,4 y FC=0,47, respectivamente). Miembros de la familia miR17 y del cluster (agrupación de genes) miR17-92 han sido relacionados con procesos de proliferación/diferenciación. En nuestro caso, no se observaron variaciones en la mayoría de los genes de este cluster con la diferenciación. Únicamente la expresión de miR18b y miR92 se vio incrementada (FC=15,89 y FC=7,16 respectivamente) (Figura 3).

incrementada (FC=15,89 y FC=7,16 respectivamente) (Figura 3).

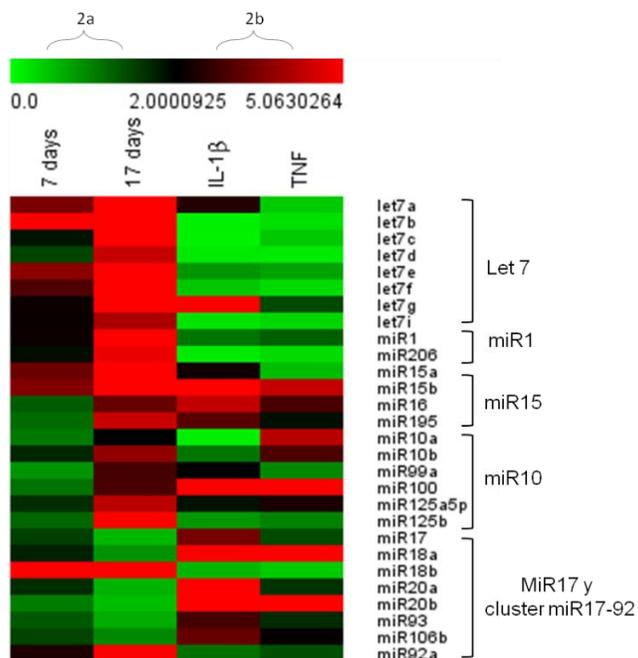


Figura 3. Familias y cluster de miRNA. Expresión de genes de miRNA pertenecientes a las familias Let7, miR1, miR15, miR10, MiR17 y cluster 17-92 de los 84 genes de analizados en: (a) células Caco-2 cultivadas a 2, 7 y 17 días de confluencia (n=3), considerando el grupo de 2 días de confluencia como grupo control y (b) Células Caco-2 cultivadas bajo estímulos proinflamatorios adicionando al medio de cultivo IL-1β (10ng/ml) y TNF (20ng/mL) durante 24 horas (n=3), considerando como grupo control células que no recibieron ningún tipo de estimulación. El análisis funcional fue llevado a cabo mediante el programa MeV (MultiExperiment Viewer.) La expresión de los genes se muestra como un mapa de calor (heatmap). Se consideró sobreexpresión cuando FC del grupo estudiado vs el grupo control era mayor de 2 e inhibición cuando el FC del grupo estudiado vs el grupo control fue menor de 0.5.

Cuando se ordenaron en orden creciente los FCs de todos los miRNAs analizados, varios miembros de la familia miR17 y del cluster miR17-92 aparecieron agrupados después de miR302a con FCs que variaron entre 0,51 y 0,92. Los FCs para estos miRNAs fueron: 0,51 para miR20b, 0,56 para miR17, 0,59 para miR20a, 0,63 para miR93, 0,85 para miR18a y 0,92 para miR106b (Figura 4).

Con el fin de estudiar el efecto de citocinas proinflamatorias sobre la expresión de miRNAs, las células fueron tratadas con IL-1β (10ng/mL) y TNF

(20ng/mL) durante 24 horas. Nuestros resultados indican que tanto la IL-1 β como el TNF inducen variaciones en la expresión de la mayoría de los miRNAs estudiados (*Figura 2*). De hecho, el tratamiento con IL-1 β o TNF indujo la expresión de 40 y 27 miRNA respectivamente, mientras que se inhibió la expresión de 33 y 37 genes. Entre los genes inducidos por TNF e IL-1 β cabe destacar los de las familias de miR10, miR15 y miembros de la familia miR17 y del cluster miR17-92 (*Figura 3*). Por otra parte, los genes de la familia Let7 fueron inhibidos por estas citocinas a excepción de Let7a y Let7g cuya expresión se vio inducida por IL-1 β (*Figura 3*).

La *figura 5* recoge los miRNAs que fueron más sobreexpresados e inhibidos por la adición de citocinas. El miRNA más sobreexpresado cuando las células fueron tratadas con IL-1 β fue el miR146a. Este efecto fue además específico del tratamiento con esta citokina, no observándose variación alguna cuando las células fueron tratadas con TNF. Este miRNA ha sido ampliamente estudiado en distintos tipos de cáncer y en células inmunes, de hecho su expresión está fuertemente asociada con el factor de transcripción NF- κ B (importante enlace causal entre la inflamación y la carcinogénesis) (542,543), sugiriendo que la manipulación de la expresión de miR-146a pueda representar una diana terapéutica para varias enfermedades, aunque su papel en la inflamación intestinal o en IECs ha sido poco investigado, por esto, aunado a la alta especificidad de efecto de la IL-1 β , hemos seleccionamos este miRNA para continuar nuestro estudio .

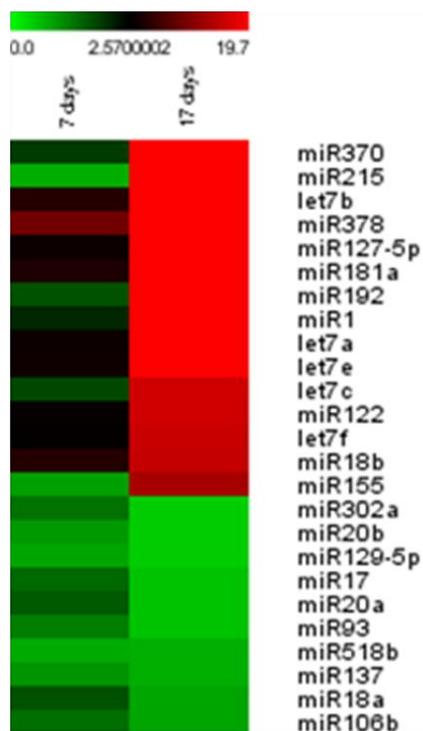


Figura 4. Agrupación jerárquica de miRNAs. 84 genes se analizaron y fueron asociados según el patrón de expresión en células Caco-2 cultivadas a distintos grados de confluencia (2, 7 y 17 días), como grupo control se usaron las células que fueron cultivadas durante 2 días (n=3). El análisis funcional fue llevado a cabo mediante el programa MeV (MultiExperiment Viewer). La expresión de los genes se muestra como un mapa de calor (heatmap). Se consideró sobreexpresión cuando el FC del grupo estudiado vs el grupo control era mayor de 2 e inhibición cuando el FC del grupo estudiado vs el grupo control fue menor de 0,5.

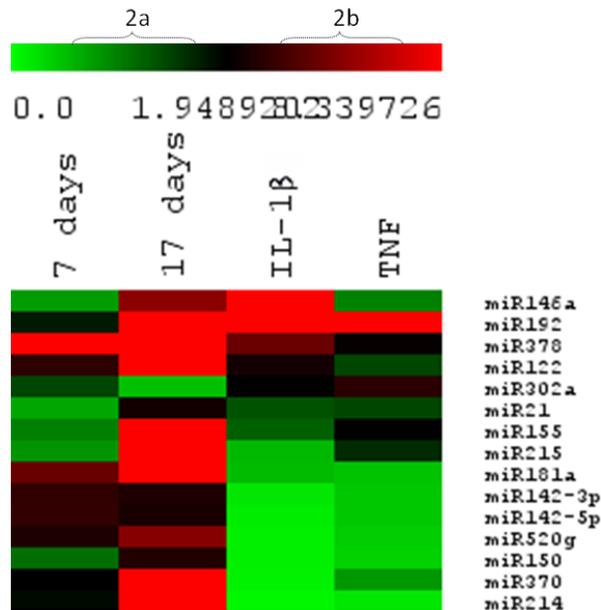


Figura 5. Sobreexpresión e inhibición. Comportamiento de los genes de miRNA más sobreexpresados e inhibidos de 84 genes analizados. (a) células Caco-2 cultivadas a 2, 7 y 17 días de confluencia, considerando el grupo de 2 días de confluencia como grupo control n=3. (b) Células Caco-2 cultivadas bajo estímulos proinflamatorios adicionando al medio de cultivo IL-1 β (10ng/ml) y TNF (20ng/mL) durante 24 horas, considerando como grupo control células que no recibieron ningún tipo de estimulación n=3. El análisis funcional fue llevado a cabo mediante el programa MeV (MultiExperiment Viewer). La expresión de los genes se muestra como un mapa de calor (heatmap). Se consideró sobreexpresión cuando el FC del grupo estudiado vs el grupo control era mayor de 2 e inhibición cuando el FC del grupo estudiado vs el grupo control fue menor de 0.5.

2. SOBREEXPRESIÓN DE miR-146A EN VARIOS MODELOS EXPERIMENTALES DE COLITIS.

Actualmente existen muy pocos estudios que evalúen el papel de miR-146a en la inflamación intestinal. Con la finalidad de estudiar más a fondo su función se evaluó la expresión de miRNA-146a en tres modelos de colitis experimental.

Cabe destacar que en los modelos de colitis inducida químicamente la reacción inflamatoria comienza inmediatamente o poco después de la administración del agente colítico (TNBS o DSS) ya que se produce la erosión

directa de la capa epitelial intestinal, con lo que dicha reacción inflamatoria no es estrictamente crónica, es decir, los animales se recuperan con el tiempo, mientras que el modelo de transferencia celular adoptiva se caracteriza por un inicio lento e insidioso (6-8 semanas) y un curso crónico.

En primer lugar se utilizó el modelo de colitis experimental por TNBS en ratas. 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% que provoca la erosión del intestino y permite el acceso del TNBS a la mucosa, donde se comporta como un hapteno desencadenando una respuesta inmune previa reacción con las proteínas tisulares (468,544).

Como era de esperar, los resultados obtenidos muestran que las características morfológicas y bioquímicas de la colitis inducida por TNBS fueron consistentes y concuerdan con estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación y otros autores (465,545–547). La administración de TNBS induce una respuesta inflamatoria grave a nivel colónico, caracterizada por erosión en la mucosa, necrosis epitelial temprana, fibrosis y edema, lo que se traduce en un marcado incremento del índice de daño macroscópico (IDM) (*Tabla 7*). El proceso de inflamación colónica también se acompaña de diarrea y una marcada pérdida de peso corporal con anorexia. Asimismo, y como consecuencia del proceso inflamatorio, se originó un engrosamiento de la pared intestinal y un acortamiento del colon que incrementaron la relación peso/longitud colónica en comparación con el grupo control (*Tabla 7*).

Tabla 7. Parámetros macroscópicos y bioquímicos en el modelo experimental de colitis por TNBS. Actividades enzimáticas y variables macroscópicas en el tejido colónico de ratas control (grupo control, n=5) y ratas que recibieron TNBS en etanol por vía intrarrectal (grupo TNBS, n=6). El sacrificio de los animales se realizó 5 días después de la inducción de la colitis. Los datos están expresados como media \pm SEM. *p < 0.05 versus grupo control.

Grupo	Ganancia de peso	IDM	Relación peso/ longitud colónica (mg/cm)	Extensión del daño	Actividad MPO colónica (mU/mg proteína)	Actividad AP (U/mg proteína)	Sensibilidad de AP a levamisol (%)	Consumo de comida (g/rat. día)
Control	12.9 \pm 1.3	---	66.7 \pm 3.7	---	0.017 \pm 0.02	33.63 \pm 0.89	14.775 \pm 1.93	23.16 \pm 2.97
TNBS	-5.9 \pm 2.2 [*]	11.5 \pm 1.5 [*]	230.5 \pm 47.1 [*]	2.9 \pm 0.5 [*]	9.82 \pm 0.95 [*]	132.6 \pm 10.16 [*]	64.9 \pm 1.81 [*]	10.77 \pm 5.65 [*]

Los análisis bioquímicos realizados en el tejido colónico revelaron un incremento significativo de 648,1 veces en la actividad enzimática de mieloperoxidasa (MPO), hecho debido presumiblemente al reclutamiento neutrofílico en la mucosa colónica de los animales colíticos (*Figura 6a*). Análogamente la actividad fosfatasa alcalina (AP) se incrementó 3,9 veces (*Figura 6b*). Nuestro grupo de investigación describió en estudios realizados previamente que la actividad AP podía ser un buen marcador de inflamación intestinal ya que se encuentra incrementada en el colon de modelos preclínicos de colitis en rata y ratón (535), todos los modelos de inflamación colónica que se examinaron en el estudio antes referido se caracterizaron por un significativo estrés oxidativo e infiltración leucocitaria, lo que probablemente da lugar al incremento en la actividad AP a nivel colónico. Existen al menos 4 isoformas de AP en humanos: fosfatasa alcalina intestinal (IAP) la cual se expresa principalmente en intestino delgado y fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNAP), la cual a su vez se diferencia en 3 isoformas (hepática, renal y ósea) que difieren a nivel de mRNA y en sus glucosilaciones. Investigaciones previas de nuestro grupo de investigación han descrito que la isoforma no específica de tejido es la responsable del incremento de la actividad observada en el colon de los modelos animales y en células del epitelio intestinal (548).

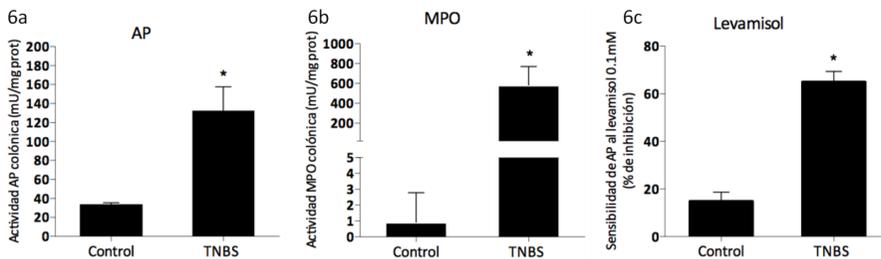
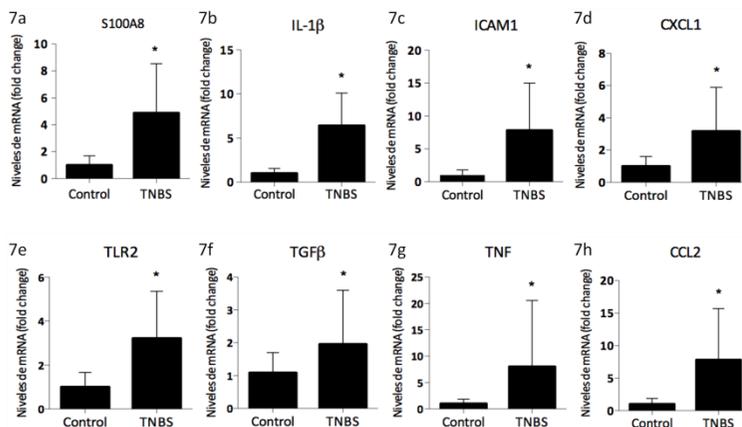


Figura 6a-c. Actividades enzimáticas (a) MPO (mU/mg prot), (b) AP (mU/mg prot) y (c) sensibilidad a levamisol 0.1 nM (%) en el tejido colónico de ratas control (grupo control, n=5) y ratas que recibieron TNBS en etanol por vía intrarrectal (grupo TNBS, n=6). El sacrificio de los animales se realizó 5 días después de la inducción de la colitis. Los datos se representan como media \pm SEM ; * $p < 0.05$.

En este sentido, se evidenció un aumento de la sensibilidad al levamisol (inhibidor específico in vitro de AP) (*Figura 6c*); es importante resaltar que el incremento de la sensibilidad al inhibidor levamisol, apunta a un cambio de isoforma, presumiblemente de la forma hepática a la renal. En síntesis, existe un incremento de expresión de TNAP en el intestino inflamado que está asociado al cambio de isoforma, este cambio es achacable en parte a la infiltración de neutrófilos y posiblemente otros leucocitos, que expresan este tipo de AP, pero también a una modulación de la expresión que tiene lugar en el epitelio (548).

La expresión colónica de citocinas proinflamatorias fue estudiada mediante PCR en tiempo real (*Figura 7a-g*). Los resultados muestran que el grupo de animales colíticos exhibe un incremento significativo en la expresión de los distintos parámetros analizados: la proteína S100A8 (un marcador neutrofílico que junto con S100A9 forma el dímero calprotectina) ha sido estudiada con interés por presentar niveles muy elevados en diversos trastornos inflamatorios, incluyendo la EII, de hecho, es un marcador ampliamente utilizado de actividad inflamatoria en el intestino, a través de su detección en heces; IL-1 β (conocida citokina proinflamatoria que destaca por su papel en la activación de macrófagos y por ser un factor mitógeno de linfocitos); ICAM1 (una molécula de adhesión intracelular útil en la trans migración de leucocitos); CCL2/MCP-1 (marcador de infiltración de monocitos); TNF (citokina proinflamatoria originada principalmente por macrófagos activados); IL-6 (citokina proinflamatoria producida por macrófagos y linfocitos) y CXCL1 (quimiokina que desempeña un papel importante en la migración y activación de linfocitos y neutrófilos).



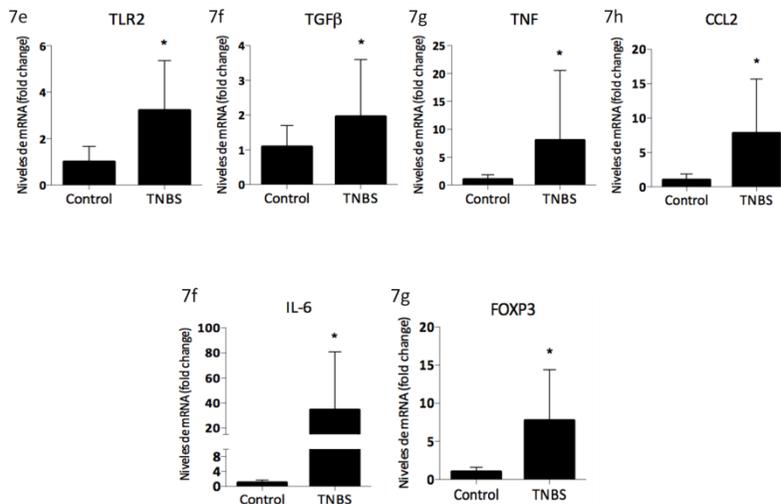
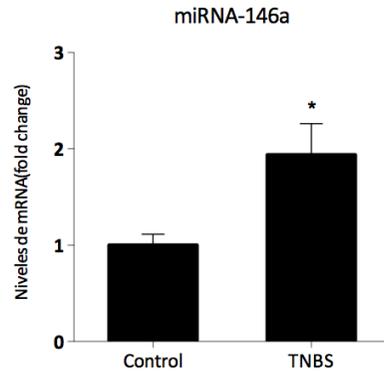


Figura 7a-j. Expresión génica medida por PCR a tiempo real de *S100A8*, *IL1β*, *CCL2/MCP1*, *TNFα*, *CCXL1*, *IL-6*, *ICAM1*, *TLR2*, *TGFβ* y *FOXP3* en tejido colónico de ratas control (grupo control, n=5) y ratas que recibieron TNBS en etanol por vía intrarrectal (grupo TNBS, n=6). El sacrificio de los animales se realizó 5 días después de la inducción de la colitis. La expresión génica en tejido colónico fue expresada como fold change basado en $2^{-\Delta\Delta Ct}$ usando como gen de referencia *18s*. Todos los datos se expresan como incremento frente al grupo control, y se expresan como media \pm SEM; * $p < 0.05$.

Es importante destacar que hubo un aumento significativo de la expresión de TLR2 (figura 7h), receptor transmembrana que ejerce un papel fundamental en el reconocimiento de patógenos y la activación de la inmunidad innata. Así mismo se estudió la expresión de TGF-β y Foxp3 (figuras 7i-j). y se observó que ambos parámetros estaban significativamente incrementados. El TGF-β es un péptido multifuncional involucrado en la regulación de los procesos de proliferación y diferenciación de diversos tipos celulares y es un factor necesario para la inducción de la expresión de Foxp3 en linfocitos T reguladores.

Como se comenta al inicio, el principal propósito de este estudio fue evaluar la expresión de miR-146a tanto en los animales controles como en los colíticos, con la finalidad de conocer su papel en la patogénesis de la EII. El análisis de la expresión del miRNA-146a por PCR a tiempo real mostró un incremento significativo de su expresión en los animales colíticos frente al grupo control (figura 8).

Figura 8. Expresión génica medida por PCR a tiempo real de miR-146a en tejido colónico de ratas control (grupo control, n=5) y ratas que recibieron TNBS en etanol por vía intrarrectal (grupo TNBS, n=6). El sacrificio de los animales se realizó 5 días después de la inducción de la colitis. La expresión génica de miR-146a fue expresada como fold change basado en $2^{-\Delta\Delta Ct}$ usando como gen de referencia U6. Todos los datos se expresan como media \pm SEM ; * $p < 0.05$.



A continuación, y tras demostrar que la expresión de miR-146a se encontraba incrementada en el modelo de colitis inducido por TNBS, decidimos analizar la expresión de miRNA146-a en un segundo modelo preclínico de EII, el modelo de colitis en ratón inducido por sulfato de dextrano sódico (DSS). El DSS es un polímero sulfatado con capacidad tóxica sobre las células epiteliales intestinales, además cuando es administrado por vía enteral favorece el aumento de bacterias anaeróbicas *gram*-negativas, lo que junto con el potencial erosivo sobre la barrera intestinal y la inapropiada respuesta inflamatoria propiciará la aparición de lesiones intestinales (544,549). Previos estudios realizados por nuestro grupo de investigación y otros autores avalan que La suplementación al agua de bebida con DSS provoca un estado colítico en animales que han sido tratados bajo estas condiciones (550–552). En el presente estudio, la colitis se indujo mediante la administración de DSS al 2.5% (P/V) en el agua de bebida durante 7 días a ratones C57BL/6J WT hembras. Como se puede observar en *la Figura 9*, los animales colíticos mostraron una caída del peso corporal significativa a partir del quinto día de la administración del DSS.

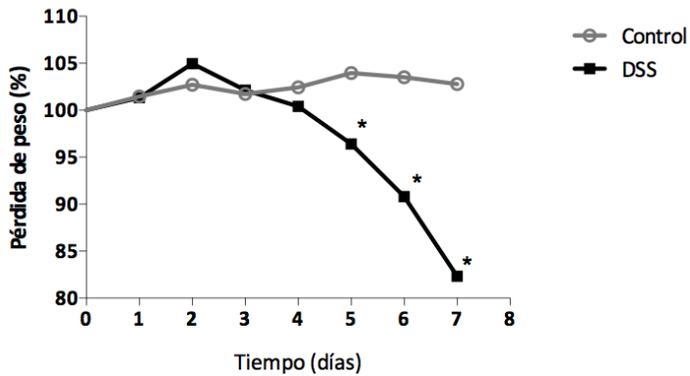


Figura 9. Pérdida de peso corporal con respecto al día 0 expresado en porcentaje (%), de ratones que recibieron DSS (grupo DSS, n=8) al 2.5% (P/V) en el agua de bebida durante 7 días y de ratones control (grupo control, n=6). El sacrificio de los animales se realizó 7 días después de la inducción de la colitis. Todos los datos se expresan como incremento frente al grupo control, y como media \pm SEM; * $p < 0.05$.

Igualmente, en este modelo se determinó el peso corporal y la longitud del colon (*Figura 10a y 10b*), así como la relación entre ambos parámetros, observándose en el grupo colítico un mayor peso del colon así como un acortamiento del mismo, lo que se tradujo en un incremento significativo de la relación peso/longitud colónica (*Figura 10c*) comparándolo con el grupo control.

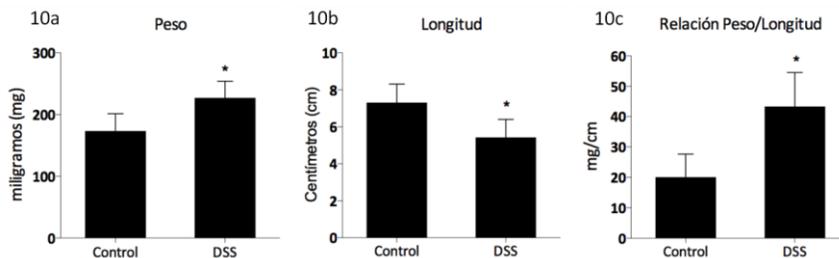


Figura 10a-c. Parámetros peso (a), longitud (b) y relación peso-longitud (c) del colon expresado en miligramos (mg), centímetros (cm) y relación (mg/cm) respectivamente, de ratones que recibieron DSS (grupo DSS, n=8) al 2.5% (P/V) en el agua de bebida durante 7 días y de ratones control (grupo control, n=6). Todos los datos se expresan como incremento frente al grupo control, y como media \pm SEM; * $p < 0.05$.

Así mismo, se analizó la secreción *ex vivo* de citocinas por medio de explantes colónicos en cultivo, para así confirmar el carácter inflamatorio de dicho modelo (*Figura 11a-d*). Para ello se cuantificó la liberación de MCP-1, IL-6, IL17A e IL22 (estas dos últimas citocinas inflamatorias secretadas por los TH17 que promueven la infiltración de neutrófilos, lo que a su vez potencia la cascada inflamatoria (553).

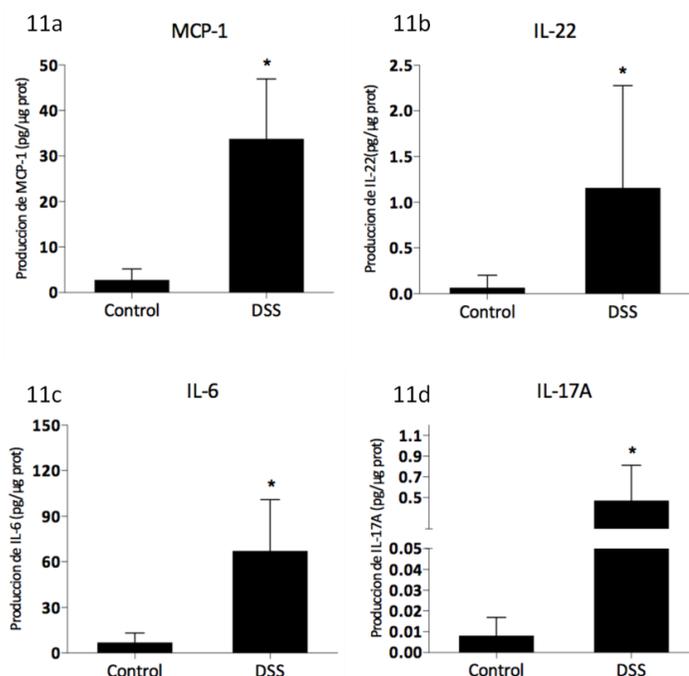


Figura 11a-d. Producción de las citocinas MCP-1 (a), IL-22 (b), IL-6 (c) e IL-17 (d) por los explantes colónicos expresada en pg/μg proteína de ratones que recibieron DSS (grupo DSS, n=8) al 2.5% (P/V) en el agua de bebida durante 7 días y de ratones control (grupo control, n=6). Datos expresados como media ± SEM). La medida de las distintas citocinas fue realizada por ELISA. Todos los datos se expresan como incremento frente al grupo control, *p<0.05.

Por otro lado, se llevó a cabo el análisis de distintos parámetros hematológicos en sangre total en el Centro de instrumentación científica de la Universidad de Granada, sin detectar diferencias significativas entre los grupos, si bien, se pudo observar una mayor población de glóbulos blancos, así como un

mayor porcentaje de monocitos/macrófagos en el grupo de los animales a los que se les suministro DSS en el agua de bebida (*Tabla 8*).

Tabla 8. Poblaciones celulares sanguíneas. WBC: glóbulos blancos totales ($10^3/\mu\text{L}$). RCB: glóbulos rojos totales ($10^6/\mu\text{L}$). HGB: hemoglobina (g/dL). HCT: hematocrito. PLT: plaquetas totales ($10^3/\mu\text{L}$). MPV: volumen plaquetario medio (fL). PCT: trombocito. PDW: distribución de tamaños de plaquetas de ratones que recibieron DSS (grupo DSS, $n=8$) al 2.5% (P/V) en el agua de bebida durante 7 días y de ratones control (grupo control, $n=6$). Datos expresados como media \pm SEM.

GLÓBULOS BLANCOS				
	WBC (totales)	Linfocitos (%)	Monocitos (%)	Neutrófilos (%)
Control	2.62 \pm 0.77	82.1 \pm 2.44	9.32 \pm 2.35	6.62 \pm 1.62
DSS	3.21 \pm 0.70	80.44 \pm 2.58	10.49 \pm 2.02	5.44 \pm 1.31

GLÓBULOS ROJOS			
	RCB (totales)	HGB	HCT
Control	8.91 \pm 0.34	13.92 \pm 0.57	39.53 \pm 1.42
DSS	7.72 \pm 0.66	12.10 \pm 0.66	33.89 \pm 2.94

PLAQUETAS				
	PLT	MPV	PCT	PDW
Control	182.83 \pm 36.68	7.85 \pm 0.33	0.14 \pm 0.02	42.18 \pm 1.59
DSS	223.43 \pm 39.12	7.51 \pm 0.23	0.17 \pm 0.03	39.83 \pm 1.97

Mediante PCR a tiempo real se determinó la expresión en colon de S100A8, IAP, Reg3 γ (en inglés, regenerating islet-derived protein III gamma, uno de los péptidos bacterianos más relevantes producido por las células de Paneth); TLR2, TLR4 (ambos proteínas transmembrana involucradas en el reconocimiento de patógenos y la activación de la inmunidad innata) y las interleukinas IL-22, IL-17 e IL-27 (citokina caracterizada por poseer un efecto estimulador sobre la proliferación celular, involucrada en la regulación de la homeostasis de los epitelios que revisten las mucosas) encontrándose incrementos significativos en todos los casos (*Figura 12a-h*).

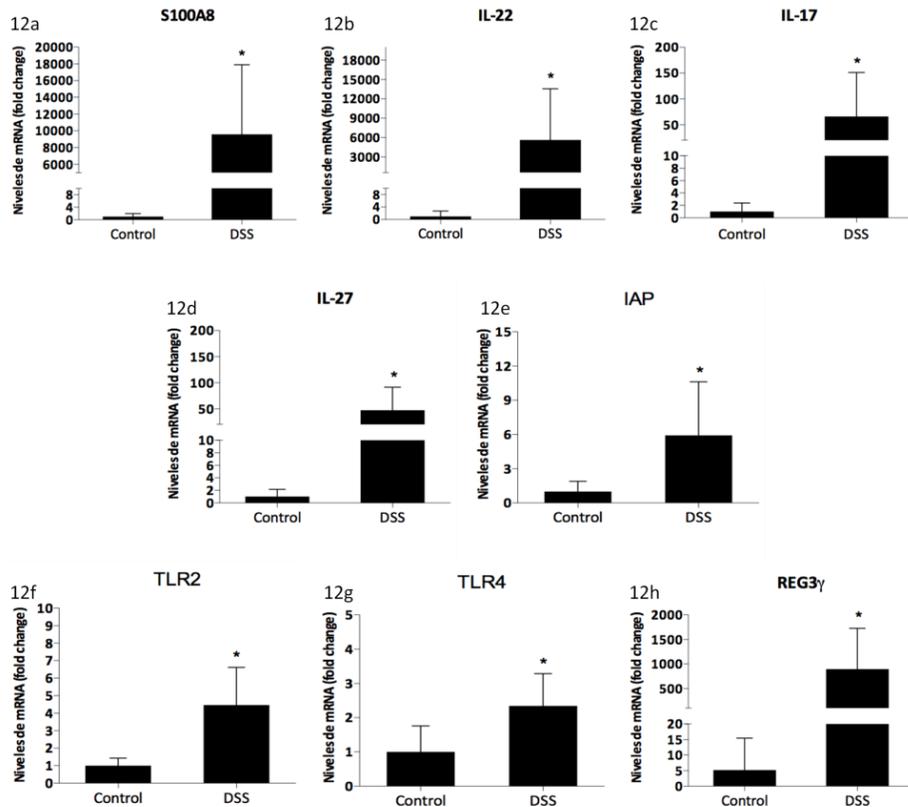
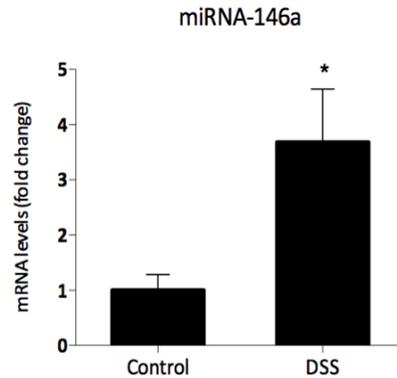


Figura 12a-h. Expresión génica medida por PCR a tiempo real de S100A8 (a), IL22 (b), IL-17 (c), IL-27 (d), IAP (d), TLR2 (f), TLR4 (g), y REG3γ (h) en tejido colónico de ratones que recibieron DSS (grupo DSS, n=8) al 2.5% (P/V) en el agua de bebida durante 7 días y de ratones control (grupo control, n=6) expresada como fold change basado en 2- $\Delta\Delta C_t$ usando como gen de referencia HPRT. Todos los datos se expresan como incremento frente al grupo control, y se expresan como media \pm SEM; * $p < 0.05$.

Una vez confirmada el carácter inflamatorio del modelo, se procedió a examinar la expresión de miR-146a, observándose un aumento significativo en el grupo colítico al igual que observamos en el modelo del TNBS (Figura 13).

Figura 13 Expresión génica medido por PCR a tiempo real de miR-146a en tejido colónico de ratones que recibieron DSS (grupo DSS, n=8) al 2.5% (P/V) en el agua de bebida durante 7 días y de ratones control (grupo control, n=6). La expresión génica de miR-146a fue expresado como fold change basado en $2^{-\Delta\Delta Ct}$ usando como gen de referencia U6. Todos los datos se expresan como incremento frente al grupo control, y se expresan como media \pm SEM; * $p < 0.05$.



Un tercer y último modelo de colitis ensayado, fue el modelo de colitis experimental por transferencia linfocitaria. Este modelo, considerado uno de los más cercanos a la enfermedad en humanos, difiere mecánicamente de los anteriores por su cronicidad y por tratarse de una colitis inducida por infiltración linfocitaria y por tanto, dependiente de linfocitos como la propia EII. Por ende, resultó interesante evaluar la expresión de miR-146a en un modelo de colitis experimental donde no existiese un daño epitelial directo.

La evolución del peso corporal desde la transferencia celular adoptiva hasta el comienzo del desarrollo de la colitis fue similar en ambos grupos (dato no mostrado). Una vez establecida la enfermedad (entre la 4-6 semana)(472), se observó una mayor afectación del grupo colítico, evidenciada por una pérdida de peso significativa, así como un incremento significativo de la relación peso-longitud y de la puntuación del daño colónico (*Tabla 9*).

Tabla 9. Parámetros macroscópicos en el modelo experimental de colitis por transferencia celular adoptiva. Variables macroscópicas en el tejido colónico de ratones transferidos con células T CD4+CD62L+ (grupo transferencia, n=7) y ratones control (grupo control, n=5). Los animales fueron sacrificados 12 días después de la instauración de la colitis. Los datos están expresados como media \pm SEM.

	Peso/Longitud (mg/cm)	Puntuación de daño colónico (UA)	Pérdida de peso (% de pérdida de peso original of original)
Control	21.598 \pm 1.358	0 \pm 0	5.292 \pm 0.632
Transferencia	48.413 \pm 5.52 *	2.367 \pm 0.41 *	-1.781 \pm 0.769 *

En cuanto al análisis macroscópico, se comprobó que en el colon de los ratones transferidos con células T CD4+CD62L+ presentaba hiperemia a nivel de la mucosa colónica, engrosamiento de la pared intestinal, rigidez, pero no necrosis (*datos no mostrados*), lo que se tradujo en los parámetros anteriormente comentados

El estudio histológico (tinción hematoxilina-eosina) muestra daño en el tejido colónico procedentes de animales del grupo colítico, observándose destrucción del epitelio con acortamiento de las criptas, pérdida de la arquitectura epitelial e infiltración a nivel de la mucosa (*Imagen 4*).

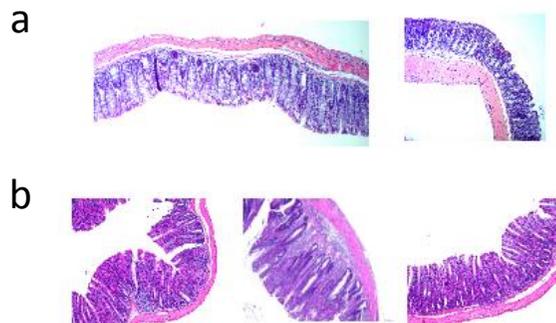


Imagen 4. Imágenes histológicas 10X de muestras colónicas procesadas y teñidas con Hematoxilina/Eosina en tejido colónico de ratones transferidos con células T CD4+CD62L+ (b, grupo transferencia, n=7) y ratones control (a, grupo control, n=5). Los animales fueron sacrificados 12 días después de la instauración de la colitis.

Al igual que en los anteriores modelos de colitis experimental, se observó un aumento del reclutamiento neutrofílico en la mucosa colónica del grupo colítico evidenciado por un incremento significativo de la actividad MPO (*Figura 14a*), y de la actividad AP colónica (*Figura 14b*), asociado a un marcado incremento en la sensibilidad al inhibidor específico levamisol *in vitro* (*Figura 14c*), igualmente significativo.

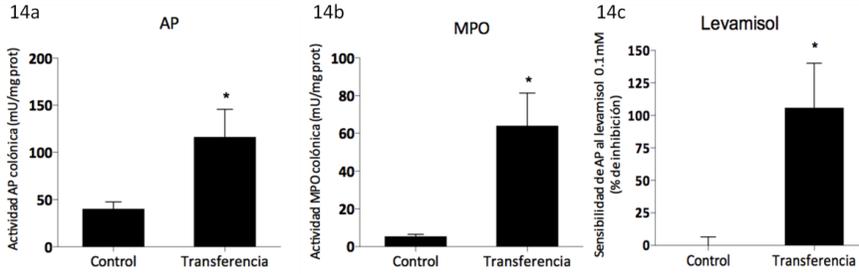
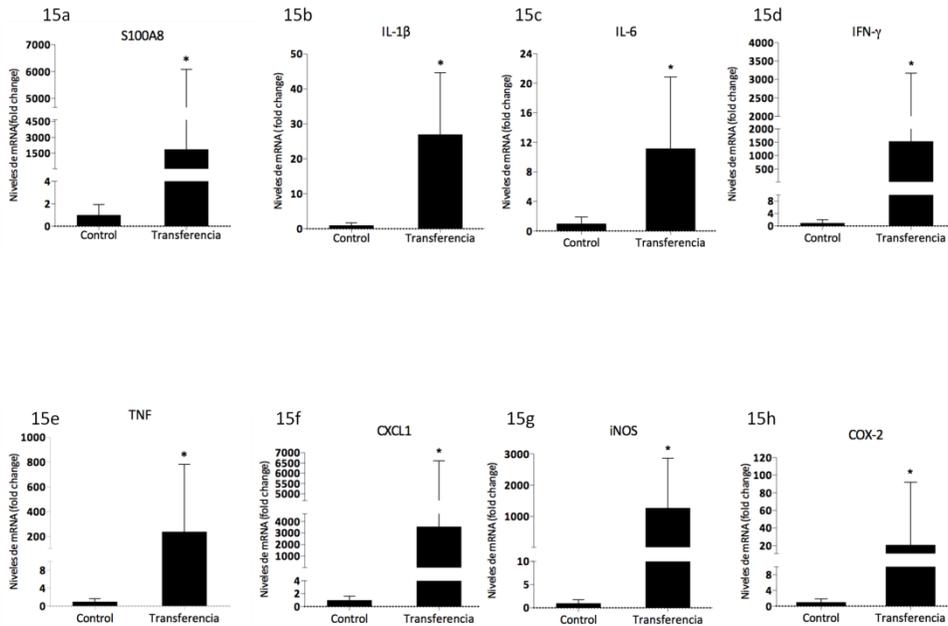


Figura 14a-c. Actividades enzimáticas en el tejido colónico (a) MPO (mU/mg prot), (b) AP (mU/mg prot) y (c) sensibilidad a levamisol 0.1 nM (%) de ratones control (grupo control, n=5) y ratones transferidos con células T CD4+CD62L+ (grupo transferencia, n=7). Los animales fueron sacrificados 12 días después de la instauración de la colitis. Los datos se representan como media ± SEM; *p<0.05.

Así mismo, se analizó la expresión colónica de marcadores proinflamatorios tales como: S100A8, IL-1 β , IL-6, IFN- γ , TNF- α , CXCL1, iNOS, COX-2, REG3 γ y MMP3, observándose un incremento significativo de todos ellos en los animales colíticos frente al grupo control (Figura 15a-j).



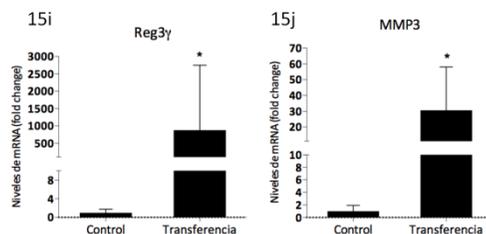


Figura 15a-j. Expresión génica medido por PCR a tiempo real de S100A8 (a), IL-18 (b), IL-6 (c), IFN- γ (d), TNF- α (d), CXCL1 (f), iNOS (g), COX-2 (h), REG3 γ (i) y MMP3 (j) en tejido colónico de ratones control (grupo control, n=5) y ratones transferidos con células T CD4+CD62L+ (grupo transferencia, n=7). Los animales fueron sacrificados 12 días después de la instauración de la colitis. La expresión génica en tejido colónico fue medida por PCR a tiempo real y expresado como fold change basado en $2^{-\Delta\Delta Ct}$ usando como gen de referencia 18s. Todos los datos se expresan como incremento frente al grupo control, y se expresan como media \pm SEM; * $p < 0.05$.

Además, analizamos las poblaciones hematológicas en sangre total en ambos grupos, en concreto, se determinó la población de glóbulos blancos y linfocitos totales, observándose una mayor población de ambos tipos celulares en el grupo colítico, sin apreciarse diferencias significativas en ningún caso (Tabla 10).

Tabla 10. Poblaciones celulares sanguíneas, WBC glóbulos blancos totales ($10^3/\mu\text{L}$) y linfocitos totales ($10^3/\mu\text{L}$) de ratones control (grupo control, n=5) y ratones transferidos con células T CD4+CD62L+ (grupo transferencia, n=7). Los animales fueron sacrificados 12 días después de la instauración de la colitis. Datos expresados como media \pm SEM; * $p < 0.05$ versus grupo control.

GLÓBULOS BLANCOS		
	WBC (totales)	Linfocitos (totales)
Control	3.80 \pm 0.40	3.38 \pm 0.31
Transferencia	4.47 \pm 0.54	3.87 \pm 0.84

Finalmente se determinó la expresión de miR-146a en ambos grupos (Figura 16).

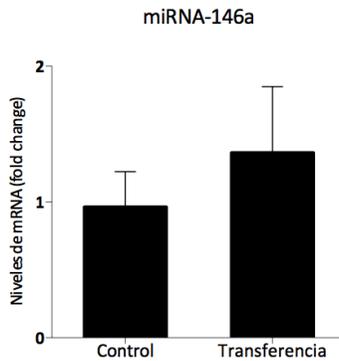


Figura 16. Expresión génica medido por PCR a tiempo real de miR-146a en tejido colónico de ratones control (grupo control, n=5) y ratones transferidos con células T CD4+CD62L+ (grupo transferencia, n=7). Los animales fueron sacrificados 12 días después de la instauración de la colitis. La expresión génica de miR-146a en tejido colónico fue expresada como fold change basado en $2^{-\Delta\Delta Ct}$ usando como gen de referencia U6. Todos los datos se expresan como incremento frente al grupo Control, y se expresan como media \pm SEM.

En resumen y tras analizar la expresión de miR-146a en los tres modelos experimentales de colitis podemos decir que, este RNA pequeño se encuentra incrementado en los modelos de colitis inducida por DSS y TNBS, pero no en el modelo de colitis mediante transferencia linfocitaria.

3. miRNAS E IECS

❖ Sobreexpresión de miR-146a en células epiteliales diferenciadas

Varios autores han descrito que la expresión de miR-146a se encuentra aumentada en células inmunes maduras (543).; las células epiteliales intestinales cumplen a cabalidad ambos criterios: son consideradas un componente esencial de la respuesta inmune innata intestinal ya que desempeñan un importante papel en la compleja relación existente entre la microbiota intestinal y el desarrollo de la tolerancia, siendo esta “sociedad” posible en gran medida debido a la expresión de receptores que reconocen antígenos bacterianos y como segundo criterio son células del epitelio intestinal que derivan de células madre intestinales situadas en la base de las criptas, las cuales mediante un proceso de diferenciación progresiva que se desarrolla en el

eje cripta-vellosidad se convertirán en una célula madura competente como células caliciformes, células de Paneth, y enterocitos o células absortivas; en este sentido y para dar continuidad con la hipótesis anteriormente descrita, se evaluó la expresión de miR-146a en células diferenciadas (vellosidades) y células indiferenciadas (criptas) de intestino delgado concretamente de yeyuno procedente de ratones WT.

Los resultados obtenidos son consistentes con lo demostrado en otros tipos celulares, existiendo un aumento de la expresión de miR-146a en vellosidades intestinales cuando se compara su expresión con criptas de yeyuno de ratón (*Figura 17a*).

El proceso de diferenciación epitelial puede ser caracterizado mediante la monitorización del cambio en la expresión y/o actividad de enzimas, por tanto, analizamos de forma paralela la expresión de miRNA-146a, la expresión de fosfatasa alcalina en criptas y vellosidades como marcador específico de células epiteliales enterocíticas maduras. Así pues en la *Figura 17b* se puede comprobar el incremento de fosfatasa alcalina intestinal en células diferenciadas del epitelio intestinal de yeyuno de ratón.

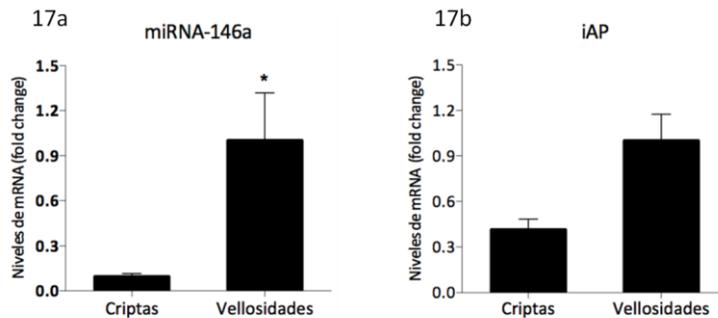


Figura 17. Expresión génica medida por PCR a tiempo real de miR-146a e IAP en criptas y vellosidades de yeyuno de ratón (n=2-9). La expresión génica de miR-146a e IAP en vellosidades y criptas fue expresada como fold change basado en $2^{-\Delta\Delta Ct}$ usando como gen de referencia U6 y 18s respectivamente. Todos los datos se expresan como incremento frente al grupo control, y se expresan como media \pm SEM; * $p < 0.05$.

- ❖ Citokinas proinflamatorias y componentes bacterianos como LPS y flagelina inducen la expresión de miR-146a en células del epitelio intestinal

Dado los resultados que anteceden, uno de nuestros siguientes objetivos fue determinar el papel de miRNA-146a en la respuesta inmunológica intestinal mediada por células epiteliales intestinales, usando enterocitos como parte fundamental de la respuesta inmunológica innata a nivel de barrera intestinal.

Los modelos empleados fueron dos líneas celulares de epitelio intestinal, la línea celular Caco-2 procedente de adenocarcinoma colónico humano y la línea celular IEC-18 procedentes de íleon fetal de rata, la cual es de tipo no tumoral.

Atendiendo a los resultados obtenidos previamente se corroboró la expresión de miR-146a en la línea celular Caco-2 bajo el estímulo proinflamatorio generado por IL-1 β y en células que no fueron sometidas a ningún tipo de estimulación, este último llamado grupo control; aunque la variabilidad impide alcanzar el umbral de la significancia se observó un aumento en la expresión de miR-146a bajo condiciones proinflamatorias (*Figura 18*).

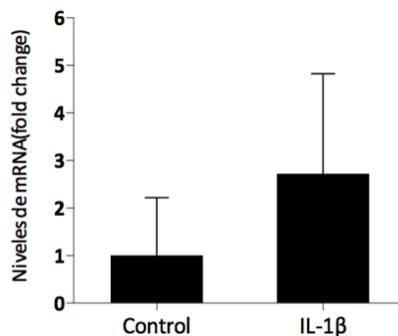


Figura 18 . Expresión génica medida por PCR a tiempo real de miR-146a en células Caco-2 (n=6). La expresión génica de miR-146a en células IEC-18 fue expresada como fold change basado en $2^{-\Delta\Delta Ct}$ usando como gen de referencia U6.

Paralelamente se determinó como control positivo del efecto de la estimulación de las células Caco-2, la secreción en el medio de cultivo de IL-8,

quimiokina de la familia CXC la cual desempeña un papel fundamental en la regulación de la respuesta inflamatoria aguda, mediante la atracción de neutrófilos y otras células inflamatorias y la secreción de MCP-1, quimiokina de la familia CC la cual ejerce un rol primordial en el reclutamiento de monocitos, células T de memoria, células dendríticas entre otras. Los resultados confirmaron el incremento significativo en la producción de IL-8 y MCP-1 en células Caco-2 estimuladas con IL-1 β durante 24 horas (Figura 19).

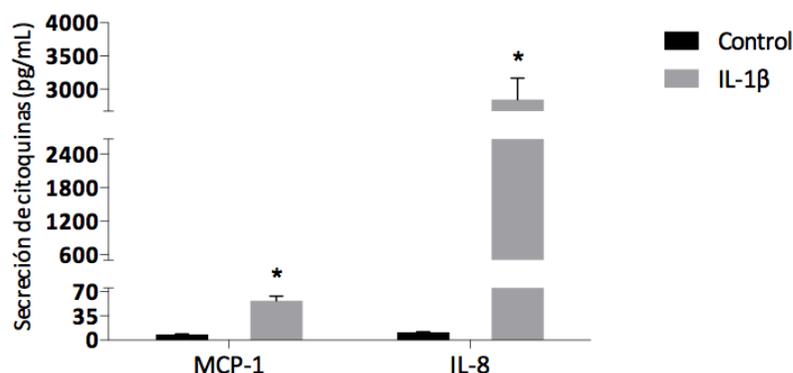


Figura 19. Secreción de MCP-1 e IL-8 tras 24 horas de tratamiento con IL-1 β por células Caco-2. La medida de MCP-1 e IL-8 fue realizada por ELISA. Todos los datos se expresan como incremento frente al grupo control (células no estimuladas con IL-1 β) media aritmética \pm SEM; * p <0.05 y son representativos de tres experimentos distintos. Grupo control (n=6) y grupo estimulado con IL-1 β (n=6).

Para dar continuidad al estudio utilizamos la línea celular IEC-18 en los siguientes experimentos ya que, como se mencionó anteriormente, se trata de una línea celular de íleon de rata de carácter no tumoral y por lo tanto debe tener una conducta más próxima al comportamiento normal de las células epiteliales intestinales, además estudios previos de nuestro grupo de investigación indicaron que en la línea celular Caco-2 existía una baja expresión del receptor transmembrana TLR4 (*datos no mostrados*).

Las IEC expresan diferentes tipos de receptores que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (342,554), los TLR son los mejor caracterizados, además miR-146a es uno de los microRNAs que ha sido fuertemente asociado a la relación entre respuesta inflamatoria y la microbiota, de hecho se ha descrito una alta inducción de la expresión de miR-146a a través de la estimulación de TLR4 en diferentes tipos celulares (11,12).

En este sentido, en vista de los resultados previamente obtenidos en la línea celular Caco-2, se estudió el efecto de diferentes antígenos bacterianos y citocinas en la expresión de miR-146a en la línea celular IEC18. los resultados obtenidos indican que la expresión de miRNA-146a se incrementa significativamente por diversos estímulos inmunológicos, como el lipopolisacárido bacteriano (LPS) ligando de TLR4, flagelina (FLA) ligando de TLR5 y por TNF. Por el contrario no se observó efecto significativo con CpG DNA ligando de TLR9, peptidoglicano (PDG) ligando de TLR2, Muramildipéptido ligando de NOD-2 e IL-1 β (Figura 20).

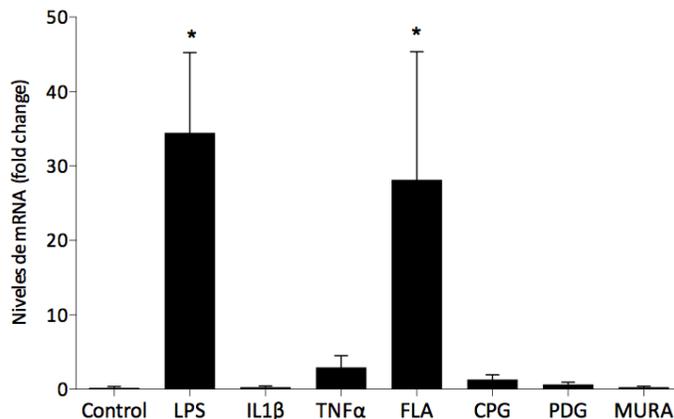


Figura 20. Expresión génica medida por PCR a tiempo real de miR-146a en células IEC-18 tras 24 horas de estimulación con LPS (1 μ g/mL), IL-1 β (10 ng/mL), TNF α (10 ng/mL), flagelina (FLA, 100 ng/mL), CpG DNA (50 nM), Peptidoglicano (PDG, 2 μ g/mL), muramildipéptido (MURA, 5 μ g/mL). La expresión génica de miR-146a en células IEC-18 fue expresada como fold change basado en $2^{-\Delta\Delta Ct}$ usando como gen de referencia U6. Todos los datos se expresan como incremento frente al grupo Control, y se expresan como media \pm SEM: * $p < 0.05$ ($n = 3-8$).

Como control del efecto de la estimulación determinamos la secreción de MCP-1. Los resultados demuestran un aumento significativo de la secreción de MCP-1 en células IEC18 estimuladas con LPS, FLA y TNF, no hubo incremento de esta quimiokina bajo el efecto de otros estímulos como CpG DNA,

peptidoglicano, muramildipéptido e IL-1 β (Figura 21), siguiendo el patrón anteriormente mostrado para la expresión de miR-146a.

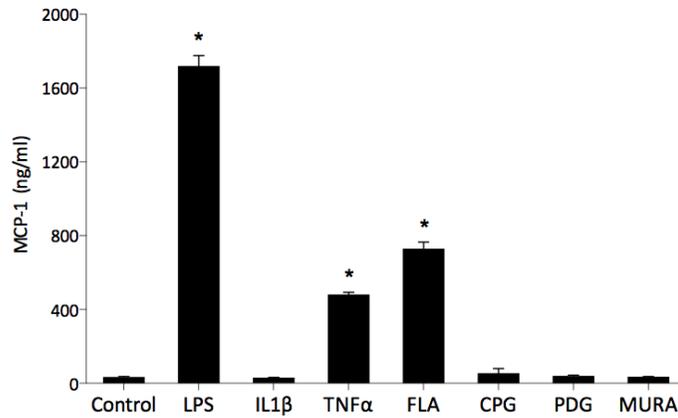


Figura 21. Secreción de MCP-1 tras 24 horas de estimulación con LPS (1 μ g/mL), IL-6 (10 ng/mL), TNF (10 ng/mL), flagelina (FLA, 100 ng/mL), CpG DNA (50 nM), Peptidoglicano (PDG, 2 μ g/mL), muramildipéptido (MURA, 5 μ g/mL) por células IEC-18. La medida de MCP-1 fue realizada por ELISA. Todos los datos se expresan como incremento frente al grupo control, y se expresan como media \pm SEM;

Paralelamente se evaluó la expresión de TLR 2, 4, 5, 9 y NOD-2 en células IEC-18. Los resultados obtenidos se correlacionan directamente con lo observado en cuanto a la expresión de miR-146a siendo los más expresados TLR4 y TLR5 (Figura 22).

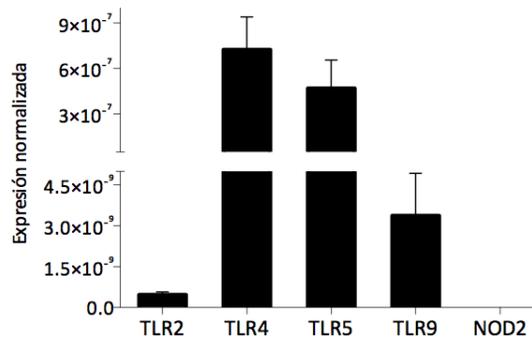
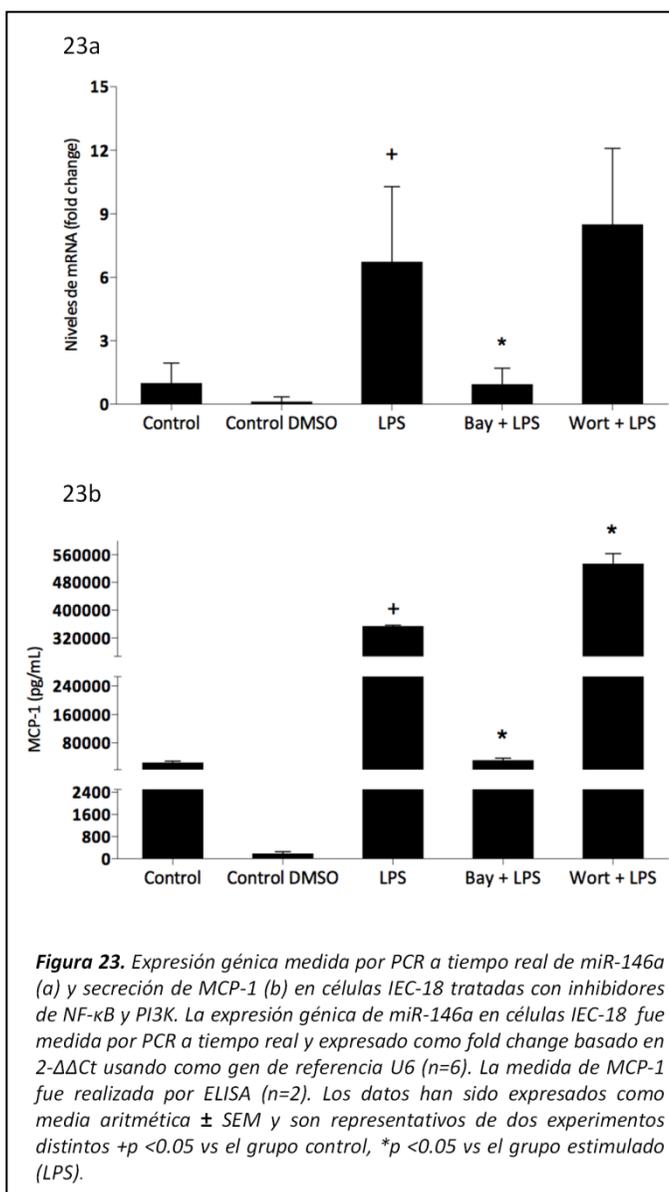


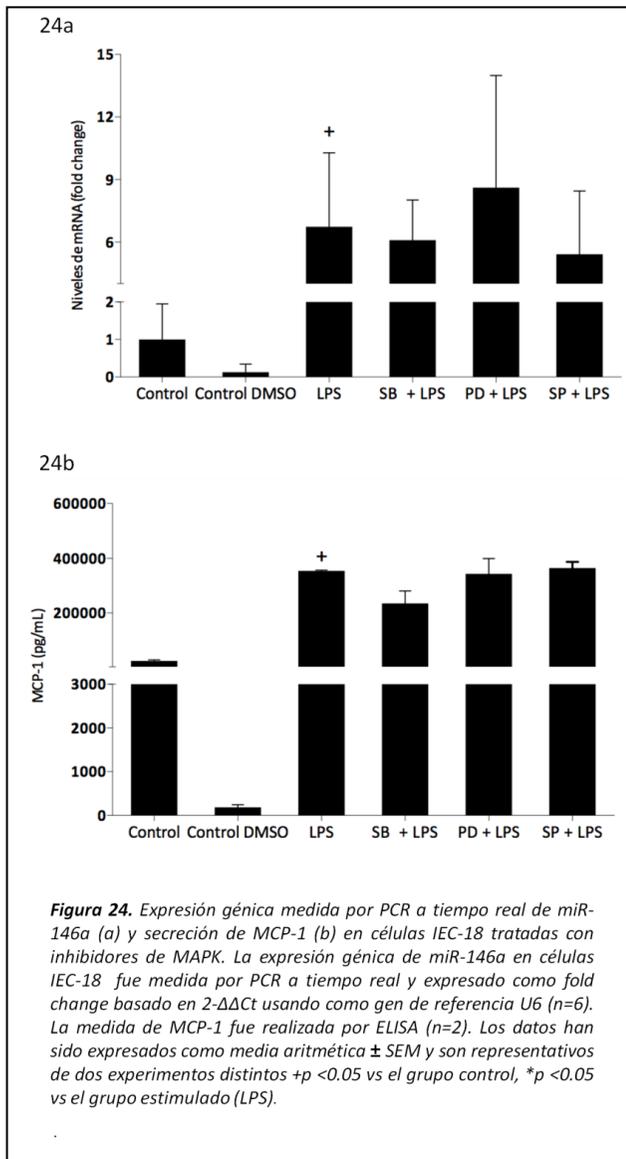
Figura 22. Expresión génica medida por PCR a tiempo real de TLR 2, 4, 5, 9 y NOD-2 en células IEC-18 (n=3). La expresión está normalizada con el gen de referencia 18s.

Dado que los resultados expuestos revelan que existe un evidente efecto en la expresión de miR-146a consecuencia de la estimulación de receptores asociados a patógenos por sus respectivos ligandos, como siguiente cometido se planteó el estudio del mecanismo de acción de dicho efecto escogiendo al ligando LPS como representante idóneo de los estímulos inicialmente empleados ya que, fue el estímulo que consiguió una mayor expresión del mRNA en cuestión y la expresión de TLR4 (receptor análogo por excelencia de LPS) se encuentra incrementada en la línea celular IEC18.



Para ello el estudio se enfocó en tres cascadas de señalización ampliamente vinculadas a la respuesta inmune e inflamatoria.

La primera vía inmunológica estudiada fue la vía de NF-κB, el cual es activado en respuesta a varios estímulos externos como interleucinas, factores de crecimiento, infecciones virales y bacterianas, factores físicos (luz UV, por ej.) y para referirnos a efectos de este ensayo, LPS. Para conocer la implicación de esta vía se utilizó Bay11-7082, un inhibidor farmacológico de la fosforilación de



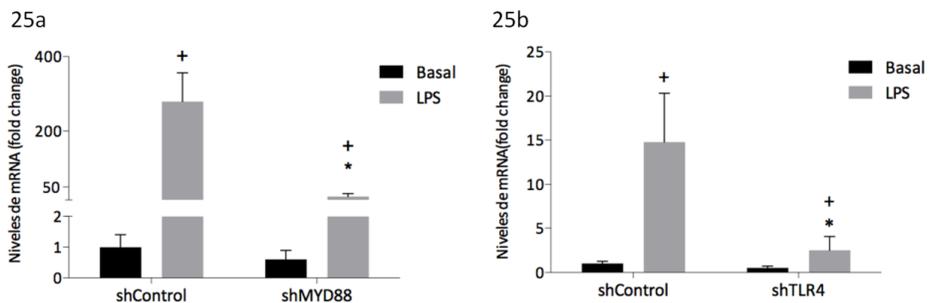
I κ B, proceso indispensable para la translocación del factor de transcripción al núcleo mediante la vía clásica. La presencia del inhibidor dio lugar a un descenso significativo de la expresión de miR-146a así como de la producción de MCP-1 (Figura 23a y b). Simultáneamente se estudió la implicación de otra de las cascadas de señalización implicada en la respuesta inmune e inflamatoria como lo es la vía de señalización de Akt. En este caso, para estudiar la participación de esta vía se empleó wortmanina, un inhibidor de la fosforilación de fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K, enzima responsable de la activación de Akt); la presencia de wortmanina no dio lugar a cambios ni en la expresión de miR-146a, ni en la producción de MCP-1 (Figura 23a y b).

Para finalizar se estudió la implicación de la regulación de la cascada de señalización por las principales MAPK mediante el uso de inhibidores para p38, ERK1/2 y JNK. Las MAPK son proteínas quinasas serina/treonina específicas que responden a estímulos extracelulares y regulan varias actividades celulares, como la expresión de genes, la proliferación, la diferenciación, la supervivencia celular y la apoptosis. La expresión de miR-146a fue ligeramente disminuida en presencia de los inhibidores de las vías p38 y JNK aunque dicha disminución no llega a ser significativa en ninguno de los casos (Figura 24a). En cuanto a la

secreción de MCP-1, tan sólo es disminuida ligeramente por la inhibición de p38 sin que exista diferencia significativa (*Figura 24b*).

- ❖ La señalización a través del receptor TLR4 y la molécula adaptadora MyD88 induce la expresión de miR-146a en células del epitelio intestinal

Con el fin de caracterizar mejor la vía de transducción de señal implicada en la inducción de miR-146a por LPS, estudiamos la hipótesis de que el LPS actúa mediante la vía de TLR4 dependiente de MyD88; para ello utilizamos líneas estables de células IEC-18 en las que la expresión de TLR4, así como de su molécula transductora de señal Myd88, fue silenciada mediante el uso de shRNA introducido a través de partículas lentivirales. MyD88 actúa como proteína adaptadora común a todos los TLR, exceptuando TLR3, para activar al factor de transcripción NF- κ B con la consecuente inducción de citocinas proinflamatorias. Al objeto de verificar este extremo, se estudió la expresión de miR-146a en la línea celular IEC-18, silenciada para TLR4 y MyD88. Los resultados muestran que el silenciamiento de la expresión de MyD88 en células IEC18 produce una inhibición en la expresión de miRNA146a asociada a una disminución en la secreción de MCP-1 inducida por LPS (*Figura 25 a y c*). Igualmente, el silenciamiento de la expresión de TLR4, da lugar a una menor producción de MCP-1 en respuesta a LPS, y a una inhibición de la expresión de miR-146a (*Figura 25 d y b*).



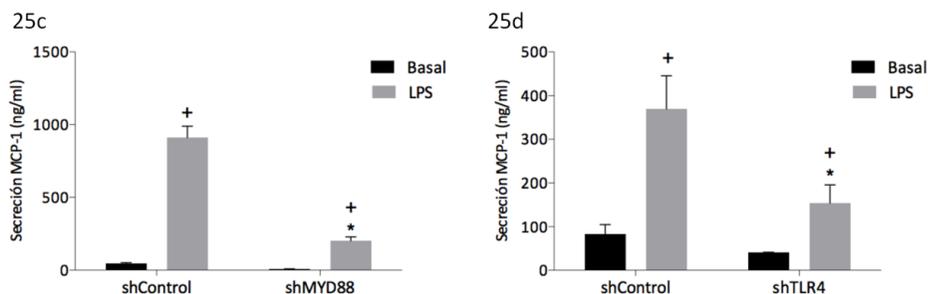


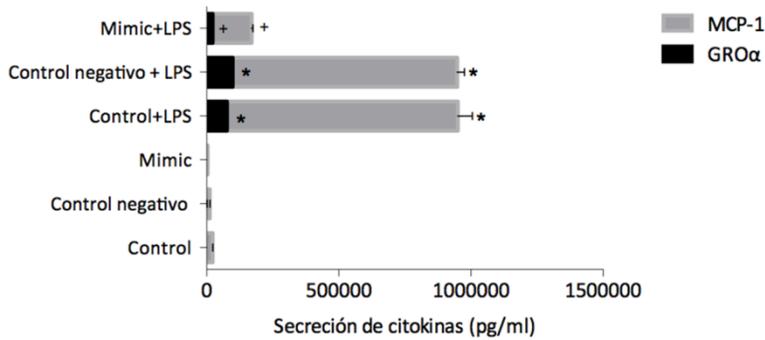
Figura 25. Vías de traducción de señal involucradas en el efecto de LPS en la línea celular IEC-18. Efecto del silenciamiento celular de MyD88 y TLR4 en la expresión de miR-146a (a y b, n= 3) y secreción de MCP-1 (c y d, n=4). La expresión génica de miR-146a en células IEC-18 fue medida por PCR a tiempo real y expresado como fold change basado en $2^{-\Delta\Delta Ct}$ usando como gen de referencia U6. La medida de MCP-1 fue realizada por ELISA. Los datos han sido expresados como media aritmética \pm error estándar de la media (SEM) y son representativos de tres experimentos distintos +p <0.05 vs sh control, *p <0.05 vs sh Control + LPS.

En síntesis podría afirmarse que el aumento de la expresión de miR-146a tras la adición de LPS al medio de cultivo es inhibido significativamente cuando TLR4 y MyD88 se encuentran silenciados en células IEC-18.

- ❖ La sobreexpresión de miR-146a inhibe la producción de citoquinas en respuesta a LPS e IL-1 β en células del epitelio intestinal

Existen estudios que describen que miR-146a ejerce un papel fundamental limitando la severidad de la respuesta inmune a través de la prevención de la sobreestimulación de la misma. Con objeto de probar la validez de esta hipótesis en células del epitelio intestinal, se sobreexpresó miR-146a en los dos modelos celulares que han sido usados durante el desarrollo de este trabajo de investigación; para conseguir dicho cometido se realizó la transfección en células Caco-2 e IEC18 de un “miRNA Mimic” (pequeño RNA modificado químicamente que imita artificialmente la actividad endógena de miRNA-146a maduro) y se estudió el efecto de la misma en la producción de citoquinas.

26a



26b

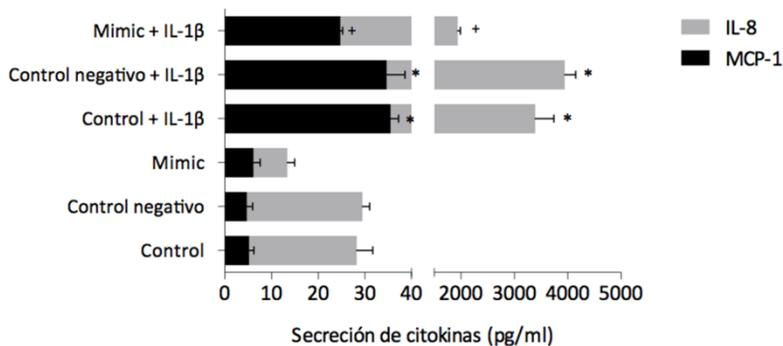


Figura 26. Efecto de la sobreexpresión de miR-146a en la secreción de citocinas sobre células IEC-18 (a) y células Caco-2 (b). El efecto del miR-146a mimic fue estudiado midiendo en el medio de cultivo la secreción de las diferentes citocinas (MCP-1 y GROα en el caso de células IEC-18 y MCP-1 e IL-8 en el caso de células Caco-2) tras 24 horas de estimulación con LPS (IEC-18) e IL-1β (Caco-2) y posterior a la transfección (n=3). Los datos han sido expresados como media aritmética ± SEM y son representativos de dos experimentos distintos. *p < 0.05

La sobreexpresión de miR-146a en células IEC-18, inhibe la secreción en el medio de cultivo de MCP-1 y GROα a las 24 horas tanto en condiciones basales como estimuladas con LPS (Figura 26a). Análogamente la sobreexpresión en células Caco-2 estimuladas o no con IL-1β durante 24h, inhibe la secreción en el medio de cultivo de MCP-1 e IL-8 (Figura 26b).

- ❖ Mediadores inflamatorios como IL-1 β , IFN γ y TNF inducen la expresión de miR-146a en organoides intestinales procedentes de criptas de yeyuno de ratón

Para finalizar realizamos el estudio de la expresión de miR-146a en el modelo de organoides intestinales el cual es considerado en la actualidad como el mejor modelo disponible para el estudio de células epiteliales *in vitro*, teniendo en cuenta las limitaciones inherentes al uso de líneas celulares.

Los recientes avances en la identificación de células madre Igr5+ en la parte inferior de las criptas intestinales de ratón permiten esta técnica de cultivo en la cual dichas células madre intestinales se expanden en forma de estructuras tridimensionales denominadas “organoides” que a su vez van a contener consistentes estructuras de criptas y un lumen interno revestido por células diferenciadas, es decir la estructura básica del epitelio intestinal *in vivo*, en síntesis, se forman estructuras similares a las de pequeños epitelios intestinales.

Con el objetivo de estudiar el efecto de citocinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF e IFN γ) en cultivos de organoides obtenidos de yeyuno de ratón se determinó la expresión de distintas dianas moleculares tras una semana de crecimiento y 24 horas de incubación con las diferentes citocinas.

En primer lugar se estudio el efecto de la administración de IL-1 β , TNF e IFN γ sobre la secreción de GRO α /CXCL1 en el modelo de organoides intestinales. La adición de citocinas TNF e IFN γ al medio de cultivo de los organoides intestinales indujo un incremento significativo en la secreción de GRO α /CXCL1. Sin embargo la adición de IL-1 β no incrementa la secreción de la quimiokina en cuestión (*Figura 27*).

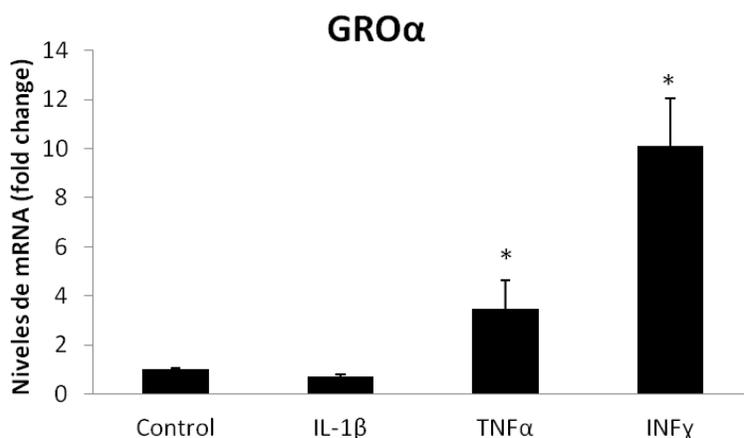


Figura 27. Expresión génica medida por PCR a tiempo real de GROα/CXCL1 en organoides procedentes de yeyuno de ratón WT. La expresión génica en organoides procedentes de yeyuno de ratón es expresada como fold change basado en $2^{-\Delta\Delta Ct}$ usando como gen de referencia 18s. Los datos han sido expresados como media aritmética \pm error estándar de la media (SEM) * $p < 0.05$ vs Grupo control.

La inflamación intestinal está asociada a cambios profundos de tipo fisiopatológico, entre los cuales se encuentran alteraciones tanto en el transporte iónico epitelial como en la función de la barrera del epitelio intestinal. Ambos factores contribuyen decisivamente a la disrupción de la barrera epitelial, hecho que favorece el establecimiento de la reacción inflamatoria (555–557). Defectos de barrera que impliquen mediadores inflamatorios como los empleados previamente pueden ser reproducidos en líneas celulares intestinales (368,369,371). En este sentido, con la finalidad de corroborar la instauración de la respuesta inflamatoria en el modelo de organoides intestinales procedentes de yeyuno de ratón, se evaluó la expresión de moléculas ubicadas a nivel epitelial (transportadores de membrana) como cftr (Abcc7), Nkcc1 (Slc12a2), Nhe3 (Slc9a3) y Dra (Slc26a3) las cuales debido a su localización y función están presumiblemente afectadas en consecuencia de la respuesta inmune desarrollada en la inflamación. Los resultados obtenidos muestran una disminución de la expresión de los transportadores en la mayoría de los ensayos realizados. Así pues, la expresión de Dra disminuye de forma significativa cuando se administra al medio de cultivo cualquiera de las tres

citokinas ensayadas (Figura 28a), IFN γ redujo significativamente la expresión de cftr (Figura 28b) y Nkcc1 (Figura 28c), mientras que IL-1 β redujo de forma significativa la expresión de Nhe3 (Figura 28d).

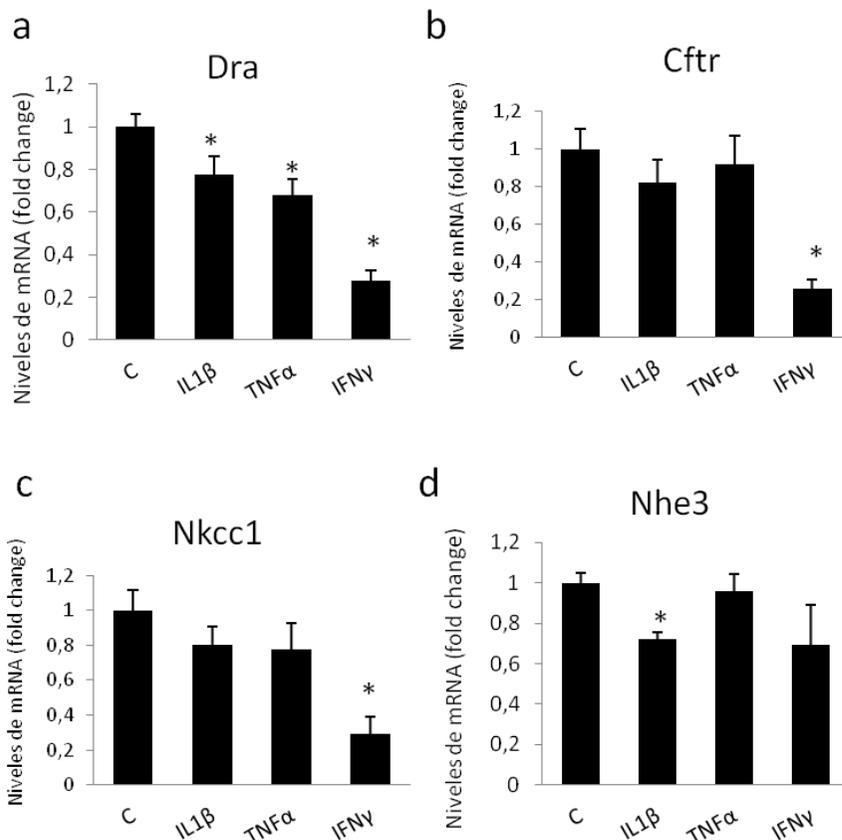


Figura 28. Expresión génica medida por PCR a tiempo real de Dra (a), Cftr (b), Nkcc1 (c) y Nhe3 (d) en organoides procedentes de yeyuno de ratón WT. La expresión génica en organoides procedentes de yeyuno de ratón es expresada como fold change basado en $2^{-\Delta\Delta Ct}$ usando como gen de referencia β -actina. Los datos han sido expresados como media aritmética \pm error estándar de la media (SEM) * $p < 0.05$ vs grupo control, (n=8-10).

Por último, procedimos a estudiar la expresión de miR-146a en las diferentes condiciones generadas anteriormente.

Los resultados obtenidos revelaron el aumento de la expresión de miR-146a cuando administramos al medio de cultivo cualquiera de los tres estímulos

examinados. Sin embargo la variabilidad impide alcanzar el umbral de la significancia en todos los casos (Figura 29).

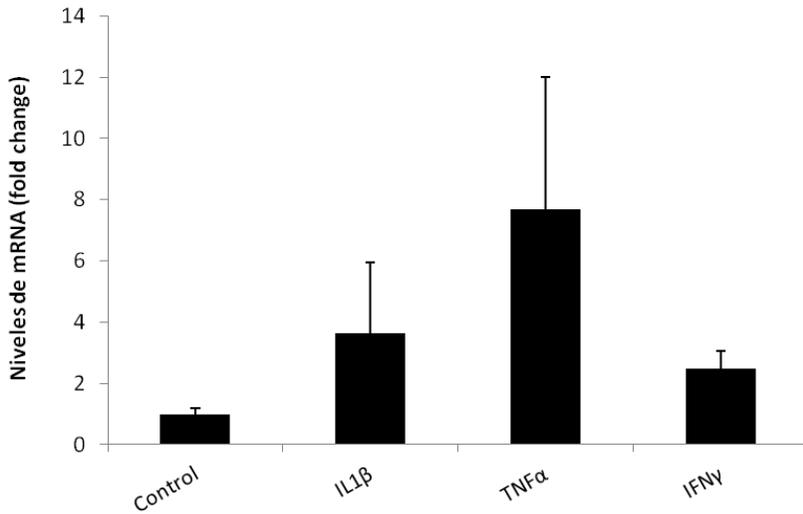


Figura 29. Expresión génica medido por PCR a tiempo real de miR-146a en organoides procedentes de yeyuno de ratón WT. La expresión génica en organoides procedentes de yeyuno de ratón es expresada como fold change basado en $2^{-\Delta\Delta Ct}$ usando como gen de referencia U6. Los datos han sido expresados como media aritmética \pm error estándar de la media (SEM) * $p < 0.05$ vs Grupo control, (n=3).

Discusión

El epitelio intestinal, en el que las IECs son el principal tipo celular, constituye una barrera selectiva que media la absorción de nutrientes y la relación con las bacterias y con el contenido general del lumen intestinal. Las IECs son células que se regeneran constantemente y el epitelio intestinal es por tanto un tejido con una tasa de proliferación muy alta. Las IECs se generan a partir de células pluripotenciales de las criptas y se diferencian en los distintos tipos celulares a medida que ascienden por la microvellosidad. Las células ya diferenciadas de las puntas de las microvellosidades sufren procesos de descamación y muerte por apoptosis. Estos procesos son muy importantes en el mantenimiento de la homeostasia intestinal y estímulos como la inflamación, distintos fármacos o el estrés físico, que inducen alteraciones en la función de barrera intestinal, pueden incrementar la muerte celular e inducir por tanto la aparición de lesiones en el epitelio intestinal (558). En la reparación de estas lesiones es muy importante la proliferación de las IECs que, además, deben diferenciarse para poder ejercer sus funciones. Por otra parte, las características esenciales del cáncer incluyen inhibición o defectos en la diferenciación celular e incremento en la proliferación. La búsqueda de agentes que regulen la diferenciación y la proliferación, y por tanto tengan influencia en la reparación de lesiones o protejan frente al inicio y la progresión del cáncer, es un campo muy activo de investigación. Se ha observado que los miRNAs regulan procesos de proliferación y de hecho existen miRNAs supresores de tumores y miRNAs con funciones oncogénicas, por lo que pueden constituir dianas terapéuticas muy importantes. No obstante, el efecto de la diferenciación de IECs sobre la expresión de miRNAs ha sido muy poco caracterizado. Por tanto, nuestro primer objetivo en esta Tesis Doctoral fue estudiar el efecto de la diferenciación y la proliferación sobre la expresión de miRNAs en IECs. Escogimos realizar nuestro estudio en células Caco-2, por su capacidad de diferenciación *in vitro* y utilizamos un array comercial de miRNAs relacionados con la proliferación y la diferenciación.

Distintas bases de datos, como miRBase (<http://www.mirbase.org>), agrupan los miRNAs por familias de genes relacionados. Se ha descrito ampliamente que los miRNAs de las familias let7, miR1, miR10 y miR15 poseen efectos citostáticos, actuando como supresores de tumores. Así, la inhibición de la expresión de genes de la familia let7 induce el desarrollo de adenocarcinomas en el intestino y de otros tipos de cáncer (559,560). De hecho, let7 inhibe la proliferación y la génesis de tumores mediante la represión de distintos oncogenes como RAS, MYC o HMGA2 (561,562). También se ha descrito que la

familia miR15 ejerce efectos antiproliferativos y, en concordancia, se ha observado que es frecuente la delección de su locus (13q14) en leucemia linfocítica y en cáncer de colon (563–565). En el caso de la familia miR10, la expresión de miR-10 y miR-100 se encuentra inhibida en distintos tipos de cáncer; no obstante, existen ciertas discrepancias, ya que se ha descrito ocasionalmente que sus niveles también pueden incrementarse en esta enfermedad (566). Nuestros datos indican que los genes de estas familias se encuentran inducidos en células Caco-2 diferenciadas respecto a células no diferenciadas. Otros miRNAs supresores de tumores cuya expresión se encontró muy incrementada en células diferenciadas fueron miR-26a, miR122, miR127-5p, miR181a, miR192, miR215, miR370 y miR378 (567–575). Como hemos indicado, y a pesar de su origen oncológico, las células Caco-2 se diferencian y polarizan en cultivo, de modo que su fenotipo es morfológica y funcionalmente similar al de enterocitos del intestino delgado, adquiriendo microvellosidades y desarrollando uniones estrechas (*tight junctions*), y expresando enzimas y transportadores característicos de este tipo celular (576). Es bien sabido que la proliferación de células Caco-2 se inhibe una vez llegan a confluencia, iniciándose su diferenciación. En nuestro experimento, determinamos las actividades fosfatasa alcalina y sacarasa/isomaltasa, que son enzimas del borde en cepillo del enterocito cuya expresión se incrementa con la diferenciación, y encontramos que aumentaban de manera directamente proporcional al tiempo en cultivo. Además, nuestros datos coinciden con los publicados en otros tipos celulares, indicando que la expresión de los miRNAs mencionados es proporcional al grado de diferenciación de las células (mayor a los 17 días de cultivo que a los 7 o los 2 días) e inversamente proporcional a su estado proliferativo (577).

La familia miR17 incluye los siguientes miembros: miR17, miR18a, miR18b, miR20a, miR20b, miR93 y miR106. A su vez, en el entorno del gen que codifica miR17 (a menos de 10 Kb), se encuentran los genes de una serie de miRNAs (miR17, miR18a, miR20a, miR19-b, miR92-a). A esta agrupación (*cluster*) de genes con funciones comunes se le denomina miR17-92. Aunque la mayoría de los miRNAs actúan como supresores de tumores, inhibiendo la proliferación, miembros de la familia miR17 y del cluster miR17-92 se encuentran incrementados en cáncer, sugiriendo que pueden tener funciones oncogénicas (578,579). En concordancia con estas observaciones, en nuestro caso la expresión de estos miRNAs no se vio alterada tras la diferenciación o incluso se vio disminuida (miR18a, miR20a y b, miR17 y miR93 presentaron valores de

FC \leq 0.6). Los únicos miRNAs de este grupo cuya expresión se vio inducida por la diferenciación fueron miR18b (FC= 15,89) y miR-92a (FC=7,16). miR18b ha sido caracterizado como un gen supresor de tumores, y por tanto es lógico que su expresión se encuentre incrementada en células diferenciadas (580). Al igual que miR92a, miR21 (FC=2,42) o miR155 (FC=13,92) han sido caracterizados como genes oncogénicos, pero en este caso sus niveles se mostraron incrementados en células Caco-2 diferenciadas. Esta asociación entre aumento de expresión y diferenciación celular (células no proliferativas) podría achacarse al origen cancerígeno de las Caco-2 o al fenotipo específico de estas células (epitelio intestinal) (581).

De todos los miRNAs estudiados, sólo los niveles de miR302a se hallaron disminuidos en células diferenciadas (17 días frente a 2 días en cultivo) teniendo en cuenta el criterio FC $<$ 0.5. Es interesante destacar que la inducción de la expresión de este gen se ha relacionado con el fenómeno de reprogramación celular. Este proceso consiste en la programación de células somáticas diferenciadas para que vuelvan a su estado embrionario (582). Por tanto la inhibición de miR302a se corresponde con la diferenciación.

El efecto de la inflamación o de citocinas proinflamatorias sobre la expresión de miRNA en enterocitos ha sido muy poco estudiado. Además, estudios recientes indican que los miRNAs pueden constituir un nexo entre inflamación y cáncer (583), por lo que nos pareció interesante estudiar el efecto de estas citocinas sobre la expresión de miRNAs relacionados con la proliferación y la diferenciación. En nuestro estudio constatamos que la adición de IL-1 β y TNF al medio de cultivo de células Caco-2 tuvo un profundo efecto en la expresión de los miRNAs analizados, siendo este efecto específico para cada citokina y muy distinto del efecto de la diferenciación. Concretamente, pudimos observar que mientras que la diferenciación produjo principalmente la sobreexpresión de los miRNAs medidos (74 miRNAs se sobreexpresaron (FC $>$ 2) y sólo 1 se inhibió (FC $<$ 0.5), la adición de cualquiera de las dos citocinas al medio produjo la inhibición de un gran número de genes (32 en el caso del cultivo con IL-1 β y 35 en el caso del cultivo con TNF). Por otra parte, los miRNAs modificados en el mismo sentido (sobreexpresión o represión) tanto por IL-1 β como por TNF fueron mayoría, lo que sugiere que se trata de miRNAs importantes en el proceso inflamatorio.

La inflamación es un factor ambiental importante que promueve la génesis de tumores y la progresión de lesiones cancerígenas. Estudios recientes han empezado a relacionar cáncer e inflamación y han puesto de manifiesto que la familia de miRNAs let7 puede jugar un papel importante. Los let7 actúan como citostáticos (584). Además, diversos estudios han indicado que la estimulación de NF- κ B, el principal factor de transcripción implicado en la respuesta inflamatoria, inhibe la expresión de los genes de la familia let7 (584,585). Se ha descrito que el siguiente mecanismo puede ser responsable de la inducción de tumores mediada por la inflamación: la inhibición de la expresión de let7 por NF- κ B permite la expresión de citocinas proinflamatorias como la IL-6 (que es una de sus dianas). Como consecuencia de la expresión de IL-6 se induce el activador de la transcripción 3 (Stat3), que es un factor de transcripción que favorece la proliferación, la angiogénesis y la supervivencia (586). Por tanto, se cree que la abundancia de citocinas que activan Stat3 en el microambiente de los tumores induce una red de señales que promueve el crecimiento del epitelio neoplásico y la inflamación y, simultáneamente, suprime la respuesta antitumoral del huésped. En concordancia, en diversos tumores de origen epitelial se observa estimulación persistente de Stat3, lo que además se asocia frecuentemente con un mal pronóstico. Nuestros datos concuerdan con esta teoría, ya que, como hemos indicado, en nuestro estudio la mayoría de los miRNAs de la familia let7 se hallaron inducidos en células diferenciadas (no proliferativas) e inhibidos en células estimuladas, tanto con IL-1 β como con TNF.

Otros miRNAs que siguieron un perfil similar al de los let7, con expresión incrementada en la diferenciación e inhibida por citocinas, fueron miR214, miR150, miR18b, miR142-5p, miR520g y miR127-5p.

Se ha propuesto que, al igual que let7, miR21 y miR155 pueden ser un nexo entre la inflamación y la generación de tumores (587). De hecho, se ha llegado a proponer su uso, junto con el de miR146a, como marcadores de tumores colorrectales (588), y son probablemente, junto con miR146a, los miRNAs más estudiados en la inflamación (589). Tanto miR155 como miR21 se activan transcripcionalmente como resultado de la activación por NF- κ B y AP-1. Ambos miRNAs ejercen funciones complejas. De hecho, el papel funcional de miR21 depende de distintos factores como el tipo de célula o las señales inductoras. Así, miR21 limita el papel de las células hematopoyéticas en la inflamación, mientras que potencia el de las células no hematopoyéticas, inhibiendo además la apoptosis y promoviendo la transformación de distintos tipos de células en

células cancerígenas (590). Por otra parte, distintos estudios indican que miR155 puede actuar como un promotor o silenciador de tumores dependiendo del tipo celular y de si la célula es cancerosa o no (591). En nuestro estudio tanto la expresión de miR155 como de miR21 se incrementó en la diferenciación y no se alteró por ninguna de las citocinas estudiadas, con la excepción de TNF, que indujo la producción de miR155 (FC=2). Nuestros datos en el caso del miR155 coinciden con los obtenidos por otros autores en miofibroblastos intestinales de pacientes con EII que fueron estimulados con IL-1 β o TNF. Estos autores observaron que el TNF, pero no la IL-1 β , incrementaba los niveles de miR155 (592). Como hemos indicado arriba, los datos que hemos obtenido con estos genes son complejos de interpretar, pero podrían ser específicos de este tipo celular o podrían ser resultados del origen oncológico de esta línea celular concreta. Estudios con otros modelos, incluyendo organoides y estudios *in vitro*, serían necesarios para confirmar cualquiera de estas hipótesis.

Por último, es interesante observar que entre los genes cuya expresión se encontró más incrementada por la adición de IL-1 β al medio de cultivo se encontraron varios de la familia miR17 y del cluster miR17-92 (miR17, miR18a, miR20a, miR20b, miR93, miR106, miR192). Por su parte, la adición de TNF también indujo la expresión de miR18a, miR20b y miR192. Una búsqueda en PubMed con el criterio (miR17 OR miR17-92 cluster) AND (inflammation OR immunity) indicó que sólo había dos artículos coincidentes, y ambos estaban relacionados con la proliferación. Creemos que el estudio del papel de estos miRNAs en la inflamación y su vinculación con la proliferación podría ser de gran interés en futuros estudios. En definitiva, nuestro estudio abre múltiples posibilidades de investigación en el papel de los miRNAs en la inflamación intestinal en IECs y de su relación con la proliferación y diferenciación celular y por ende con el cáncer.

Los datos de los arrays con miRNAs nos indicaron que miR-146a se sobreexpresaba en células Caaco-2 diferenciadas y era el gen más inducido cuando las células se trataron con IL-1 β . Decidimos continuar nuestro estudio con este miRNA cuyas funciones en otros tipos celulares estaban siendo descritas. miR-146a es producido en respuesta a LPS bacteriano y a citocinas con el fin de regular la respuesta inmune (593)(594)(14). De hecho, existen estudios que demuestran que el miR-146 se expresa en células hematopoyéticas y ejerce efectos antiinflamatorios en órganos linfoides, tales como la médula ósea, el bazo y los ganglios linfáticos (595–598). Sin embargo, su papel en el intestino

inflamado sigue siendo controvertido y su contribución a la regulación del sistema inmune innato por parte de las IECs ha sido poco estudiada. A pesar de que el miR-146a es conocido por su papel antiinflamatorio, incluso a nivel intestinal (protegiendo frente a la inflamación intestinal provocado por el daño isquemia-reperfusión en el intestino (16)), estudios recientes han demostrado que también aumenta la susceptibilidad a colitis inducida por DSS en ratón (551). La explicación a esta paradoja se ha basado en la capacidad que posee miR-146a para reprimir genes tanto proinflamatorios (protegiendo frente a la inflamación), como de genes que fortalecen la barrera intestinal, favoreciendo un mayor contacto entre las células inmunes y los antígenos bacterianos intestinales aumentando así potencialmente la susceptibilidad a la colitis (551). Con el fin de estudiar más a fondo el efecto de miR-146a en la inflamación intestinal utilizamos tres modelos experimentales distintos de colitis en animales con efectos diferenciales sobre la barrera intestinal. Los modelos TNBS y DSS inducen químicamente la colitis y, aunque el mecanismo exacto por el cual actúan todavía no ha sido completamente descrito, en ambos casos se requiere de una alteración severa de la integridad de la barrera mucosa intestinal, permitiendo así el acceso de antígenos lumenales y células proinflamatorias a la lámina propia (599). Estos dos modelos difieren también en otros aspectos. En el modelo de colitis inducida por TNBS, este actúa como hapteno combinado con las proteínas de la mucosa para desencadenar una respuesta de hipersensibilidad retardada. Este mecanismo es útil para modular la respuesta inmune. Por ejemplo, permite la inducción de tolerancia mediante la administración de TNBS unido a proteínas alimentarias (600) o la reactivación de la colitis por administración parenteral de TNBS (601). Además, con el fin de tener acceso a la mucosa, el TNBS se administra en una solución alcohólica, que produce una lesión epitelial. Aunque el etanol provoca una reacción inflamatoria per se, esta es de corta duración en ausencia de TNBS. De hecho, la semi-cronicidad de la colitis en este modelo se explica por causa del TNBS en lugar de por el etanol. En la colitis por DSS el mecanismo principal es la toxicidad epitelial, que es reproducible *in vitro* y se desarrolla lentamente durante varios días. El resultado es el incremento de la accesibilidad de antígenos lumenales y microorganismos a la mucosa intestinal, que conlleva en última instancia a la instauración de la colitis (602).

El tercer modelo utilizado consiste en la transferencia de linfocitos T vírgenes a ratones inmunodeficientes, que así se repueblan progresivamente por los linfocitos transferidos y, como consecuencia, desarrollan colitis leve después de

varias semanas (603,604). En los tres modelos, y de hecho en prácticamente todos los modelos experimentales de EII disponibles, es necesaria la presencia de la microbiota intestinal para el desarrollo de la inflamación. Sin embargo, el compromiso de la barrera intestinal es mucho menor en el modelo de transferencia que en los modelos de colitis inducida químicamente (TNBS y DSS). Nuestros datos indican que miR-146a se incrementa significativamente en los modelos de TNBS y DSS, pero no después de la transferencia de linfocitos T vírgenes a ratones inmunocomprometidos. Este indicio apoya la hipótesis de que alteraciones en la integridad de la barrera mucosa y una alta carga antigénica, que directamente estimulen el sistema inmune innato, son más importantes en la inducción de miR-146a que los estímulos inflamatorios de la respuesta adaptativa. Una explicación alternativa es que el miR-146a solamente se induce débilmente en la colitis leve, tal y como se observa en la colitis mediada por transferencia adoptiva, en el que la respuesta colítica es típicamente mucho menor que en los modelos por inducción química.

Las IECs constituyen la primera línea de defensa en el intestino y están en contacto continuo con los antígenos intestinales. Estas células derivan de células madre intestinales situados en la base de las criptas. Tras de la proliferación de las células madre, células indiferenciadas migran hacia la punta de las vellosidades, trayecto en el cual sufren un proceso de diferenciación progresiva que da lugar, a diferentes tipos celulares incluyendo células caliciformes, células de Paneth y enterocitos o células absortivas. Resultados recientes demuestran que la expresión de miR-146a se encuentra incrementada en las células inmunitarias tras su maduración (596). Nuestros datos son consistentes con esa relación entre la expresión de miR-146a en IECs y su diferenciación. Para ello, aislamos IECs de las criptas (células indiferenciadas, tal y como comprobamos por la baja actividad enzimática fosfatasa alcalina) y de las vellosidades (células diferenciadas) procedentes de yeyuno de ratón y encontramos que el miR-146a estaba sobreexpresado en vellosidades intestinales en comparación con las criptas. Resultados reflejados en esta tesis doctoral demuestran que la diferenciación de las células Caco-2 también induce la expresión de miR-146a (fold change = 5,2). Sin embargo, el aumento de miR-146a no parece influir en la diferenciación o la proliferación celular, al menos en los parámetros que hemos estudiados

Los TLRs están estrechamente relacionado con la interacción existente entre el sistema inmune innato y la microbiota (4). Las IECs expresan TLRs y producen

citokinas en respuesta a su activación. Asimismo, las IECs responden a la inflamación intestinal produciendo citokinas. Por lo tanto, estas células son consideradas células inmunitarias innatas. La activación de los TLR por sus ligandos inducen la expresión de miR-146a en una variedad de tejidos periféricos (16,596) y en diferentes tipos celulares (monocitos, neutrófilos y células dendríticas) (499). Moléculas como IL-1 β y TNF también son capaces de inducir la expresión de miR-146a en células THP-1 (499,605). Nuestros resultados demuestran que estos efectos son también producidos en IECs. Los ligandos de TLR4 y TLR5, así como los de TNF inducen la expresión de miR-146a en células IEC18 (605). IL-1 β tuvo el mismo efecto en células Caco-2. Sin embargo, no se observó efecto de ligandos de TLR9, TLR2 o NOD2, presumiblemente debido a la baja expresión de estos receptores en las células IEC18.

Un estudio realizado en el intestino de neonatos muestra como la expresión de TLR4 a nivel intestinal se encuentra inducida durante el período neonatal con la subsiguiente inducción de miR-146a (606). Al objeto de verificar este extremo estudiamos la participación de TLR4 y MyD88 (una proteína adaptadora que participan en la transducción de la señal de todos los TLRs excepto TLR3). Nuestros resultados demuestran que el aumento de la expresión de miR-146a observado tras la adición de LPS es suprimido cuando TLR4 o MyD88 son silenciadas en las células IEC18, sosteniendo la hipótesis de que la regulación de la expresión de TLR4 o MyD88 en IECs puede ser una forma de regular la expresión de miR-146.

Se ha propuesto a miR-146a como un mediador de la tolerancia inmune innata en el intestino, que contribuye tanto en reacciones de tolerancia como en la prevención de la inflamación inducida por daño epitelial. La sobreexpresión de miR-146a confiere tolerancia frente a la estimulación con LPS en intestino de ratón (606), así como frente a IL-1 β , como se demuestra recientemente en monocitos THP-1 (605). En nuestro estudio, la sobreexpresión de miR-146a en células IEC18 dio lugar a una disminución de la secreción de MCP-1 y GRO cuando las células fueron estimuladas con LPS. El mismo efecto fue observado para la secreción MCP-1 y IL-8 en células Caco-2 estimuladas con IL-1 β . Por lo tanto, la sobreexpresión de miR-146a en células del epitelio intestinal contribuye a la tolerancia inmune innata mediante la inhibición de la expresión de citokinas proinflamatorias. De ahí que, la estimulación de IECs con LPS/IL-1 β parece activar señales tanto estimulantes como inhibitorias en relación a la

secreción de citocinas. La influencia de la regulación de miR-146a también puede comprobarse indirectamente por muestreo secuencial del medio celular, como en las células THP-1 estimuladas con LPS, donde de forma tardía se manifiesta la reducción de la secreción de TNF, coincidiendo con la expresión del miR-146a.

En resumen, nuestros estudios contribuyen a entender mejor la regulación de miR-146a en la inflamación intestinal demostrando que, en modelos animales de colitis, su expresión se relaciona con el grado de alteración de la barrera intestinal y, por lo tanto, con el nivel de contacto con la microbiota intestinal. También hemos demostrado que la expresión de miR-146a en IEC, como se muestra con otros tipos celulares, está inducida en las células diferenciadas, y en respuesta a ligandos bacterianos y citocinas proinflamatorias como IL-1 β y TNF. La inducción de miR-146a por estos ligandos da lugar a la inhibición de la producción de citocinas, tal y como se demuestra en los experimentos en los que sobreexpresa miR-146a en células IEC-18. Por lo tanto, nuestro estudio describe la importancia de la regulación de miR-146a en la interacción entre células epiteliales intestinales, la microbiota intestinal y estímulos inflamatorios, mediante un fino ajuste de la respuesta mediada por células del epitelio intestinal.

Conclusiones

1. La expresión de miRNAs está regulada en los procesos de diferenciación y proliferación en las células de epitelio intestinal Caco-2. Estos mismos miRNAs están regulados también por citocinas proinflamatorias. En concreto, en células diferenciadas, y por tanto poco proliferativas, se induce la expresión de la mayoría de los miRNAs estudiados, entre los que se encuentran miRNAs supresores de tumores de las familias let7, miR1, miR10 o miR15. Por otra parte, de los 84 miRNAs estudiados, sólo la expresión de miR302, cuya expresión ha sido relacionada con la reprogramación celular, se encontró inhibida en células diferenciadas. Por su parte, IL-1 β y TNF inducen la expresión de miRNAs supresores de tumores de las familias miR10, mimR15 y miR17, mientras que en general inhiben la expresión de los miRNAs de la familia Let7. Esta vinculación observada entre miRNAs específicos y los procesos de inflamación y diferenciación epitelial sugiere una asociación a este nivel entre inflamación y cáncer, que es coherente con la bibliografía existente.

2. miR146a está implicado en el mantenimiento de la función de barrera intestinal. Esta conclusión se basa en los siguientes argumentos:
 - a) La expresión de miR146a está inducida en condiciones de proliferación y en respuesta a las citocinas proinflamatorias IL-1 β y TNF en células de epitelio intestinal, así como en la inflamación colónica in vivo en la que existe un daño epitelial considerable.
 - b) La expresión de miR146a está inducida por moléculas propias de la microbiota intestinal, tanto en líneas celulares de epitelio intestinal como en organoides de intestino delgado de ratón, incluyendo el LPS y la flagelina (antígenos bacterianos y ligandos de TLR4 y TLR5).
 - c) miR146 contribuye a la tolerancia innata, inhibiendo la expresión de citocinas proinflamatorias en respuesta a antígenos bacterianos.

Conclusions

1. The expression of miRNAs is regulated in differentiation and proliferation processes in the intestinal epithelial cells Caco-2. These same miRNAs are also regulated by proinflammatory cytokines. In particular, in differentiated cells, ie with low proliferative levels, the expression of most of the miRNAs analyzed in this study is increased. This is the case of tumor suppressors miRNAs such as family let7, miR1, miR10 or miR15. Moreover, of the 84 miRNAs studied, only miR302, whose expression has been related to cell reprogramming, was inhibited in differentiated cells. IL-1 β and TNF induce the expression of tumor suppressor miRNAs belonging to the families miR10, miR15 and miR17, while inhibit family let7 expression. This observed link between specific miRNAs and processes of inflammation and epithelial differentiation suggests an association between inflammation and cancer, which is consistent with the literature.

2. miR-146a is involved in maintaining the intestinal barrier function. This conclusion is based on:
 - a) miR-146a expression is induced under conditions of proliferation and in response to proinflammatory cytokines IL-1 β and TNF in intestinal epithelial cells and colonic inflammation *in vivo* in which there is epithelial damage.

 - b) miR-146a expression is induced by self molecules of intestinal microbiota in human and murine intestinal cell lines and small intestinal mouse organoid, it includes LPS and flagelin (bacterial antigens and TLR4 and TLR5 ligands).

 - c) miR-146a helps the innate tolerance inhibiting proinflammatory cytokine expression in response to bacterial antigens.

Abreviaturas

Para una mejor comprensión, se presentan a continuación las principales abreviaturas utilizadas en esta Tesis:

µg	microgramos
5-ASA	Ácido 5-aminosalicílico
ADAR	Adenosinas deaminasas que actúan sobre RNAdh
Ago	Proteína Argonauta
AINES	Antiinflamatorio NO esteroideo
Akt	Proteína kinasa B
AP	Fosfata alcalina
AP-1	Proteína activadora 1
APC	Célula presentadora de antígeno
AR	Artritis reumatoide
ATG 16L1	Proteína relacionada con la autofagia-16-1
ATP	Adenosín trifosfato
Baff	Factor de activación de células B
BCL2	Protooncogén <i>B-cell lymphoma 2</i>
Cap	Caperuza
CD	Cluster of differentiation
CF	Fibrosis quística
CFTR	Proteína reguladora de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística
CI	Colitis indiferenciada
CLL	Leucemia linfocítica crónica
CM	Colitis macroscópica
COX	Ciclooxigenasa
CpG	Citosina fosfato guanina
Ct	Ciclo durante la qPCR en el cual la cantidad de fluorescencia detectada supera el umbral determinado
CU	Colitis Ulcerosa
c-myc	Protooncogén de la familia myc

Cxcl1	Quimiokina (C-X-C motif) ligando 1
DAI	índice de actividad de la enfermedad
DC	Célula dendrítica
DGCR8	Proteína de la región del gen 8 crítica para el síndrome de DiGeorge
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DRA	Del inglés "Down Regulated in Adenoma or Slc26a3"
DSS	Sulfato de dextrano sódico
EAI	Enfermedad Autoinmune
EC	Enfermedad de Crohn
EII	Enfermedad Inflamatoria Intestinal
eIF4E	Factor de inicio de la transcripción
EM	Esclerosis múltiple
endo-SiRNA	RNA endógeno pequeño de interferencia
ERK	Quinasa regulada extracelular
FAE	Epitelio asociado a folículo
FBS	Suero fetal bovino
FLA	Flagelina
Foxp3	Del inglés "Forkhead box P3"
GALT	Tejido linfoide asociado al intestino
Gro	Quimioquina de la familia CXC o Cxcl2
GWAS	Estudio de asociación del genoma completo
hnRNPA1	Riboproteína nuclear heterogénea A1
IAP	Fosfatasa alcalina intestinal
ICAM	Molécula de adhesión intercelular
IEC	Células epiteliales intestinales

IFN γ	Interferon γ
IgA	Inmunoglobulina A
I κ B	inhibidor de NF- κ B
IKK	Quinasa de I κ B
IL	Interleukina
IL-(x)R	Receptor de (x) Interleukina
iNOS	Oxido nítrico sintasa inducible
IRAK	Quinasa asociada al receptor de IL-1
IRF3	Factor regulador de interferón 3
JAK2	Quinasa Janus 2
JNK	Quinasa c-Jun N-terminal
KO	Del inglés "Knock out"
LES	Lupus eritematoso sistémico
LOX	Lipooxigenasa
LPS	Lipopolisacárido bacteriano
LY96	Antígeno 6 de linfocito
MAPK	Proteín quinasa activada por mitógenos
MCP-1	Quimioquina de monocitos 1 o CCL2
MDP	Muramildipéptido
MHCII	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase II
miRNA	MicroRNA
mRNA	RNA mensajero
mL	mililitros
MPO	Mieloperoxidasa
MyD88	Gen primario de respuesta a la diferenciación mieloide
Nanog	Del inglés "Tir Na Nog, the mythologic Celtic land of the ever-young"

NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
ng	Nanogramos
NHE3	Transportador intercambiador Na ⁺ /H ⁺ isoforma 3 o Slc9a3
NKCC1	Co-transportador Na ⁺ /K ⁺ /2Cl ⁻ o Slc12a2
NK	Células asesinas naturales
NKT	Células asesinas naturales T
NLR	Receptor tipo NOD
NO	Óxido nítrico
NOD	Dominio de oligomerización por unión de nucleótidos
nt	Nucleótidos
PABPC1	Proteína de unión a Poly A
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PAZ	Domino Piwi/Argonauta/Zwile
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDG	Peptidoglicano
pi-RNA	RNA asociado a Piwi
PI3K	Fosfoinositol-3-quinasa
PPAR	Receptor activado por el proliferador de peroxisomas
PPR	Receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos
pre-miRNA	Precursor de miRNA
pri-miRNA	Transcrito primario de miRNA
PS	Psoriasis
PTGS	Silenciamiento postranscripcional de genes
PTI	Purpura trombocitopénica idiopática

P38	Proteín quinasa 38 activada por mitógenos
P53	Proteína supresora de tumores
RANTES	Quimioquina (CC motif) ligando 5 o CCL5
REG3 γ	Del inglés "Regenerating serine/threonine kinas"
RICK	Del inglés "Receptor-interacting serine/threonine kinase"
RISC	Complejo multiprotéico inductor del silenciamiento
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAs	RNA de cadena simple
RNAdh	RNA de doble hebra
RNAi	RNA de interferencia
RLR	Receptor tipo RIG
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RNAPol II	Polimerasa RNA II
RT	Retrotranscripción
RT-qPCR	Retrotranscripción seguida de amplificación cuantitativa mediante reacción en cadena de la polimerasa utilizando fluoróforos marcadores de la reacción de amplificación
SARM	Proteína inhibidora de la señal de TRIF
S100A8	Del inglés "S100 calcium binding protein A8 or Calgranulin A"
SAT3	Del inglés "Streptothricin-acetyltransferase gene"
SCFA	Ácidos grasos de cadena corta
SII	Síndrome de intestino irritable
SncRNA	RNA pequeño no codificante endógeno
SOX2	Del inglés "Sex Determining Region Y-box 2"
STAT	Transductor de la señal y activador de la transcripción
TAK1	Linasa 1 activada por TGF β
TCR	Receptor de linfocitos T

TGFβ	Factor de crecimiento transformante β
Th0	Célula T colaboradora virgen
Th1	Célula T colaboradora Tipo 1
Th2	Célula T colaboradora Tipo 2
Th17	Célula T colaboradora Tipo 17
TIRAP	Del inglés “ Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor proteín”
TJ	Uniones estrechas
TLR	Receptor de tipo Toll
TNBS	Ácido trinitrobenceno sulfónico
TNF	Factor de necrosis tumoral α
TNFR	Receptor del Factor de necrosis tumoral α
TRAF	Factor de activación del receptor de TNF
TRBP	Proteína TAR de unión a RNA
Treg	Célula T reguladora
TRIF	Del inglés “TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β
TYK2	Tirosín quinasa 2
UTR	Región NO traducida
VCAM	Molécula de adhesión en el endotelio vascular
WT	Del inglés “Wild type”
Xpo-5	Proteína exportina 5

Referencias

1. Sanchez de Medina, Fermin, Romero Calvo, Isabel, Mascaraque, Cristina, Martinez Augustin O. Intestinal inflammation and Mucosal Barrier Function. 2014;11.
2. Roberfroid M, Gibson GR, Hoyles L, McCartney AL, Rastall R, Rowland I, et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br J Nutr.* 2010;104 Suppl:S1–63.
3. Wieland A, Frank DN, Harnke B, Bambha K. Systematic review: microbial dysbiosis and nonalcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2015;42(9):1051–63.
4. Sánchez de Medina F, Ortega-González M, González-Pérez R, Capitán-Cañadas F, Martínez-Augustin O. Host-microbe interactions: the difficult yet peaceful coexistence of the microbiota and the intestinal mucosa. *Br J Nutr.* Cambridge University Press; 2013;109 Suppl :S12–20.
5. Abreu MT. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat Rev Immunol.* Nature Publishing Group; 2010;10(2):131–44.
6. Lee J, Mo J-H, Shen C, Rucker AN, Raz E. Toll-like receptor signaling in intestinal epithelial cells contributes to colonic homeostasis. *Curr Opin Gastroenterol.* 2007;23(1):27–31.
7. Melmed G, Thomas LS, Lee N, Tesfay SY, Lukasek K, Michelsen KS, et al. Human intestinal epithelial cells are broadly unresponsive to Toll-like receptor 2-dependent bacterial ligands: implications for host-microbial interactions in the gut. *J Immunol.* 2003;170:1406–15.
8. Martinez-Augustin O, Merlos M, Zarzuelo A, Suarez MD, de Medina FS. Disturbances in metabolic, transport and structural genes in experimental colonic inflammation in the rat: a longitudinal genomic analysis. *BMC Genomics.* 2008;9:490.
9. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet.* Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.; 2011;12(12):861–74.
10. Rakyan VK, Down TA, Balding DJ, Beck S. Epigenome-wide association studies for common human diseases. *Nat Rev Genet.* 2011;12(8):529–41.
11. Rau CS, Yang JC hia S, Chen YC, Wu CJ, Lu TH, Tzeng SL, et al. Lipopolysaccharide-induced microRNA-146a targets CARD10 and regulates angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells. *Toxicol Sci.* 2014;140(2):315–26.
12. Lederhuber H, Baer K, Altiok I, Sadeghi K, Herkner KR, Kasper DC. MicroRNA-146: Tiny player in neonatal innate immunity? *Neonatology.* 2010;99(1):51–6.
13. Cheng HS, Sivachandran N, Lau A, Boudreau E, Zhao JL, Baltimore D, et al. MicroRNA-146 represses endothelial activation by inhibiting pro-inflammatory pathways. *EMBO Mol Med.* 2013;5(7):949–66.
14. Saba R, Sorensen DL, Booth SA. MicroRNA-146a: A dominant, negative regulator of the innate immune response. *Frontiers in Immunology.* Frontiers Research Foundation; 2014.
15. Nahid MA, Pauley KM, Satoh M, Chan EKL. miR-146a is critical for endotoxin-induced tolerance: Implication in innate immunity. *J Biol Chem.* 2009;284(50):34590–9.
16. Chassin C, Hempel C, Stockinger S, Dupont A, Kübler JF, Wedemeyer J, et al. MicroRNA-146a-mediated downregulation of IRAK1 protects mouse and human small intestine against ischemia/reperfusion injury. *EMBO Mol Med.* 2012;4(12):1308–19.
17. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature.* 2009;459(7244):262–5.
18. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene

- into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*. 1990;2(4):279–89.
19. Romano N, Macino G. Quelling: Transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol*. 1992;6(22):3343–53.
 20. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998;391(6669):806–11.
 21. Cullen BR. Derivation and function of small interfering RNAs and microRNAs. *Virus Research*. 2004. p. 3–9.
 22. Lee RC. The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. 1993;75:843–54.
 23. Mack GS. MicroRNA gets down to business. *Nat Biotechnol*. 2011;29(5):459.
 24. Ghildiyal M, Zamore PD. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet*. 2009;10(2):94–108.
 25. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom K-H, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 2004;23(20):4051–60.
 26. Rajewsky N. microRNA target predictions in animals. *Nat Genet*. 2006;38:S8–13.
 27. Krek A, Grün D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, et al. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet*. 2005;37(5):495–500.
 28. Hannon BC and GJ. NIH Public Access. 2011;18(9):1199–216.
 29. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(2):126–39.
 30. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol*. 2006;13(12):1097–101.
 31. Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, et al. Molecular Basis for the Recognition of Primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 Complex. *Cell*. 2006;125(5):887–901.
 32. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*. 2004;10(12):1957–66.
 33. Landthaler M, Yalcin A, Tuschl T. The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its *D. melanogaster* homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr Biol*. 2004;14(23):2162–7.
 34. Denli AM, Tops BBJ, Plasterk RH a, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*. 2004;432(7014):231–5.
 35. Han J, Lee Y, Yeom K-H, Kim Y-K, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev*. 2004;18(24):3016–27.
 36. Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*. 2004;10(2):185–91.
 37. Kim VN. MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export. *Trends Cell Biol*. 2004;14(4):156–9.
 38. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*. 2003;17(24):3011–6.
 39. Hutvágner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular

- function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*. 2001;293(5531):834–8.
40. Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RH. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev*. 2001;15(20):2654–9.
 41. Merritt WM, Bar-Eli M, Sood AK. The dicey role of dicer: Implications for RNAi therapy. *Cancer Res*. 2010;70(7):2571–4.
 42. Kok KH, Ng M-HJ, Ching Y-P, Jin D-Y. Human TRBP and PACT directly interact with each other and associate with dicer to facilitate the production of small interfering RNA. *J Biol Chem*. 2007;282(24):17649–57.
 43. Ma JB, Ye K, Patel DJ. Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature*. 2004;429(6989):318–22.
 44. Song J-J, Liu J, Tolia NH, Schneiderman J, Smith SK, Martienssen R a, et al. The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat Struct Biol*. 2003;10(12):1026–32.
 45. Yan KS, Yan S, Farooq A, Han A, Zeng L, Zhou M-M. Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature*. 2003;426(6965):468–74.
 46. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*. 2003;115(2):209–16.
 47. Song JJ, Joshua-Tor L. Argonaute and RNA - Getting into the groove. *Curr Opin Struct Biol*. 2006;16:5–11.
 48. Bhaumik D, Scott GK, Schokrpur S, Patil CK, Campisi J, Benz CC. Expression of microRNA-146 suppresses NF-kappaB activity with reduction of metastatic potential in breast cancer cells. *Oncogene*. 2008;27(42):5643–7.
 49. Lukiw WJ, Zhao Y, Jian GC. An NF-kB-sensitive micro RNA-146a-mediated inflammatory circuit in alzheimer disease and in stressed human brain cells. *J Biol Chem*. 2008;283(46):31315–22.
 50. Hurst DR, Edmonds MD, Scott GK, Benz CC, Vaidya KS, Welch DR. Breast cancer metastasis suppressor 1 up-regulates miR-146, Which suppresses breast cancer metastasis. *Cancer Res*. 2009;69(4):1279–83.
 51. Li Y, VandenBoom TG, Wang Z, Kong D, Ali S, Philip PA, et al. miR-146a suppresses invasion of pancreatic cancer cells. *Cancer Res*. 2010;70(4):1486–95.
 52. Pacifico F, Crescenzi E, Mellone S, Iannetti A, Porrino N, Liguoro D, et al. Nuclear factor- κ B contributes to anaplastic thyroid carcinomas through up-regulation of miR-146a. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(3):1421–30.
 53. Suzuki Y, Kim HW, Ashraf M, Haider HK. Diazoxide potentiates mesenchymal stem cell survival via NF-kappaB-dependent miR-146a expression by targeting Fas. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;299(4):H1077–82.
 54. He L, He X, Lim LP, de Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*. 2007;447(7148):1130–4.
 55. Marson A, Levine SS, Cole MF, Frampton GM, Brambrink T, Johnstone S, et al. Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell*. 2008;134(3):521–33.
 56. Lujambio A, Calin G a, Villanueva A, Ropero S, Sánchez-Céspedes M, Blanco D, et al. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci U*

- S A. 2008;105(36):13556–61.
57. Blow MJ, Grocock RJ, van Dongen S, Enright AJ, Dicks E, Futreal PA, et al. RNA editing of human microRNAs. *Genome Biol.* 2006;7(4):R27.
 58. Bass BL. How does RNA editing affect dsRNA-mediated gene silencing? *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2006;71:285–92.
 59. Luciano DJ, Mirsky H, Vendetti NJ, Maas S. RNA editing of a miRNA precursor. *RNA.* 2004;10(8):1174–7.
 60. Liu Y, Herbert A, Rich A, Samuel CE. Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase: nucleic acid binding properties. *Methods.* 1998;15(3):199–205.
 61. Palladino MJ, Keegan LP, O’Connell MA, Reenan RA. dADAR, a Drosophila double-stranded RNA-specific adenosine deaminase is highly developmentally regulated and is itself a target for RNA editing [In Process Citation]. *Rna.* 2000;6(7):1004–18.
 62. Scadden AD, Smith CW. RNAi is antagonized by A→I hyper-editing. *EMBO Rep.* 2001;2(12):1107–11.
 63. Yang W, Chendrimada TP, Wang Q, Higuchi M, Seeburg PH, Shiekhattar R, et al. Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases. *Nat Struct Mol Biol.* 2006;13(1):13–21.
 64. O’Connell MA, Keegan LP. Drosha versus ADAR: wrangling over pri-miRNA. *Nat Struct Mol Biol.* 2006;13(1):3–4.
 65. Michlewski G, Sanford JR, Cáceres JF. The Splicing Factor SF2/ASF Regulates Translation Initiation by Enhancing Phosphorylation of 4E-BP1. *Molecular Cell.* 2008. p. 179–89.
 66. Paroo Z, Pertsemlidis A. microRNAs mature with help from cancer biology. *Genome Biol.* 2009. p. 310 – .
 67. Tzialikas J, Romer-Seibert J. LIN28: roles and regulation in development and beyond. *Development.* 2015;142(14):2397–404.
 68. Newman M a, Thomson JM, Hammond SM. Lin-28 interaction with the Let-7 precursor loop mediates regulated microRNA processing. *RNA.* 2008;14(8):1539–49.
 69. Viswanathan SR, Daley GQ, Gregory RI. Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science.* 2008;320(5872):97–100.
 70. Rybak A, Fuchs H, Smirnova L, Brandt C, Pohl EE, Nitsch R, et al. A feedback loop comprising lin-28 and let-7 controls pre-let-7 maturation during neural stem-cell commitment. *Nat Cell Biol.* 2008;10(8):987–93.
 71. Heo I, Joo C, Cho J, Ha M, Han J, Kim VN. Lin28 Mediates the Terminal Uridylation of let-7 Precursor MicroRNA. *Mol Cell.* Elsevier Inc.; 2008;32(2):276–84.
 72. Hagan JP, Piskounova E, Gregory RI. Lin28 recruits the TUTase Zcchc11 to inhibit let-7 maturation in mouse embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol.* 2009;16(10):1021–5.
 73. Hwang H-W, Wentzel E a, Mendell JT. A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import. *Science.* 2007;315(5808):97–100.
 74. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature.* 2003;425(6956):415–9.
 75. Pedersen IM, Cheng G, Wieland S, Volinia S, Croce CM, Chisari F V, et al. Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism. *Nature.* 2007;449(7164):919–22.
 76. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell.* 2009;136(2):215–

- 33.
77. Carthew, Richard W. and Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 2009;136(4):642–55.
 78. Farazi TA, Spitzer JI, Morozov P, Tuschl T. miRNAs in human cancer. *J Pathol*. 2011;223(2):102–15.
 79. Lewis BP, Shih I, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. 2003;115(7):787–98.
 80. Tian S, Huang S, Wu S, Guo W, Li J, He X. MicroRNA-1285 inhibits the expression of p53 by directly targeting its 3' untranslated region. *Biochem Biophys Res Commun*. Elsevier Inc.; 2010;396(2):435–9.
 81. Obad S, dos Santos CO, Petri A, Heidenblad M, Broom O, Ruse C, et al. Silencing of microRNA families by seed-targeting tiny LNAs. *Nat Genet*. 2011;43(4):371–8.
 82. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of MicroRNA–Target Recognition. *PLoS Biol*. Public Library of Science; 2005;3(3):e85.
 83. Doench JG, Sharp PA. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev*. 2004;18(5):504–11.
 84. Kloosterman WP, Plasterk RHA. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev Cell*. 2006;11(4):441–50.
 85. Lai EC. Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat Genet*. 2002;30(4):363–4.
 86. Grimson A, Farh KK-H, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell*. 2007;27(1):91–105.
 87. Nielsen CB, Shomron N, Sandberg R, Hornstein E, Kitzman J, Burge CB. Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs. *RNA*. 2007;13(11):1894–910.
 88. Bagga S, Bracht J, Hunter S, Massirer K, Holtz J, Eachus R, et al. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell*. 2005;122(4):553–63.
 89. Giraldez AJ, Mishima Y, Rihel J, Grocock RJ, Van Dongen S, Inoue K, et al. Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science*. 2006;312(5770):75–9.
 90. Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, et al. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature*. 2005;438(7068):685–9.
 91. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*. 2005;433(7027):769–73.
 92. Wu L, Fan J, Belasco JG. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(11):4034–9.
 93. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*. 2010;466(7308):835–40.
 94. Anderson P, Kedersha N. RNA granules. *J Cell Biol*. 2006;172(6):803–8.
 95. Parker R, Sheth U. P Bodies and the Control of mRNA Translation and Degradation. *Mol Cell*. 2007;25(5):635–46.
 96. Pauley KM, Eystathiou T, Jakymiw A, Hamel JC, Fritzier MJ, Chan EKL. Formation of GW

- bodies is a consequence of microRNA genesis. *EMBO Rep.* 2006;7(9):904–10.
97. Jakymiw A, Pauley KM, Li S, Ikeda K, Lian S, Eystathioy T, et al. The role of GW/P-bodies in RNA processing and silencing. *Journal of cell science.* 2007. p. 1317–23.
 98. Eulalio A, Behm-Ansmant I, Izaurralde E. P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(1):9–22.
 99. Keene JD. Minireview: Global regulation and dynamics of ribonucleic acid. *Endocrinology.* 2010;151(4):1391–7.
 100. Leung AKL, Calabrese JM, Sharp P a. Quantitative analysis of Argonaute protein reveals microRNA-dependent localization to stress granules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(48):18125–30.
 101. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet.* 2008;9(2):102–14.
 102. Djuranovic S, Zinchenko MK, Hur JK, Nahvi A, Brunelle JL, Rogers EJ, et al. Allosteric regulation of Argonaute proteins by miRNAs. *Nat Struct Mol Biol. Nature Publishing Group;* 2010;17(2):144–50.
 103. Humphreys DT, Westman BJ, Martin DIK, Preiss T. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(47):16961–6.
 104. Chendrimada TP, Finn KJ, Ji X, Baillat D, Gregory RI, Liebhaber S a, et al. MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature.* 2007;447(7146):823–8.
 105. Lytle JR, Yario T a, Steitz J a. Alvo de mRNAs são reprimidos tão eficientemente, sítios de ligação de microRNA na 5' UTR como 3' UTR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(23):9667–72.
 106. Nelson PT, Hatzigeorgiou AG, Mourelatos Z. miRNP:mRNA association in polyribosomes in a human neuronal cell line. *RNA.* 2004;10(3):387–94.
 107. Kim J, Krichevsky A, Grad Y, Hayes GD, Kosik KS, Church GM, et al. Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(1):360–5.
 108. Vasudevan S, Tong Y, Steitz J a. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science.* 2007;318(5858):1931–4.
 109. Wakiyama M, Takimoto K, Ohara O, Yokoyama S. Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. *Genes Dev.* 2007;21(15):1857–62.
 110. Ross M.H., L.J Romrell and G. kaye. *Histology: a tex and atlas.* Willians & Wilkins.; 1995.
 111. Ham AW and DHC. *Ham's histology.* Lippincott.; 1987.
 112. van der Flier LG, Clevers H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol.* 2009;71:241–60.
 113. Heath JP. Epithelial cell migration in the intestine. *Cell Biol Int.* 1996;20(2):139–46.
 114. Marshman E, Booth C, Potten CS. The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays.* 2002;24(1):91–8.
 115. Barker N, van de Wetering M, Clevers H. The intestinal stem cell. *Genes Dev.* 2008;22(14):1856–64.
 116. Schonhoff SE, Giel-Moloney M, Leiter AB. Minireview: Development and differentiation of gut endocrine cells. *Endocrinology.* 2004;145(6):2639–44.

117. Gebert a, Rothkötter HJ, Pabst R. M cells in Peyer's patches of the intestine. *Int Rev Cytol.* 1996;167:91–159.
118. Baumgart DC, Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet.* 2007;369(9573):1641–57.
119. No Title [Internet]. Available from: <http://www.hopkins-gi.org>.
120. McGovern D, Powrie F. The IL23 axis plays a key role in the pathogenesis of IBD. *Gut.* 2007;56:1333–6.
121. Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The Biological Functions of T Helper 17 Cell Effector Cytokines in Inflammation. *Immunity.* 2008 Apr;28(4):454–67.
122. Loftus E V. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology.* 2004;126(6):1504–17.
123. Molodecky N a, Soon IS, Rabi DM, Ghali W a, Ferris M, Chernoff G, et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology.* Elsevier Inc.; 2012;142(1):46–54.e42; quiz e30.
124. Loftus EV, Silverstein MD, Sandborn WJ, Tremaine WJ, Harmsen WS ZA. Crohn's disease in Olmsted County, Minnesota, 1940-1993: incidence, prevalence, and survival. *Gastroenterology.* 1998;116:1–8.
125. Hou JK, El-Serag H, Thirumurthi S. Distribution and manifestations of inflammatory bowel disease in Asians, Hispanics, and African Americans: a systematic review. *Am J Gastroenterol.* 2009;104(8):2100–9.
126. Yang H, McElree C, Roth MP, Shanahan F, Targan SR, Rotter JI. Familial empirical risks for inflammatory bowel disease: differences between Jews and non-Jews. *Gut.* 1993;34(4):517–24.
127. Moum B, Aadland E, Ekbohm a, Vatn MH. Seasonal variations in the onset of ulcerative colitis. *Gut.* 1996;38(47):376–8.
128. Sonnenberg A, Jacobsen SJ, Wasserman IH. Periodicity of hospital admissions for inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 1994;89(6):847–51.
129. Lewis JD, Aberra FN, Lichtenstein GR, Bilker WB, Brensinger C, Strom BL. Seasonal Variation in Flares of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology.* 2004;126(3):665–73.
130. Auslander JN, Lieberman DA SA. Lack of seasonal variation in the endoscopic diagnoses of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol.* 2005;2233–8.
131. Myszor M and JC. Seasonality of ulcerative colitis. *Lancet.* 1984;2(8401):522–3.
132. Don BA and M. G. Absence of seasonality in emergency hospital admissions for inflammatory bowel disease. *Lancet.* 1984;2(8412):1156–7.
133. Riley SA, Mani V, Goodman MJ, Lucas S. Why do patients with ulcerative colitis relapse? *Gut.* 1990;31(2):179–83.
134. Sellu DP. Seasonal variation in onset of exacerbations of ulcerative proctocolitis. *J R Coll Surg Edinb.* 1986;31 (3):158–60.
135. Tysk C and GJ. Seasonal variation in exacerbations of ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol.* 1993;28 (1):95–6.
136. Zeng L, Anderson FH. Seasonal change in the exacerbations of Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol.* 1996;31(1):79–82.
137. Karamanolis DG, Delis KC, Papatheodoridis G V., Kalafatis E, Paspatis G, Xourgias VC.

- Seasonal variation in exacerbations of ulcerative colitis. *Hepatogastroenterology*. 1997;44(17):1334–8.
138. Vergara M, Fraga X, Casellas F, Bermejo B, Malagelada JR. Seasonal influence in exacerbations of inflammatory bowel disease. *Rev Esp Enfermedades Dig*. 1997;89(5):357–66.
 139. Ekblom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. The epidemiology of inflammatory bowel disease: a large, population-based study in Sweden. *Gastroenterology*. 1991;100(2):350–8.
 140. Brahme F, Lindstrom C, and AW. Crohn's disease in a defined population. An epidemiological study of incidence, prevalence, mortality, and secular trends in the city of Malmö, Sweden. *Gastroenterology*. 1975;69 (2):342–51.
 141. G H. Crohn's disease in Stockholm county 1955-1974. A study of epidemiology, results of surgical treatment and long-term prognosis. *Acta Chir Scand Suppl*. 1979;490:1–84.
 142. Binder V, Both H, Hansen PK, Hendriksen C, Kreiner S T-PK. Incidence and prevalence of ulcerative colitis and Crohn's disease in the County of Copenhagen, 1962 to 1978. *Gastroenterology*. 1982;83(3):563–8.
 143. Halme L, von Smitten K HA. The incidence of Crohn's disease in the Helsinki metropolitan area during 1975-1985. *Ann Chir Gynaecol*. 1989;78(2):115–9.
 144. Gollop JH, Phillips SF, Melton LJ, Zinsmeister AR. Epidemiologic aspects of Crohn's disease: a population based study in Olmsted County, Minnesota, 1943-1982. *Gut*. 1988;29(1):49–56.
 145. Kinga Karlinger, Tamás Györke, Ernő Makö, Ádám Mester ZT. The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Eur J Radiol*. 2000;35(3):154–67.
 146. Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Kreiner S, Binder V. Incidence and prevalence of Crohn's disease in the county of Copenhagen, 1962-87: a sixfold increase in incidence. *Scand J Gastroenterol*. 1992;27(7):609–14.
 147. Loftus E V, Silverstein MD, Sandborn WJ, Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister a R. Ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-1993: incidence, prevalence, and survival. *Gut*. 2000;46:336–43.
 148. Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sorensen TI, Binder V. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 1991;324(2):84–8.
 149. Peeters M, Nevens H, Baert F, Hiele M, de Meyer AM, Vlietinck R, et al. Familial aggregation in Crohn's disease: increased age-adjusted risk and concordance in clinical characteristics. *Gastroenterology*. 1996;111(3):597–603.
 150. Bayless TM, Tokayer AZ, Polito JM, Quaskey SA, Mellits ED, Harris ML. Crohn's disease: concordance for site and clinical type in affected family members--potential hereditary influences. *Gastroenterology*. 1996;111(3):573–9.
 151. Weterman IT, Peña AS. Familial incidence of Crohn's disease in The Netherlands and a review of the literature. *Gastroenterology*. 1984;86(3):449–52.
 152. RB. M. Ulcerative colitis--genetic features. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 1983;88:14–6.
 153. Tysk C, Lindberg E, Järnerot G, Floderus-Myrhed B, Järnerot G, Floderus-Myrhed B. 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):990–6.
 154. Halfvarson J, Bodin L, Tysk C, Lindberg E, Järnerot G. Inflammatory bowel disease in a

- Swedish twin cohort: A long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. *Gastroenterology*. 2003;124(7):1767–73.
155. Thompson NP, Driscoll R, Pounder RE, Wakefield a J. Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. *BMJ*. 1996;312(7023):95–6.
 156. Orholm M, Binder V, Sorensen TI, Rasmussen LP, Kyvik KO. Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand J Gastroenterol*. 2000;35(10):1075–81.
 157. Lashner BA, Evans AA, Kirsner JB HS. Prevalence and incidence of inflammatory bowel disease in family members. *Gastroenterology*. 91 (6):1396–400.
 158. Franke A, Balschun T, Sina C, Ellinghaus D, Häsler R, Mayr G, et al. Genome-wide association study for ulcerative colitis identifies risk loci at 7q22 and 22q13 (IL17REL). *Nat Genet*. Nature Publishing Group; 2010;42(4):292–4.
 159. Tamboli CP, Cortot A, Colombel JF. What are the major arguments in favour of the genetic susceptibility for inflammatory bowel disease? *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2003;15(6):587–92.
 160. Ishihara S, Aziz MM, Yuki T, Kazumori H, Kinoshita Y. Inflammatory bowel disease: review from the aspect of genetics. *J Gastroenterol*. 2009;44(11):1097–108.
 161. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn’s disease. *Nature*. 2001;411(6837):603–6.
 162. Hisamatsu T, Suzuki M, Reinecker H-C, Nadeau WJ, McCormick BA, Podolsky DK. CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*. Elsevier; 2003 Apr 4;124(4):993–1000.
 163. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science*. 2006;314(5804):1461–3.
 164. Momozawa Y, Mni M, Nakamura K, Coppieters W, Almer S, Amininejad L, et al. Resequencing of positional candidates identifies low frequency IL23R coding variants protecting against inflammatory bowel disease. *Nat Genet*. 2011;43(Supplement):43–7.
 165. Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD, et al. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn’s disease. *Nat Genet*. Nature Publishing Group; 2008;40(8):955–62.
 166. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet*. 2007;39(2):207–11.
 167. Parkes M, Barrett JC, Prescott NJ, Tremelling M, Anderson CA, Fisher SA, et al. Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn’s disease susceptibility. *Nat Genet*. Nature Publishing Group; 2007;39(7):830–2.
 168. Higuchi LM, Khalili H, Chan AT, Richter JM, Bousvaros A, Fuchs CS. A prospective study of cigarette smoking and the risk of inflammatory bowel disease in women. *Am J Gastroenterol*. 2012;107(9):1399–406.
 169. Silverstein MD, Lashner BA, Hanauer SB, Evans AA KJ. Cigarette smoking in Crohn’s disease. *Am J Gastroenterol*. 1989;84 (1):31–3.
 170. Sutherland LR, Ramcharan S, Bryant H, Fick G. Effect of cigarette smoking on recurrence of Crohn’s disease. *Gastroenterology*. 1990;98(5 Pt 1):1123–8.
 171. Cosnes J, Beaugerie L, Carbonnel F, Gendre JP. Smoking cessation and the course of

- Crohn's disease: an intervention study. *Gastroenterology*. 2001;120(5):1093–9.
172. Glassman MS, Newman LJ, Berezin S, Gryboski JD. Cow's milk protein sensitivity during infancy in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 1990;85(7):838–40.
 173. Tragnone a, Valpiani D, Miglio F, Elmi G, Bazzocchi G, Pipitone E, et al. Dietary habits as risk factors for inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1995;7(1):47–51.
 174. Diet and Inflammatory Bowel Disease.
 175. Sakamoto N, Kono S, Wakai K, Fukuda Y, Satomi M, Shimoyama T, et al. Dietary risk factors for inflammatory bowel disease: a multicenter case-control study in Japan. *Inflamm Bowel Dis*. 2005;11(2):154–63.
 176. Amre DK, D'Souza S, Morgan K, Seidman G, Lambrette P, Grimard G, et al. Imbalances in dietary consumption of fatty acids, vegetables, and fruits are associated with risk for crohn's disease in children. *Am J Gastroenterol*. 2007;102(9):2016–25.
 177. Geerling BJ, Dagnelie PC, Badart-Smook a, Russel MG, Stockbrügger RW, Brummer RJ. Diet as a risk factor for the development of ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*. 2000;95(4):1008–13.
 178. Jowett SL, Seal CJ, Pearce MS, Phillips E, Gregory W, Barton JR, et al. Influence of dietary factors on the clinical course of ulcerative colitis: a prospective cohort study. *Gut*. 2004;53(10):1479–84.
 179. Belluzzi a, Brignola C, Campieri M, Pera a, Boschi S, Miglioli M. Effect of an enteric-coated fish-oil preparation on relapses in Crohn's disease. *N Engl J Med*. 1996;334(24):1557–60.
 180. Stenson WF, Cort D, Rodgers J, Burakoff R, DeSchryver-Kecskemeti K, Gramlich TL, et al. Dietary supplementation with fish oil in ulcerative colitis. *Ann Intern Med*. 1992;116(8):609–14.
 181. Hillier K, Jewell R, Dorrell L, Smith CL. Incorporation of fatty acids from fish oil and olive oil into colonic mucosal lipids and effects upon eicosanoid synthesis in inflammatory bowel disease. *Gut*. 1991;32:1151–5.
 182. Sonnenberg A. Geographic variation in the incidence of and mortality from inflammatory bowel disease. *Dis Colon Rectum*. 1986;29(12):854–61.
 183. Chan SS, Luben R, Olsen A, Tjonneland A, Kaaks R, Teucher B, et al. Body Mass Index and the Risk for Crohn's Disease and Ulcerative Colitis: Data From a European Prospective Cohort Study (The IBD in EPIC Study). *AmJGastroenterol*. 2013;108(1572-0241 (Electronic)):575–82.
 184. Mendall M a, Gunasekera a V, John BJ, Kumar D. Is obesity a risk factor for Crohn's disease? *Dig Dis Sci*. 2011;56(3):837–44.
 185. Desreumaux P, Ernst O, Geboes K, Gambiez L, Berrebi D, Muller-Alouf H, et al. Inflammatory alterations in mesenteric adipose tissue in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1999;117(1):73–81.
 186. Blain A, Cattan S, Beaugerie L, Carbonnel F, Gendre JP, Cosnes J. Crohn's disease clinical course and severity in obese patients. *Clin Nutr*. Elsevier; 2002 Mar 2;21(1):51–7.
 187. Long MD, Crandall W V, Leibowitz IH, Duffy L, del Rosario F, Kim SC, et al. Prevalence and epidemiology of overweight and obesity in children with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17(10):2162–8.

188. Porter CK, Tribble DR, Aliaga P a., Halvorson H a., Riddle MS. Infectious Gastroenteritis and Risk of Developing Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*. 2008;135(3):781–6.
189. Gradel KO, Nielsen HL, Schönheyder HC, Ejlertsen T, Kristensen B, Nielsen H. Increased Short- and Long-Term Risk of Inflammatory Bowel Disease After Salmonella or *Campylobacter* Gastroenteritis. *Gastroenterology*. AGA Institute American Gastroenterological Association; 2009;137(2):495–501.
190. García Rodríguez LA, Ruigómez A, Panés J. Acute gastroenteritis is followed by an increased risk of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2006;130(6):1588–94.
191. López-Serrano P, Pérez-Calle JL, Pérez-Fernández MT, Fernández-Font JM, Boixeda de Miguel D, Fernández-Rodríguez CM. Environmental risk factors in inflammatory bowel diseases. Investigating the hygiene hypothesis: a Spanish case-control study. *Scand J Gastroenterol*. 2010;45(12):1464–71.
192. Thompson NP, Montgomery SM, Pounder RE, Wakefield AJ. Is measles vaccination a risk factor for inflammatory bowel disease? *Lancet*. 1995;345(8957):1071–4.
193. Jones P, Fine P, Piracha S. Crohn's disease and measles. *Lancet (London, England)*. Elsevier; 1997 Feb 15;349(9050):473.
194. Wakefield AJ, Ekblom A, Dhillon AP, Pittilo RM, Pounder RE. Crohn's disease: pathogenesis and persistent measles virus infection. *Gastroenterology*. 1995;108(3):911–6.
195. Feller M, Huwiler K, Stephan R, Altpeter E, Shang A, Furrer H, et al. *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2007;7(9):607–13.
196. Montgomery SM, Morris DL, Pounder RE, Wakefield AJ. Paramyxovirus infections in childhood and subsequent inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1999;116(4):796–803.
197. Contractor N V, Bassiri H, Reya T, Park AY, Baumgart DC, Wasik MA, et al. Lymphoid hyperplasia, autoimmunity, and compromised intestinal intraepithelial lymphocyte development in colitis-free gnotobiotic IL-2-deficient mice. *J Immunol*. 1998;160(1):385–94.
198. Taurog JD, Richardson J a, Croft JT, Simmons W a, Zhou M, Fernández-Sueiro JL, et al. The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *J Exp Med*. 1994;180(6):2359–64.
199. Pittard WB 3rd. Breast milk immunology. A frontier in infant nutrition. *Am J Dis Child*. 1987;133(1):83–7.
200. Pittard WB 3rd BK. Immunoregulation by breast milk cells. *Cell Immunol*. 1979;42(2):437–41.
201. Bernt KM, Walker W a. Human milk as a carrier of biochemical messages. *Acta Paediatr Suppl*. 1999;88(430):27–41.
202. Carver J, Barness L. Trophic factors for the gastrointestinal tract. *Clin Perinatol*. 1996;23(2):265–85.
203. Davis MK. Breastfeeding and chronic disease in childhood and adolescence. *Pediatr Clin North Am*. 2001;48(1):125–41, ix.
204. Koletzko S, Sherman P, Corey M, Griffiths A, Smith C. Role of infant feeding practices in development of Crohn's disease in childhood. *Br Med J*. 1989;298(6688):1617–8.
205. Gilat T, Hacoheh D, Lilos P, Langman MJ. Childhood factors in ulcerative colitis and

- Crohn's disease. An international cooperative study. *Scand J Gastroenterol.* Gilat, T. Ichilov Hospital, Tel Aviv, Israel.; 1987;22(8):1009–24.
206. Koletzko S, Griffiths A, Corey M, Smith C, Sherman P. Infant feeding practices and ulcerative colitis in childhood. *Br Med J (Clinical Res Ed).* 1991;302(6792):1580–1.
 207. Ekblom A, Adami HO, Helmick CG, Jonzon A, Zack MM. Perinatal risk factors for inflammatory bowel disease: a case-control study. *Am J Epidemiol.* 1990;132(6):1111–9.
 208. Young E, Stoneham MD, Petruckevitch a, Barton J, Rona R. A population study of food intolerance. *Lancet.* 1994;343(8906):1127–30.
 209. Bischoff SC, Herrmann A, Manns MP, Bischoff C. Prevalence of adverse reactions to food in patients with gastrointestinal disease. *Allergy.* 1996;51(11):811–8.
 210. Wurzelmann JI, Lyles CM, Sandler RS. Childhood infections and the risk of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci.* 1994;39(3):555–60.
 211. Virta L, Auvinen A, Helenius H, Huovinen P, Kolho KL. Association of repeated exposure to antibiotics with the development of pediatric crohn's disease - A nationwide, register-based Finnish case-control study. *Am J Epidemiol.* 2012;175(8):775–84.
 212. Shaw SY, Blanchard JF, Bernstein CN. Association between the use of antibiotics and new diagnoses of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol.* Nature Publishing Group; 2011;106(12):2133–42.
 213. Garrido-Mesa N, Camuesco D, Arribas B, Comalada M, Bailón E, Cueto-Sola M, et al. The intestinal anti-inflammatory effect of minocycline in experimental colitis involves both its immunomodulatory and antimicrobial properties. *Pharmacol Res.* Elsevier Ltd; 2011;63(4):308–19.
 214. Garrido-Mesa N, Utrilla P, Comalada M, Zorrilla P, Garrido-Mesa J, Zarzuelo A, et al. The association of minocycline and the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 results in an additive beneficial effect in a DSS model of reactivated colitis in mice. *Biochem Pharmacol.* 2011 Dec 15;82(12):1891–900.
 215. Garrido-Mesa N, Zarzuelo A, Gálvez J. Minocycline: far beyond an antibiotic. *Br J Pharmacol.* 2013;169(2):337–52.
 216. Bankar RN, Dafe CO Köhnke A BP. Ulcerative colitis probably associated with isotretinoin. *Indian J Gastroenterol.* 2006;25(3):171–2.
 217. Reniers DE, Howard JM. Isotretinoin-induced inflammatory bowel disease in an adolescent. *Ann Pharmacother.* 2001;35(10):1214–6.
 218. Bernstein CN, Nugent Z, Longobardi T, Blanchard JF. Isotretinoin is not associated with inflammatory bowel disease: a population-based case-control study. *Am J Gastroenterol.* Nature Publishing Group; 2009;104(11):2774–8.
 219. Crockett SD, Porter CQ, Martin CF, Sandler RS, Kappelman MD. Isotretinoin use and the risk of inflammatory bowel disease: a case-control study. *Am J Gastroenterol.* Nature Publishing Group; 2010;105(9):1986–93.
 220. Shale, M, Kaplan GG, Panaccione R GS. Isotretinoin and intestinal inflammation: what gastroenterologists need to know. *Gut.* 2009;58(6):737–41.
 221. Crockett SD, Gulati A, Sandler RS, Kappelman MD. A causal association between isotretinoin and inflammatory bowel disease has yet to be established. *Am J Gastroenterol.* Nature Publishing Group; 2009;104(10):2387–93.
 222. Alhusayen R, Juurlink D, Mamdani M, Morrow R, Shear N, Dormuth C. Isotretinoin Use and the Risk of Inflammatory Bowel Disease: A Population-Based Cohort Study. *J Invest*

- Dermatol. 2013;133(4):907–12.
223. Etminan M, Bird ST, Delaney JA, Bressler B, Brophy JM. Isotretinoin and risk for inflammatory bowel disease: a nested case-control study and meta-analysis of published and unpublished data. *JAMA Dermatology*. 2013;149(2):216–20.
 224. Aabakken L, Osnes M. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug-Induced Disease in the Distal Ileum and Large Bowel. *Scand J Gastroenterol*. Taylor & Francis; 2009 Jul 8;
 225. Donowitz M. Arachidonic acid metabolites and their role in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. Elsevier; 1985 Jan 2;88(2):580–7.
 226. El Miedany Y, Youssef S, Ahmed I, El Gaafary M. The gastrointestinal safety and effect on disease activity of etoricoxib, a selective cox-2 inhibitor in inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol*. 2006;101(2):311–7.
 227. Sandborn WJ, Stenson WF, Brynskov J, Lorenz RG, Steidle GM, Robbins JL, et al. Safety of celecoxib in patients with ulcerative colitis in remission: a randomized, placebo-controlled, pilot study. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006;4(2):203–11.
 228. Colonic inflammation and nonsteroidal anti-inflammatory drug administration. An assessment of the frequency of the problem. Tann AR, Raghunath AS. 1988;41(2):116–20.
 229. Ananthakrishnan AN, Higuchi LM, Huang ES, Khalili H, Richter JM, Fuchs CS, et al. Aspirin, nonsteroidal anti-inflammatory drug use, and risk for Crohn disease and ulcerative colitis: a cohort study. *Ann Intern Med*. 2012;156(5):350–9.
 230. Kaufmann HJ, Taubin HL. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs activate quiescent inflammatory bowel disease. *Ann Intern Med*. 1987;107(4):513–6.
 231. Felder JB, Korelitz BI, Rajapakse R, Schwarz S, Horatagis a P, Gleim G. Effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on inflammatory bowel disease: a case-control study. *Am J Gastroenterol*. 2000;95(8):1949–54.
 232. Evans JM, McMahon a D, Murray FE, McDevitt DG, MacDonald TM. Non-steroidal anti-inflammatory drugs are associated with emergency admission to hospital for colitis due to inflammatory bowel disease. *Gut*. 1997;40(5):619–22.
 233. Takeuchi K, Smale S, Premchand P, Maiden L, Sherwood R, Thjodleifsson B, et al. Prevalence and mechanism of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced clinical relapse in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006;4(2):196–202.
 234. Bonner GF, Walczak M, Kitchen L, Bayona M. Tolerance of nonsteroidal antiinflammatory drugs in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. Nature Publishing Group; 2000;95(8):1946–8.
 235. Booner GF, Fakhri A VS. A long-term cohort study of nonsteroidal anti-inflammatory drug use and disease activity in outpatients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2004;10(6):751–7.
 236. Godet PG, May GR, Sutherland LR. Meta-analysis of the role of oral contraceptive agents in inflammatory bowel disease. *Gut*. 1995;37(5):668–73.
 237. Cornish J a, Tan E, Simillis C, Clark SK, Teare J, Tekkis PP. The risk of oral contraceptives in the etiology of inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2008;103(9):2394–400.
 238. Khalili H, Higuchi LM, Ananthakrishnan AN, Manson JE, Feskanich D, Richter JM, et al. Hormone therapy increases risk of ulcerative colitis but not Crohn’s disease. *Gastroenterology*. 2012;143(5):1199–206.

239. García Rodríguez L a, González-Pérez a, Johansson S, Wallander M. Risk factors for inflammatory bowel disease in the general population. *Aliment Pharmacol Ther*. 2005;22(4):309–15.
240. Sandler RS. Appendectomy and ulcerative colitis. *Lancet (London, England)*. Elsevier; 1998 Dec 5;352(9143):1797–8.
241. Rutgeerts P D’Haens G, Hiele M, Geboes K VG. Appendectomy protects against ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 1994;106(5):1251–3.
242. Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekbohm A. Appendectomy and protection against ulcerative colitis. *N Engl J Med*. 2001;344(11):808–14.
243. Okazaki K, Onodera H, Watanabe N, Nakase H, Uose S, Matsushita M, et al. A patient with improvement of ulcerative colitis after appendectomy. *Gastroenterology*. 2000. p. 502–6.
244. Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekbohm A. Appendectomy is followed by increased risk of Crohn’s disease. *Gastroenterology*. 2003;124(1):40–6.
245. Kaplan GG, Jackson T, Sands BE, Frisch M, Andersson RE, Korzenik J. The risk of developing Crohn’s disease after an appendectomy: A meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2008;103(11):2925–31.
246. Helzer JE, Chammas S, Norland CC, Stillings WA, Alpers DH. A study of the association between Crohn’s disease and psychiatric illness. *Gastroenterology*. 1984;86(2):324–30.
247. Lerebours E, Gower-Rousseau C, Merle V, Brazier F, Debeugny S, Marti R, et al. Stressful life events as a risk factor for inflammatory bowel disease onset: A population-based case-control study. *Am J Gastroenterol*. 2007;102(1):122–31.
248. Li J, Nørgård B, Precht DH, Olsen J. Psychological stress and inflammatory bowel disease: a follow-up study in parents who lost a child in Denmark. *Am J Gastroenterol*. 2004;99(6):1129–33.
249. Levenstein S, Prantera C, Varvo V, Scribano ML, Berto E, Andreoli A, et al. Psychological stress and disease activity in ulcerative colitis: a multidimensional cross-sectional study. *AmJGastroenterol*. 1994;89(8):1219–25.
250. Bernstein CN, Singh S, Graff L a, Walker JR, Miller N, Cheang M. A prospective population-based study of triggers of symptomatic flares in IBD. *Am J Gastroenterol*. Nature Publishing Group; 2010;105(9):1994–2002.
251. Cho JH. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(6):458–66.
252. Strober W, Fuss I, Mannon P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest*. 2007;117(3):514–21.
253. Kallel L, Boubaker J, Louzir H, Ben Ahmed M, Sassi A, Boubaker S, et al. [Colonic expression of gamma-interferon and interleukin-10 in Crohn’s disease and ulcerative colitis]. *Press Med*. 2005;34(1):8–12.
254. Fais S, Capobianchi MR, Pallone F, Di Marco P, Boirivant M, Dianzani F, et al. Spontaneous release of interferon gamma by intestinal lamina propria lymphocytes in Crohn’s disease. Kinetics of in vitro response to interferon gamma inducers. *Gut*. 1991;32(4):403–7.
255. Monteleone G, Biancone L, Marasco R, Morrone G, Marasco O, Luzzo F, et al. Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn’s disease intestinal lamina propria mononuclear cells. *Gastroenterology*. 1997;112(4):1169–78.
256. Peluso I, Pallone F, Monteleone G. Interleukin-12 and Th1 immune response in Crohn’s disease: Pathogenetic relevance and therapeutic implication. *World J Gastroenterol*.

- 2006;12(35):5606–10.
257. Parrello T, Monteleone G, Cucchiara S, Monteleone I, Sebkova L, Doldo P, et al. Up-Regulation of the IL-12 Receptor α 2 Chain in Crohn's Disease 1. 2000;(Cd).
 258. Sartor RB. Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol.* 1997;92(12 Suppl):5S – 11S.
 259. Annunziato F, Cosmi L, Santarasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med.* 2007;204(8):1849–61.
 260. Annunziato F, Romagnani S. Heterogeneity of human effector CD4+ T cells. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(6):257.
 261. Ivanov II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U, et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell. Elsevier Ltd;* 2009;139(3):485–98.
 262. Izcue A, Coombes JL, Powrie F. Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:313–38.
 263. Atarashi K, Umesaki Y, Honda K. Microbial influence on T cell subset development. *Semin Immunol. Elsevier Ltd;* 2011;23(2):146–53.
 264. Nancey S, Holvöet S, Graber I, Joubert G, Philippe D, Martin S, et al. CD8+ cytotoxic T cells induce relapsing colitis in normal mice. *Gastroenterology.* 2006;131(2):485–96.
 265. Brimnes J, Allez M, Dotan I, Shao L, Nakazawa A, Mayer L. Defects in CD8+ regulatory T cells in the lamina propria of patients with inflammatory bowel disease. *J Immunol.* 2005;174(9):5814–22.
 266. Fort MM, Leach MW, Rennick DM. A role for NK cells as regulators of CD4+ T cells in a transfer model of colitis. *J Immunol. American Association of Immunologists;* 1998;161(7):3256–61.
 267. Saubermann LJ, Beck P, De Jong YP, Pitman RS, Ryan MS, Kim HS, et al. Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide in the presence of CD1d provides protection against colitis in mice. *Gastroenterology.* 2000;119(1):119–28.
 268. Krajina T, Leithäuser F, Möller P, Trobonjaca Z, Reimann J. Colonic lamina propria dendritic cells in mice with CD4+ T cell-induced colitis. *Eur J Immunol.* 2003;33(4):1073–83.
 269. Verstege MI, ten Kate FJW, Reinartz SM, van Druenen CM, Slors FJM, Bemelman W a, et al. Dendritic cell populations in colon and mesenteric lymph nodes of patients with Crohn's disease. *J Histochem Cytochem.* 2008;56(3):233–41.
 270. Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G, Sutren M, Pochart P, Marteau P, et al. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut.* 2003;52(2):237–42.
 271. Baert F, Vermeire S, Noman M, Assche G Van, Haens GD, Rutgeerts P. MANAGEMENT OF ULCERATIVE COLITIS AND CROHN'S DISEASE. *Acta Clinica Belgica. Maney Publishing Suite 1C, Joseph's Well, Hanover Walk, Leeds LS3 1AB, UK;* 2014 Jan.
 272. Sandborn WJ, Targan SR. Biologic therapy of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2002;122:1592–608.
 273. Akobeng a K, Gardener E. Oral 5-aminosalicylic acid for maintenance of medically-induced remission in Crohn's Disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005;(1):CD003715.
 274. Lr S, Jk M. Oral 5-aminosalicylic acid for maintenance of remission in ulcerative colitis. *JohnWiley Sons, Ltd A.* 2010;(9):1–1 – .

275. Gisbert JP, Gomollón F, Maté J PJ. Role of 5-aminosalicylic acid (5-ASA) in treatment of inflammatory bowel disease: a systematic review. *Dig Dis Sci.* 2002;47(3):471–88.
276. Svartz N. Sulfasalazine: II. Some notes on the discovery and development of salazopyrin. *Am J Gastroenterol.* 1988;83(5):497–503.
277. Yu DK, Elvin a T, Morrill B, Eichmeier LS, Lanman RC, Lanman MB, et al. Effect of food coadministration on 5-aminosalicylic acid oral suspension bioavailability. *Clin Pharmacol Ther.* 1990;48(1):26–33.
278. Azad Khan AK, Piris J, Truelove SC. An experiment to determine the active therapeutic moiety of sulphasalazine. *Lancet.* 1977;2(8044):892–5.
279. van Hees P a, Bakker JH, van Tongeren JH. 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):632–5.
280. Forbes a., Cartwright a., Marchant S, McIntyre P, Newton M. Review article: Oral, modified-release mesalazine formulations - Proprietary versus generic. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003;17:1207–14.
281. Christensen L a, Slot O, Sanchez G, Boserup J, Rasmussen SN, Bondesen S, et al. Release of 5-aminosalicylic acid from Pentasa during normal and accelerated intestinal transit time. *Br J Clin Pharmacol.* 1987;23(3):365–9.
282. Nikolaus S, Fölsch U SS. Immunopharmacology of 5-aminosalicylic acid and of glucocorticoids in the therapy of inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterology.* 2000;47(31):71–82.
283. Greenfield SM, PUNCHARD NA, Teare JP, Thompson RP. Review article: the mode of action of the aminosalicylates in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 1993;7(4):369–83.
284. Wahl C, Wahl C, Liptay S, Liptay S, Adler G, Adler G, et al. Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor κ B. *J Clin Invest.* 1998;101(5):1163–74.
285. Weber CK, Liptay S, Wirth T, Adler G, Schmid RM. Suppression of NF- κ B activity by sulfasalazine is mediated by direct inhibition of I κ B kinases alpha and beta. *Gastroenterology.* 2000;119(5):1209–18.
286. Martínez-Augustin O, López-Posadas R, González R, Suárez MD, Zarzuelo A, Sánchez de Medina F. Genomic analysis of sulfasalazine effect in experimental colitis is consistent primarily with the modulation of NF- κ B but not PPAR- γ signaling. *Pharmacogenet Genomics.* 2009;19(5):363–72.
287. Egan LJ, Mays DC, Huntoon CJ, Bell MP, Pike MG, Sandborn WJ, et al. Inhibition of Interleukin-1-stimulated NF- κ B RelA / p65 Phosphorylation by Mesalamine Is Accompanied by Decreased Transcriptional Activity *. 1999;274(37):26448–53.
288. Nayar M, Rhodes JM. Management of inflammatory bowel disease. *Postgrad Med J.* 2004;80(942):206–13.
289. Smoak KA, Cidlowski JA. Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mech Ageing Dev.* 2004;125(10-11):697–706.
290. Truelove SC, Witts LJ. Cortisone in ulcerative colitis; final report on a therapeutic trial. *Br Med J.* 1955;2(4947):1041–8.
291. Bjarnason I, Macpherson A, Mackintosh C, Buxton-Thomas M, Forgacs I, Moniz C. Reduced bone density in patients with inflammatory bowel disease. *Gut.* 1997;40(2):228–33.

292. Rutgeerts P, Löfberg R, Malchow H, Lamers C, Olaison G, Jewell D, et al. A comparison of budesonide with prednisolone for active Crohn's disease. *N Engl J Med*. 1994;331(13):842–5.
293. Löfberg R, Danielsson a, Suhr O, Nilsson a, Schiöler R, Nyberg a, et al. Oral budesonide versus prednisolone in patients with active extensive and left-sided ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 1996;110(6):1713–8.
294. McGovern DPB, Travis SPL, Duley J, Shobowale-Bakre EM, Dalton HR. Azathioprine intolerance in patients with IBD may be imidazole-related and is independent of TPMT activity. *Gastroenterology*. Elsevier; 2002 Mar 3;122(3):838–9.
295. Tiede I, Fritz G, Strand S, Poppe D, Dvorsky R, Strand D, et al. CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes. *J Clin Invest*. 2003;111(8):1133–45.
296. Campbell S, Travis S, Jewell D. Cyclosporin use in acute ulcerative colitis: a long-term experience. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2005;17(1):79–84.
297. Shibolet O, Regushevskaya E, Brezis M, Soares-Weiser K. Cyclosporine A for induction of remission in severe ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005;(1):CD004277.
298. Cohen RD, Tsang JF, Hanauer SB. Infliximab in Crohn's disease: first anniversary clinical experience. *Am J Gastroenterol*. 2000;95(12):3469–77.
299. Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johanns J, et al. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med*. 2005;353(23):2462–76.
300. Mayordomo L, Marengo JL, Gomez-Mateos J, Rejon E. Pulmonary miliary tuberculosis in a patient with anti-TNF-alpha treatment. *Scand J Rheumatol*. 2002;31(1):44–5.
301. Hassan C, Zullo a., De Francesco V, Ierardi E, Giustini M, Pitidis a., et al. Systematic review: Endoscopic dilatation in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007;26(September):1457–64.
302. Pekow JR, Kwon JH. MicroRNAs in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2012;18(1):187–93.
303. Chen W-X, Ren L-H, Shi R-H. Implication of miRNAs for inflammatory bowel disease treatment: Systematic review. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 2014;5(2):63–70.
304. Lin J, Welker NC, Zhao Z, Li Y, Zhang J, Reuss S a, et al. Novel specific microRNA biomarkers in idiopathic inflammatory bowel disease unrelated to disease activity. *Mod Pathol*. Nature Publishing Group; 2014;27(4):602–8.
305. Iborra M, Bernuzzi F, Invernizzi P, Danese S. MicroRNAs in autoimmunity and inflammatory bowel disease: Crucial regulators in immune response. *Autoimmun Rev*. Elsevier B.V.; 2012;11(5):305–14.
306. Kalla R, Ventham NT, Kennedy NA, Quintana JF, Nimmo ER, Buck AH, et al. MicroRNAs: new players in IBD. *Gut*. 2015;64(3):504–17.
307. Hughes JB, Hellmann JJ, Ricketts TH, Bohannon BJM. Counting the Uncountable: Statistical Approaches to Estimating Microbial Diversity. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67(10):4399–406.
308. Berg RD. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol*. 1996;4(11):430–5.
309. Stout MJ, Conlon B, Landeau M, Lee I, Bower C, Zhao Q, et al. Identification of intracellular bacteria in the basal plate of the human placenta in term and preterm gestations. *Am J Obstet Gynecol*. 2013;208(3).

310. Wassenaar TM, Panigrahi P. Is a foetus developing in a sterile environment? *Lett Appl Microbiol.* Blackwell Publishing Ltd; 2014;59(6):572–9.
311. Cosnes J, Seksik P, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, Gendre JP. Prior appendectomy and the phenotype and course of Crohn’s disease. *World J Gastroenterol.* 2006;12(8):1235–42.
312. Dickinson BL, Badizadegan K, Wu Z, Ahouse JC, Zhu X, Simister NE, et al. Bidirectional FcRn-dependent IgG transport in a polarized human intestinal epithelial cell line. *J Clin Invest.* American Society for Clinical Investigation; 1999 Oct 1;104(7):903–11.
313. Kaiserlian D, Vidal K, Revillard JP. Murine enterocytes can present soluble antigen to specific class II-restricted CD4+ T cells. *Eur J Immunol.* 1989;19(8):1513–6.
314. Colgan SP, Parkos C a, Matthews JB, D’Andrea L, Awtrey CS, Lichtman a H, et al. Interferon-gamma induces a cell surface phenotype switch on T84 intestinal epithelial cells. *Am J Physiol.* 1994;267:C402–10.
315. Zünd G, Madara JL, Dzusz AL, Awtrey CS, Colgan SP. Interleukin-4 and interleukin-13 differentially regulate epithelial chloride secretion. *J Biol Chem.* 1996;271(13):7460–4.
316. Hershberg RM. The epithelial cell cytoskeleton and intracellular trafficking. V. Polarized compartmentalization of antigen processing and Toll-like receptor signaling in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002;283(4):G833–9.
317. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(7):499–511.
318. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2004;5(10):987–95.
319. Abbas Abul K, Lichtman Andrew H PS. *INMUNOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR.* 6th ed. ELSEVIER ESPAÑA, SL; 2008. 19-26 p.
320. S A. Toll receptor families: structure and function. *Semin Immunology.* 2004;16(1):1–2.
321. O’Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(5):353–64.
322. Lu Y-C, Wen-ChenYeh OPS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine.* 2008;42(2):145–51.
323. Böcker U, Yezersky O, Feick P, Manigold T, Panja A, Kalina U, et al. Responsiveness of intestinal epithelial cell lines to lipopolysaccharide is correlated with Toll-like receptor 4 but not Toll-like receptor 2 or CD14 expression. *Int J Colorectal Dis.* 2003;18(1):25–32.
324. Suzuki M, Hisamatsu T, Podolsky DK. Gamma Interferon Augments the Intracellular Pathway for Lipopolysaccharide (LPS) Recognition in Human Intestinal Epithelial Cells through Coordinated Up-Regulation of LPS Uptake and Expression of the Intracellular Toll-Like Receptor 4-MD-2 Complex. *Infect Immun.* 2003 Jun 1;71(6):3503–11.
325. Abreu MT, Arnold ET, Thomas LS, Gonsky R, Zhou Y, Hu B, et al. TLR4 and MD-2 expression is regulated by immune-mediated signals in human intestinal epithelial cells. *J Biol Chem.* 2002;277(23):20431–7.
326. Bambou J-C, Giraud A, Menard S, Begue B, Rakotobe S, Heyman M, et al. In vitro and ex vivo activation of the TLR5 signaling pathway in intestinal epithelial cells by a commensal *Escherichia coli* strain. *J Biol Chem.* American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2004;279(41):42984–92.
327. Nandakumar NS, Pugazhendhi S, Madhu Mohan K, Jayakanthan K, Ramakrishna BS. Effect of *Vibrio cholerae* on chemokine gene expression in HT29 cells and its modulation by *Lactobacillus GG*. *Scand J Immunol.* 2009;69(3):181–7.
328. Tallant T, Deb A, Kar N, Lupica J, de Veer MJ, DiDonato JA. Flagellin acting via TLR5 is the

- major activator of key signaling pathways leading to NF-kappa B and proinflammatory gene program activation in intestinal epithelial cells. *BMC Microbiol.* 2004;4(1):33.
329. Ewaschuk JB, Backer JL, Churchill T a, Obermeier F, Krause DO, Madsen KL. Surface expression of Toll-like receptor 9 is upregulated on intestinal epithelial cells in response to pathogenic bacterial DNA. *Infect Immun.* 2007;75(5):2572–9.
330. Akhtar M, Watson JL, Nazli A, McKay DM. Bacterial DNA evokes epithelial IL-8 production by a MAPK-dependent, NF B-independent pathway. *FASEB J.* 2003 May 8;17(10):1319–21.
331. Steenholdt C, Andresen L, Pedersen G, Hansen A, Brynskov J. Expression and function of toll-like receptor 8 and Tollip in colonic epithelial cells from patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol.* Taylor & Francis; 2009 Jul 8;
332. Pedersen G, Andresen L, Matthiessen MW, Rask-Madsen J, Brynskov J. Expression of Toll-like receptor 9 and response to bacterial CpG oligodeoxynucleotides in human intestinal epithelium. *Clin Exp Immunol.* 2005;141(2):298–306.
333. Rumio C, Besusso D, Palazzo M, Selleri S, Sfondrini L, Dubini F, et al. Degranulation of paneth cells via toll-like receptor 9. *Am J Pathol.* 2004;165(2):373–81.
334. Chuang T, Ulevitch RJ. Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. *Biochim Biophys Acta.* 2001;1518(1-2):157–61.
335. Jijon HB, Panenka WJ, Madsen KL, Parsons HG. MAP kinases contribute to IL-8 secretion by intestinal epithelial cells via a posttranscriptional mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002 Jul 1;283(1):C31–41.
336. Haller D. IKKbeta and Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Participate in Non-pathogenic Gram-negative Enteric Bacteria-induced RelA Phosphorylation and NF-kappa B Activation in Both Primary and Intestinal Epithelial Cell Lines. *J Biol Chem.* 2002 Jul 24;277(41):38168–78.
337. Vora P, Youdim A, Thomas LS, Fukata M, Tesfay SY, Lukasek K, et al. Beta-defensin-2 expression is regulated by TLR signaling in intestinal epithelial cells. *J Immunol.* 2004;173:5398–405.
338. Lee J, Mo J-H, Katakura K, Alkalay I, Rucker AN, Liu Y-T, et al. Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nat Cell Biol.* 2006;8(12):1327–36.
339. Otte JM, Cario E, Podolsky DK. Mechanisms of Cross Hyporesponsiveness to Toll-Like Receptor Bacterial Ligands in Intestinal Epithelial Cells. *Gastroenterology.* 2004;126(4):1054–70.
340. Abreu MT, Thomas LS, Arnold ET, Lukasek K, Michelsen KS, Arditi M. TLR signaling at the intestinal epithelial interface. *J Endotoxin Res.* 2003;9(5):322–30.
341. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem.* 2003;278(11):8869–72.
342. Girardin SE, Boneca IG, Carneiro L a M, Antignac A, Jéhanno M, Viala J, et al. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science.* 2003;300(5625):1584–7.
343. Strober W, Murray PJ, Kitani A, Watanabe T. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(1):9–20.
344. Rosenstiel P, Fantini M, Bräutigam K, Kühbacher T, Waetzig GH, Seeger D, et al. TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology.* Elsevier; 2003 Apr 4;124(4):1001–9.

345. Berrebi D. Card15 gene overexpression in mononuclear and epithelial cells of the inflamed Crohn's disease colon. *Gut*. 2003 Jun 1;52(6):840–6.
346. Ogura Y. Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Gut*. 2003 Nov 1;52(11):1591–7.
347. Lala S, Ogura Y, Osborne C, Hor SY, Bromfield A, Davies S, et al. Crohn's disease and the NOD2 gene: A role for paneth cells. *Gastroenterology*. 2003;125(1):47–57.
348. Stockinger S, Reutterer B, Schaljo B, Schellack C, Brunner S, Materna T, et al. IFN regulatory factor 3-dependent induction of type I IFNs by intracellular bacteria is mediated by a TLR- and Nod2-independent mechanism. *J Immunol. American Association of Immunologists*; 2004;173(12):7416–25.
349. Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem*. 2001 Feb 16;276(7):4812–8.
350. Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, Strober W. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat Immunol*. 2004;5(8):800–8.
351. KOBAYASHI KS, CHAMAILLARD M, OGURA Y, HENEGARIU O, INOHARA N, NUNEZ G, et al. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science (80-)*. American Association for the Advancement of Science; 307(5710):731–4.
352. Wilson CL, Ouellette a J, Satchell DP, Ayabe T, López-Boado YS, Stratman JL, et al. Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. *Science*. 1999;286(5437):113–7.
353. Garabedian EM, Roberts LJJ, McNevin MS, Gordon JI. Examining the Role of Paneth Cells in the Small Intestine by Lineage Ablation in Transgenic Mice. *J Biol Chem*. 1997 Sep 19;272(38):23729–40.
354. Debard N, Sierro F, Browning J, Kraehenbuhl JP. Effect of mature lymphocytes and lymphotoxin on the development of the follicle-associated epithelium and M cells in mouse Peyer's patches. *Gastroenterology. Elsevier*; 2001 Apr 4;120(5):1173–82.
355. SIMECKA JW. Mucosal immunity of the gastrointestinal tract and oral tolerance. *Adv Drug Deliv Rev. Elsevier*; 34(2-3):235–59.
356. Knoop K a, Miller MJ, Newberry RD. Transepithelial antigen delivery in the small intestine: different paths, different outcomes. *Curr Opin Gastroenterol*. 2013;29(2):112–8.
357. Niess JH, Brand S, Gu X, Landsman L, Jung S, McCormick BA, et al. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science*. 2005;307(5707):254–8.
358. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392(March):245–52.
359. Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(4):331–41.
360. Iweala OI, Nagler CR. Immune privilege in the gut: The establishment and maintenance of non-responsiveness to dietary antigens and commensal flora. *Immunol Rev*. 2006;213(1):82–100.
361. Bilsborough J, Viney JL. Gastrointestinal dendritic cells play a role in immunity, tolerance, and disease. *Gastroenterology. Wiley*; 2004;127(1):300–9.
362. Sato A, Hashiguchi M, Toda E, Iwasaki A, Hachimura S, Kaminogawa S. CD11b+ Peyer's patch dendritic cells secrete IL-6 and induce IgA secretion from naive B cells. *J Immunol*.

- 2003;171:3684–90.
363. Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of T. *Nature*. Nature Publishing Group; 2008;453(7198):1051–7.
 364. Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, Akimzhanov A, Kang HS, Chung Y, et al. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity*. Elsevier; 2008 Jan;28(1):29–39.
 365. Zhang F, Meng G, Strober W. Interactions among the transcription factors Runx1, ROR γ t and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol*. 2008;9(11):1297–306.
 366. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor ROR γ mat. *Nat Immunol*. 2008;9(6):641–9.
 367. Granger DN, Kubes P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol*. 1994;55(5):662–75.
 368. Zeissig S, Bürgel N, Günzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, et al. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut*. 2007;56(1):61–72.
 369. Söderholm JD, Olaison G, Peterson KH, Franzén LE, Lindmark T, Wirén M, et al. Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of Crohn's disease. *Gut*. 2002;50(3):307–13.
 370. Mankertz J, Schulzke J-D. Altered permeability in inflammatory bowel disease: pathophysiology and clinical implications. *Curr Opin Gastroenterol*. 2007;23(4):379–83.
 371. Soderholm JD, Peterson KH, Olaison G, Franzen LE, Westrom B, Magnusson KE, et al. Epithelial permeability to proteins in the noninflamed ileum of Crohn's disease? *Gastroenterology*. 1999;117(1):65–72.
 372. Sun Y. Enteric neurones modulate the colonic permeability response to luminal bile acids in rat colon in vivo. *Gut*. 2004;53(3):362–7.
 373. Nenci A, Becker C, Wullaert A, Gareus R, van Loo G, Danese S, et al. Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. *Nature*. Nature Publishing Group; 2007;446(7135):557–61.
 374. Brandl K, Plitas G, Schnabl B, DeMatteo RP, Pamer EG. MyD88-mediated signals induce the bactericidal lectin RegIII gamma and protect mice against intestinal *Listeria* monocytogenes infection. *J Exp Med*. 2007;204(8):1891–900.
 375. Lebeis SL, Bommarium B, Parkos C a, Sherman M a, Kalman D. TLR signaling mediated by MyD88 is required for a protective innate immune response by neutrophils to *Citrobacter rodentium*. *J Immunol*. American Association of Immunologists; 2007;179(1):566–77.
 376. Cario E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun*. American Society for Microbiology; 2000;68(12):7010–7.
 377. Ortega-Cava CF, Ishihara S, Rumi M a K, Kawashima K, Ishimura N, Kazumori H, et al. Strategic compartmentalization of Toll-like receptor 4 in the mouse gut. *J Immunol*. 2003;170(8):3977–85.
 378. Maeda S, Hsu L-C, Liu H, Bankston LA, Iimura M, Kagnoff MF, et al. Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing. *Science* (80-). American Association for the Advancement of Science; 2005;307(5710):734–8.

379. Hart AL, Al-Hassi HO, Rigby RJ, Bell SJ, Emmanuel A V., Knight SC, et al. Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. Wiley; 2005;129(1):50–65.
380. Baumgart DC, Metzke D, Schmitz J, Scheffold A, Sturm A, Wiedenmann B, et al. Patients with active inflammatory bowel disease lack immature peripheral blood plasmacytoid and myeloid dendritic cells. *Gut*. BMJ Publishing Group; 2005;54(2):228–36.
381. Cruickshank SM, McVay LD, Baumgart DC, Felsburg PJ, Carding SR. Colonic epithelial cell mediated suppression of CD4 T cell activation. *Gut*. BMJ Publishing Group; 2004;53(5):678–84.
382. van de Wal Y, Corazza N, Allez M, Mayer LF, Iijima H, Ryan M, et al. Delineation of a CD1d-restricted antigen presentation pathway associated with human and mouse intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*. Elsevier; 2003 May 5;124(5):1420–31.
383. Heller F, Fuss IJ, Nieuwenhuis EE, Blumberg RS, Strober W. Oxazolone Colitis, a Th2 Colitis Model Resembling Ulcerative Colitis, Is Mediated by IL-13-Producing NK-T Cells. *Immunity*. Elsevier; 2002 Nov 11;17(5):629–38.
384. Fujino S, Andoh a, Bamba S, Ogawa a, Hata K, Araki Y, et al. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut*. BMJ Publishing Group; 2003;52(1):65–70.
385. Schmidt C, Giese T, Ludwig B, Mueller-Molaian I, Marth T, Zeuzem S, Meuer SC SA. Expression of interleukin-12-related cytokine transcripts in inflammatory bowel disease: elevated interleukin-23p19 and interleukin-27p28 in Crohn's disease but not in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2005;11(1):16–23.
386. Yen D, Cheung J, Scheerens H, Poulet F, McClanahan T, Mckenzie B, et al. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest*. 2006;116(5):1310–6.
387. Charo IF, Ranshoff RM. The many roles of chemokines and chemokines receptors in inflammation. *N Engl J Med*. Massachusetts Medical Society; 2006;354(6):610–21.
388. Goebel S, Huang M, Davis WC, Jennings M, Siahaan TJ, Alexander JS, et al. VEGF-A stimulation of leukocyte adhesion to colonic microvascular endothelium: implications for inflammatory bowel disease. *AmJPhysiol GastrointestLiver Physiol*. 2006;290(0193-1857 (Print)):G648–54.
389. Keshavarzian A, Banan A, Farhadi A, Komanduri S, Mutlu E, Zhang Y, et al. Increases in free radicals and cytoskeletal protein oxidation and nitration in the colon of patients with inflammatory bowel disease. *Gut*. 2003;52:720–8.
390. Leeb SN, Vogl D, Gunckel M, Kiessling S, Falk W, Goke M, et al. Reduced migration of fibroblasts in inflammatory bowel disease: role of inflammatory mediators and focal adhesion kinase. *Gastroenterology*. Wiley; 2003;125(5):1341–54.
391. Kirkegaard T, Hansen a, Bruun E, Brynskov J. Expression and localisation of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in fistulae of patients with Crohn's disease. *Gut*. BMJ Publishing Group; 2004;53(5):701–9.
392. Sparberg Marshall, Fennessy John KJ. Ulcerative proctitis and mild ulcerative colitis: A study of 220 patients. 1966. p. 391–412.
393. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med*. 1999;340(6):448–54.
394. Kotler DP. Cachexia. *Ann Intern Med*. 2000;133(8):622–34.
395. Dinarello C a. Cytokines as endogenous pyrogens. *J Infect Dis*. Oxford University Press;

- 1999;179 Suppl :S294–304.
396. Gasche C, Reinisch W, Lochs H, Parsaei B, Bakos S, Wyatt J, et al. Anemia in Crohn's disease. Importance of inadequate erythropoietin production and iron deficiency. *Dig Dis Sci.* 1994;39(9):1930–4.
 397. Dyer N. H DAM. Malnutrition and malabsorption in crohn's disease with reference to the effect of surgery. *Br J Surg.* 2005;60(2):134–40.
 398. C.C. J, X. G, M. Z, M. Z, J. T, H.W. C, et al. Anemia in Crohn's disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology.* Blackwell Publishing; 2013. p. 589–90.
 399. Gomollón F, Gisbert JP. Anemia and inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol.* 2009;15(37):4659–65.
 400. Schreiber S, Howaldt S, Schnoor M, Nikolaus S, Bauditz J, Gasché C, et al. Recombinant erythropoietin for the treatment of anemia in inflammatory bowel disease. *N Engl J Med.* Massachusetts Medical Society; 1996;334(10):619–23.
 401. Koury MJ, Bondurant MC. The Molecular Mechanism of Erythropoietin Action. *Eur J Biochem.* 1992;210(3):649–63.
 402. Gumaste V, Greenstein AJ, Meyers R, Sachar DB. Coombs-positive autoimmune hemolytic anemia in ulcerative colitis. *Dig Dis Sci.* 1989;34(9):1457–61.
 403. Bell DW, Urban E, Sears DA, Walder AI OV. Ulcerative colitis complicated by autoimmune hemolytic anemia. *South Med J.* 1981;74(3):359–61.
 404. Altman Alan R, Maltz Charles JHD. Autoimmune hemolytic anemia in ulcerative colitis. *Dig Dis Sci.* 1979;24(4):282–5.
 405. Heits F, Stahl M, Ludwig D, Stange EF, Jelkmann W. Elevated serum thrombopoietin and interleukin-6 concentrations in thrombocytosis associated with inflammatory bowel disease. *J Interferon Cytokine Res.* Liebert; 1999;19(7):757–60.
 406. Loftus E V., Tremaine WJ, Habermann TM, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. Risk of lymphoma in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* Nature Publishing Group; 2000;95(9):2308–12.
 407. Connell WR, Kamm MA, Dickson M, Balkwill AM, Ritchie JK, Lennard-Jones JE. Long-term neoplasia risk after azathioprine treatment in inflammatory bowel disease 83. *Lancet.* Elsevier; 1994 May 21;343(0140-6736 (Print)):1249–52.
 408. Caspi O, Polliack A, Klar R, Ben-Yehuda D. The association of inflammatory bowel disease and leukemia--coincidence or not? *Leuk Lymphoma.* Taylor & Francis; 1995 Apr 1;17(3-4):255–62.
 409. Gupta RB, Harpaz N, Itzkowitz S, Hossain S, Matula S, Kornbluth A, et al. Histologic inflammation is a risk factor for progression to colorectal neoplasia in ulcerative colitis: a cohort study. *Gastroenterology.* 2007;133(4):1099–105; quiz 1340–1.
 410. Itzkowitz SH, Harpaz N. Diagnosis and management of dysplasia in patients with inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology.* 2004;126(6):1634–48.
 411. Rutter M. Severity of inflammation is a risk factor for colorectal neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 2004. p. 451–9.
 412. Li Q, Withoff S, Verma IM. Inflammation-associated cancer: NF- κ B is the lynchpin. *Trends Immunol.* 2005;26(6):318–25.
 413. Jobin C, Sartor RB. The Ikappa B/NF-kappa B system: a key determinant of mucosal inflammation and protection. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000 Mar 1;278(3):C451–62.

414. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*. Nature Publishing Group; 1999;18(49):6853–66.
415. Grilli M, Chiu JJ, Lenardo MJ. NF-kappa B and Rel: participants in a multiform transcriptional regulatory system. *Int Rev Cytol*. Academic Press; 1993;143:1–62.
416. Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(10):725–34.
417. Siebenlist U, Brown K, Claudio E. Control of lymphocyte development by nuclear factor-kappaB. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(6):435–45.
418. Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. Structure, regulation and function of NF-kB. *Annu Rev Cell Biol*. Annual Reviews; 1994;10:405–55.
419. Baeuerle P a, Baltimore D. IκB: a specific inhibitor of the NF-κB transcription factor. *Sci* (Washington, DC, United States). American Association for the Advancement of Science; 1988;242(4878):540–6.
420. Cheng Q, Cant CA, Moll T, Hofer-Warbinek R, Wagner E, Birnstiel ML, et al. NF-κB subunit-specific regulation of the IκBα promoter. *J Biol Chem*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 269(18):13551–7.
421. Huxford T, Malek S GG. Structure and mechanism in NF-kappa B/I kappa B signaling. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1999;64:533–40.
422. Zandi E, Karin M. Bridging the Gap: Composition , Regulation, and Physiological Function of the IκB Kinase Complex. *Mol Cell Biol*. 1999;19(7):4547–51.
423. Tak PP, Firestein GS, Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest*. 2001;107(1):7–11.
424. Greten FR, Karin M. The IKK/NF-kappaB activation pathway-a target for prevention and treatment of cancer. *Cancer Lett*. Elsevier; 2004;206(2):193–9.
425. DiDonato J, Mercurio F, Rosette C, Wu-Li J, Suyang H, Ghosh S, et al. Mapping of the inducible IκB phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. *Mol Cell Biol*. American Society for Microbiology; 1996;16(4):1295–304.
426. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets Ubiquitination: The Control of NF-kappaB Activity. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:621–63.
427. Senftleben U, Cao Y, Xiao G, Greten F, Krähn G, Bonizzi G, et al. Activation by IKKα of a second, evolutionary conserved, NF-κB signaling pathway. *Science* (80-). American Association for the Advancement of Science; 2001;293(5534):1495–9.
428. Xiao G, Harhaj EW, Sun S-C. NF-κB-Inducing Kinase Regulates the Processing of NF-κB2 p100. *Mol Cell*. Elsevier; 2001 Feb 2;7(2):401–9.
429. Dejardin E. The alternative NF-κB pathway from biochemistry to biology: Pitfalls and promises for future drug development. *Biochem Pharmacol*. Elsevier; 2006;72(9 SPEC. ISS.):1161–79.
430. Neurath MF, Pettersson S, Meyer zum Buschenfelde K-H, Strober W. Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotide to the p65 subunit of NF-κB abrogates established experimental colitis in mice. *Nat Med*. 1996;2(998-1004).
431. Herfarth H, Brand K, Rath HC, Rogler G, Scholmerich J, Falk W. Nuclear factor-κB activity and intestinal inflammation in dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice is suppressed by gliotoxin. *Clin Exp Immunol*. 2000;120(1):59–65.
432. Pasparakis M. Regulation of tissue homeostasis by NF-kappaB signalling: implications for inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol*. Nature Publishing Group; 2009;9(11):778–88.

433. Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol.* 2002;3(3):221–7.
434. Broom OJ, Widjaya B, Troelsen J, Olsen J, Nielsen OH. Mitogen activated protein kinases: a role in inflammatory bowel disease? *Clin Exp Immunol.* Blackwell; 2009;158(3):272–80.
435. Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu BE, et al. MAP Kinases. *Chem Rev.* 2001;101(8):2449–76.
436. Coulombe P, Meloche S. Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochim Biophys Acta.* Elsevier; 2007;1773(8):1376–87.
437. Brown MD, Sacks DB. Compartmentalised MAPK pathways. *Handb Exp Pharmacol.* Springer; 2008;186:205–35.
438. Yoshioka K. Scaffold proteins in mammalian MAP kinase cascades. *J Biochem.* 2004;135(6):657–61.
439. Jeffrey KL, Camps M, Rommel C, Mackay CR. Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6(May 2007):391–403.
440. Woo C, Massett MP, Shishido T, Itoh S, Ding B, McClain C, et al. ERK5 Activation Inhibits Inflammatory Responses via Peroxisome Proliferator-activated Receptor α (PPAR α) Stimulation *. *J Biol Chem.* American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2006;281(43):32164–74.
441. Roviola E, Spinelli E, Sdelci S, Barbetti V, Morandi A, Giuntoli S, et al. ERK5/BMK1 is indispensable for optimal colony-stimulating factor 1 (CSF-1)-induced proliferation in macrophages in a Src-dependent fashion. *J Immunol.* American Association of Immunologists; 2008;180(6):4166–72.
442. Delaney J, Chiarello R, Villar D, Kandalam U, Castejon AM CM. Regulation of c-fos, c-jun and c-myc gene expression by angiotensin II in primary cultured rat astrocytes: role of ERK1/2 MAP kinases. *Neurochem Res.* 2008;33(3):545–50.
443. Grund EM, Spyropoulos DD, Watson DK, Muise-Helmericks RC. Interleukins 2 and 15 regulate Ets1 expression via ERK1/2 and MNK1 in human natural killer cells. *J Biol Chem.* American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2005;280(6):4772–8.
444. Guha M, O’Connell M a., Pawlinski R, Hollis A, McGovern P, Yan SF, et al. Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor α expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression. *Blood.* 2001;98(5):1429–39.
445. Caruso R, Fina D, Peluso I, Stolfi C, Fantini MC, Gioia V, et al. A functional role for interleukin-21 in promoting the synthesis of the T-cell chemoattractant, MIP-3alpha, by gut epithelial cells. *Gastroenterology.* Elsevier; 2007 Jan 1;132(1):166–75.
446. Kwon KH, Ohigashi H MA. Dextran sulfate sodium enhances interleukin-1 beta release via activation of p38 MAPK and ERK1/2 pathways in murine peritoneal macrophages. *Life Sci.* 2007;81(5):362–71.
447. Garat C AW. Intracellular IL-1Ra type 1 inhibits IL-1-induced IL-6 and IL-8 production in Caco-2 intestinal epithelial cells through inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB pathways. *Cytokine.* 2003;23((1-2)):31–40.
448. Hollenbach E, Neumann M, Vieth M, Roessner A, Malfertheiner P, Naumann M. Inhibition of p38 MAP kinase- and RICK/NF-kappaB-signaling suppresses inflammatory bowel disease. *FASEB J.* 2004 Oct 1;18(13):1550–2.
449. Rowlett RM, Chrestensen C a, Nyce M, Harp MG, Pelo JW, Cominelli F, et al. MNK kinases

- regulate multiple TLR pathways and innate proinflammatory cytokines in macrophages. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. American Physiological Society; 2008;294(2):G452–9.
450. J.F. Schindler, J.B. Monahan WGS. P38 Pathway Kinases As Antiinflammatory Drug Targets. *J Dent Res*. International Association for Dental Research; 2007;86(9):800–11.
 451. Saklatvala J. The p38 MAP kinase pathway as a therapeutic target in inflammatory disease. *Curr Opin Pharmacol*. 2004;4(4):372–7.
 452. Wang M-L, Shin ME, Knight P a, Artis D, Silberg DG, Suh E, et al. Regulation of RELM/FIZZ isoform expression by Cdx2 in response to innate and adaptive immune stimulation in the intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;288(5):G1074–83.
 453. Hollenbach E, Vieth M, Roessner A, Neumann M, Malfertheiner P, Naumann M. Inhibition of RICK/Nuclear Factor- κ B and p38 Signaling Attenuates the Inflammatory Response in a Murine Model of Crohn Disease. *J Biol Chem*. 2005;280(15):14981–8.
 454. Roy PK, Rashid F, Bragg J, Ibdah J a. Role of the JNK signal transduction pathway in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2008;14(2):200–2.
 455. Aud D PS. Mechanisms of disease: Transcription factors in inflammatory arthritis. *Nat Clin Pr Rheumatol*. 2006;2(8):434–42.
 456. Novotny V, Prieschl EE, Csonga R, Fabjani G, Baumruker T. Nrf1 in a complex with fosB, c-jun, junD and ATF2 forms the AP1 component at the TNF alpha promoter in stimulated mast cells. *Nucleic Acids Res*. 1998;26(23):5480–5.
 457. Schmeck B, Moog K, Zahlten J, van Laak V, N'Guessan PD, Opitz B, et al. Streptococcus pneumoniae induced c-Jun-N-terminal kinase- and AP-1 -dependent IL-8 release by lung epithelial BEAS-2B cells. *Respir Res*. 2006;7:98.
 458. Zenz R, Eferl R, Scheinecker C, Redlich K, Smolen J, Schonhaler HB, et al. Activator protein 1 (Fos/Jun) functions in inflammatory bone and skin disease. *Arthritis Res Ther*. 2008;10(1):201.
 459. Wirtz S, Neurath MF. Mouse models of inflammatory bowel disease. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59(11):1073–83.
 460. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A Novel Method in the Induction of Reliable Experimental Acute and Chronic Ulcerative Colitis in Mice. *Gastroenterology*. 1990;98(3):694–702.
 461. Wirtz S, Neufert C, Weigmann B, Neurath MF. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc*. 2007;2(3):541–6.
 462. Dieleman L a, Ridwan BU, Tennyson GS, Beagley KW, Bucy RP, Elson CO. Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. *Gastroenterology*. 1994;107(6):1643–52.
 463. Tanaka T, Kohno H, Suzuki R, Yamada Y, Sugie S, Mori H. A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci*. Blackwell; 2003;94(11):965–73.
 464. Dieleman L a., Palmén MJHJ, Akol H, Bloemena E, Peña a. S, Meuwissen SGM, et al. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol*. 1998;114(3):385–91.
 465. Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology*. 1989;96(3):795–803.

466. Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Stüber E, Strober W. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med.* Rockefeller University Press; 1995;182(5):1281–90.
467. Fichtner-Feigl S, Fuss IJ, Preiss JC, Strober W, Kitani A. Treatment of murine Th1- and Th2-mediated inflammatory bowel disease with NF- κ B decoy oligonucleotides. *J Clin Invest.* American Society for Clinical Investigation; 2005;115(11):3057–71.
468. Elson CO, Beagley KW, Sharmanov a T, Fujihashi K, Kiyono H, Tennyson GS, et al. Hapten-induced model of murine inflammatory bowel disease: mucosa immune responses and protection by tolerance. *J Immunol.* American Association of Immunologists; 1996;157(5):2174–85.
469. Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Presky DH, Waegell W, Strober W. Experimental granulomatous colitis in mice is abrogated by induction of TGF-beta-mediated oral tolerance. *J Exp Med.* Rockefeller University Press; 1996;183(6):2605–16.
470. Morrissey PJ, Charrier K, Braddy S, Liggitt D, Watson JD. CD4+ 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+ T cells. *J Exp Med.* 1993;178(1):237–44.
471. Powrie F, Leach MW, Mauze S, Caddle LB, Coffman RL. Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *Int Immunol.* 1993;5(11):1461–71.
472. Mudter J, Wirtz S, Galle PR, Neurath MF. A new model of chronic colitis in SCID mice induced by adoptive transfer of CD62L+ CD4+ T cells: insights into the regulatory role of interleukin-6 on apoptosis. *Pathobiology.* Karger; 2002;70(3):170–6.
473. Powrie F, Leach MW, Mauze S, Menon S, Barcomb Caddle L, Coffman RL. Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. *Immunity.* Elsevier; 1994 Oct 10;1(7):553–62.
474. Budhu A, Ji J, Wang XW. The clinical potential of microRNAs. *J Hematol Oncol.* 2010;3(Table 1):37.
475. Rebane A, Akdis C a. MicroRNAs in allergy and asthma. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2014;14(4):424.
476. Thirion M, Ochiya T. Roles of microRNAs in the hepatitis B virus infection and related diseases. *Viruses.* 2013;5(11):2690–703.
477. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Nonlinear partial differential equations and applications: Frequent deletions and down-regulation of microRNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci.* 2002;99(24):15524–9.
478. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio M V, Ferracin M, Shimizu M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(39):13944–9.
479. Jiang X, Wang X. Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 2004;73:87–106.
480. Cory S, Huang DCS, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene.* 2003;22(53):8590–607.
481. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell.* 2005;120(5):635–47.
482. Welch C, Chen Y, Stallings RL. MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncogene.* 2007;26(34):5017–22.

483. Tazawa H, Tsuchiya N, Izumiya M, Nakagama H. Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(39):15472–7.
484. Mendell JT. miRiad Roles for the miR-17-92 Cluster in Development and Disease. *Cell*. 2008;133(2):217–22.
485. Petrocca F, Visone R, Onelli MR, Shah MH, Nicoloso MS, de Martino I, et al. E2F1-regulated microRNAs impair TGFbeta-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. *Cancer Cell*. 2008;13(3):272–86.
486. Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisawa K, Tomida S, et al. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res*. 2005;65(21):9628–32.
487. He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*. 2005;435(7043):828–33.
488. Woods K, Thomson JM, Hammond SM. Direct regulation of an oncogenic micro-RNA cluster by E2F transcription factors. *J Biol Chem*. 2007;282(4):2130–4.
489. An E2F-miR-20a Autoregulatory Feedback Loop.pdf.
490. Liu J, Zheng M, Tang Y, Liang X, Yang Q. microRNAs, an active and versatile group in cancers. *Int J Oral Sci*. 2011;3(4):165–75.
491. Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*. 2007;133(2):647–58.
492. Frankel LB, Christoffersen NR, Jacobsen A, Lindow M, Krogh A, Lund AH. Programmed Cell Death 4 (PDCD4) Is an Important Functional Target of the MicroRNA miR-21 in Breast Cancer Cells. *J Biol Chem*. 2008;283(2):1026–33.
493. Vigorito E, Perks KL, Abreu-Goodger C, Bunting S, Xiang Z, Kohlhaas S, et al. microRNA-155 Regulates the Generation of Immunoglobulin Class-Switched Plasma Cells. *Immunity*. 2007;27(6):847–59.
494. Voorhoeve PM, Sage C Le, Schrier M, Gillis AJM, Stoop H, Nagel R, et al. A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Adv Exp Med Biol*. 2007;604:17–46.
495. Li M, Marin-Muller C, Bharadwaj U, Chow KH, Yao Q, Chen C. MicroRNAs: control and loss of control in human physiology and disease. *World J Surg*. 2009;33(4):667–84.
496. Garzon R, Fabbri M, Cimmino A, Calin G a., Croce CM. MicroRNA expression and function in cancer. *Trends Mol Med*. 2006;12(12):580–7.
497. Wu W, Sun M, Zou G-M, Chen J. MicroRNA and cancer: Current status and prospective. *Int J Cancer*. 2007;120(5):953–60.
498. Macfarlane L-A, Murphy PR. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics*. 2010;11(7):537–61.
499. Taganov KD, Boldin MP, Chang K-J, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(33):12481–6.
500. O’Connell RM, Rao DS, Chaudhuri A a, Boldin MP, Taganov KD, Nicoll J, et al. Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder. *J Exp Med*. 2008;205(3):585–94.
501. Bazzoni F, Rossato M, Fabbri M, Gaudiosi D, Mirolo M, Mori L, et al. Induction and

- regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to proinflammatory signals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(13):5282–7.
502. Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(30):10513–8.
503. Brase JC, Wuttig D, Kuner R, Sültmann H. Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer. *Mol Cancer*. BioMed Central Ltd; 2010;9(1):306.
504. Neilson JR, Zheng GXY, Burge CB, Sharp PA. Dynamic regulation of miRNA expression in ordered stages of cellular development. *Genes Dev*. 2007;21(5):578–89.
505. Wu H, Neilson JR, Kumar P, Manocha M, Shankar P, Sharp PA, et al. miRNA profiling of naïve, effector and memory CD8 T cells. *PLoS One*. 2007;2(10):e1020.
506. Pauley KM, Cha S, Chan EKL. MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases. *J Autoimmun*. 2009;32(3-4):189–94.
507. Dai R, Ahmed SA. MicroRNA, a new paradigm for understanding immunoregulation, inflammation, and autoimmune diseases. *Transl Res*. Mosby, Inc.; 2011;157(4):163–79.
508. Claudia. Fulci VC, Macino G. MicroRNAs: novel regulators of immunity. *Autoimmun Rev*. 2009;8(6):520–4.
509. Sonkoly E, Pivarcsi A. Advances in microRNAs: implications for immunity and inflammatory diseases. *J Cell Mol Med*. 2008;13(1):24–38.
510. O’Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Baltimore D. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol*. Nature Publishing Group; 2010;10(2):111–22.
511. Brooks WH, Le Dantec C, Pers JO, Youinou P, Renaudineau Y. Epigenetics and autoimmunity. *J Autoimmun*. Elsevier Ltd; 2010;34(3):J207–19.
512. Stanczyk J, Pedrioli DML, Brentano F, Sanchez-Pernaute O, Kolling C, Gay RE, et al. Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2008;58(4):1001–9.
513. Li J, Wan Y, Guo Q, Zou L, Zhang J, Fang Y, et al. Altered microRNA expression profile with miR-146a upregulation in CD4+ T cells from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(3):R81.
514. Niimoto T, Nakasa T, Ishikawa M, Okuhara A, Izumi B, Deie M, et al. MicroRNA-146a expresses in interleukin-17 producing T cells in rheumatoid arthritis patients. *BMC Musculoskelet Disord*. 2010;11:209.
515. Boštjančič E, Glavač D. Importance of microRNAs in skin morphogenesis and diseases. *Acta Dermatovenerologica Alpina, Pannonica Adriat*. 2008;17(3):95–102.
516. Tang Y, Luo X, Cui H, Ni X, Yuan M, Guo Y, et al. MicroRNA-146a contributes to abnormal activation of the type I interferon pathway in human lupus by targeting the key signaling proteins. *Arthritis Rheum*. 2009;60(4):1065–75.
517. Roggli E, Britan A, Gattesco S, Lin-Marq N, Abderrahmani A, Meda P, et al. Involvement of microRNAs in the cytotoxic effects exerted by proinflammatory cytokines on pancreatic B-cells. *Diabetes*. 2010;59(4):978–86.
518. O’Connell RM, Rao DS, Baltimore D. microRNA regulation of inflammatory responses. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:295–312.
519. Xiao C, Rajewsky K. MicroRNA Control in the Immune System: Basic Principles. *Cell*. 2009;136(1):26–36.

520. Wu F, Zikusoka M, Trindade A, Dassopoulos T, Harris ML, Bayless TM, et al. MicroRNAs Are Differentially Expressed in Ulcerative Colitis and Alter Expression of Macrophage Inflammatory Peptide-2 α . *Gastroenterology*. 2008;135:1624–35.
521. Takagi T, Naito Y, Mizushima K, Hirata I, Yagi N, Tomatsuri N, et al. Increased expression of microRNA in the inflamed colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010;25 Suppl 1(Table 1):S129–33.
522. Fasseu M, Tréton X, Guichard C, Pedruzzi E, Cazals-Hatem D, Richard C, et al. Identification of Restricted Subsets of Mature microRNA Abnormally Expressed in Inactive Colonic Mucosa of Patients with Inflammatory Bowel Disease. *PLoS One*. 2010;5(10):e13160.
523. Wu F, Zhang S, Dassopoulos T, Harris ML, Bayless TM, Meltzer SJ, et al. Identification of microRNAs associated with ileal and colonic Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16(10):1729–38.
524. Wu F, Guo NJ, Tian H, Kwon JH. Peripheral blood microRNAs distinguish active ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2012;17(1):241–50.
525. Dalal SR, Kwon JH. The role of microRNA in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Hepatol*. 2010;6(11):714–22.
526. Zahm AM, Hand NJ, Tsoucas DM, Le Guen CL, Baldassano RN, Friedman JR. Rectal microRNAs are perturbed in pediatric inflammatory bowel disease of the colon. *J Crohns Colitis*. European Crohn's and Colitis Organisation; 2014;
527. Eaden J a, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*. 2001;48(4):526–35.
528. Rogler G. Chronic ulcerative colitis and colorectal cancer. *Cancer Lett*. Elsevier Ireland Ltd; 2014;345(2):235–41.
529. Oлару A V, Selaru FM, Mori Y, Vazquez C, David S, Paun B, et al. Dynamic changes in the expression of MicroRNA-31 during inflammatory bowel disease-associated neoplastic transformation. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17(1):221–31.
530. Sonkoly E, Ståhle M, Pivarcsi A. MicroRNAs and immunity: Novel players in the regulation of normal immune function and inflammation. *Semin Cancer Biol*. 2008;18(2):131–40.
531. Garrett WS, Gordon JI, Glimcher LH. Homeostasis and Inflammation in the Intestine. *Cell*. 2010. p. 859–70.
532. Dekkers JF, Wiegerinck CL, de Jonge HR, de Jong NWM, Bijvelds MJC, Nieuwenhuis EES, et al. A functional CFTR assay using primary cystic fibrosis intestinal organoids. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2012. p. S32.
533. Krawisz J, Sharon P, Stenson W. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology*. 1984;87 (6):1344–50.
534. Bessey OA, Lowry OH, Brock MJ. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J Biol Chem*. 1946;164(1):321–9.
535. Sanchez De Medina F, Martinez-Augustin O, Gonzalez R, Ballester I, Nieto A, Galvez J, et al. Induction of alkaline phosphatase in the inflamed intestine: A novel pharmacological target for inflammatory bowel disease. *Biochem Pharmacol*. 2004;68(12):2317–26.
536. Kerr T a, Ciorba M a, Matsumoto H, Davis VRT, Luo J, Kennedy S, et al. Dextran sodium sulfate inhibition of real-time polymerase chain reaction amplification: A poly-A purification solution. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;18(14489):1–5.

537. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods*. 2001;25(4):402–8.
538. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*. Nature Publishing Group; 2012;491(7422):119–24.
539. Brest P, Lapaquette P, Souidi M, Lebrigand K, Cesaro A, Vouret-Craviari V, et al. A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease. *Nat Genet*. Nature Publishing Group; 2011;43(3):242–5.
540. Brain O, Owens BMJ, Pichulik T, Allan P, Khatamzas E, Leslie A, et al. The intracellular sensor NOD2 induces microrna-29 expression in human dendritic cells to limit IL-23 release. *Immunity*. 2013;39(3):521–36.
541. Van Beers EH, Al RH, Rings EH, Einerhand a W, Dekker J, Büller H a. Lactase and sucrase-isomaltase gene expression during Caco-2 cell differentiation. *Biochem J*. 1995;308 (Pt 3):769–75.
542. Williams AE, Perry MM, Moschos S a, Larner-Svensson HM, Lindsay M a. Role of miRNA-146a in the regulation of the innate immune response and cancer. *Biochem Soc Trans*. 2008;36(Pt 6):1211–5.
543. Boldin MP, Taganov KD, Rao DS, Yang L, Zhao JL, Kalwani M, et al. miR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice. *J Exp Med*. 2011;208(6):1189–201.
544. Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1995;109(4):1344–67.
545. Sanchez De Medina F, Vera B, Galvez J, Zarzuelo A. Effect of quercitrin on the early stages of hapten induced colonic inflammation in the rat. *Life Sci*. 2002;70(26):3097–108.
546. Sánchez de Medina F, Gálvez J, Romero JA, Zarzuelo A. Effect of quercitrin on acute and chronic experimental colitis in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 1996;278(2):771–9.
547. Mascaraque C, González R, Suárez MD, Zarzuelo A, Sánchez de Medina F, Martínez-Augustín O. Intestinal anti-inflammatory activity of apigenin K in two rat colitis models induced by trinitrobenzenesulfonic acid and dextran sulphate sodium. *Br J Nutr*. 2015;113(04):618–26.
548. López-Posadas R, González R, Ballester I, Martínez-Moya P, Romero-Calvo I, Suárez MD, et al. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase is activated in enterocytes by oxidative stress via changes in glycosylation. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17(2):543–56.
549. Kim HS, Berstad A. Experimental colitis in animal models. *Scand J Gastroenterol*. 1992;27(7):529–37.
550. Mascaraque C, González R, Suárez MD, Zarzuelo A, Sánchez de Medina F, Martínez-Augustín O. Intestinal anti-inflammatory activity of apigenin K in two rat colitis models induced by trinitrobenzenesulfonic acid and dextran sulphate sodium. *Br J Nutr*. 2015;113(4):618–26.
551. Runtsch MC, Hu R, Alexander M, Wallace J, Kagele D, Petersen C, et al. MicroRNA-146a constrains multiple parameters of intestinal immunity and increases susceptibility to DSS colitis. *Oncotarget*. 2015;6(30):28556–72.
552. Garrido-Mesa J, Algieri F, Rodriguez-Nogales A, Utrilla MP, Rodriguez-Cabezas ME, Zarzuelo A, et al. A new therapeutic association to manage relapsing experimental colitis: Doxycycline plus *Saccharomyces boulardii*. *Pharmacol Res*. Academic Press; 2015;97:48–

63.

553. Schreiner B, Heppner FL, Becher B. Modeling multiple sclerosis in laboratory animals. *Seminars in Immunopathology*. 2009. p. 479–95.
554. Elson CO, Cong Y, Iqbal N, Weaver CT. Immuno-bacterial homeostasis in the gut: new insights into an old enigma. *Semin Immunol*. 2001;13(3):187–94.
555. Akbarali HI, Pothoulakis C, Castagliuolo I. Altered ion channel activity in murine colonic smooth muscle myocytes in an experimental colitis model. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;275(2):637–42.
556. Li J, McRoberts JA, Ennes HS, Trevisani M, Nicoletti P, Mittal Y, et al. Experimental colitis modulates the functional properties of NMDA receptors in dorsal root ganglia neurons. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006 Aug 1;291(2):G219–28.
557. Lomax AE, O'Hara JR, Hyland NP, Mawe GM, Sharkey K a. Persistent alterations to enteric neural signaling in the guinea pig colon following the resolution of colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;292(2):G482–91.
558. Delgado ME, Grabinger T, Brunner T. Cell death at the intestinal epithelial front line. *FEBS J*. 2015;1–19.
559. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res*. 2004;64(11):3753–6.
560. Büsling I, Slack FJ, Großhans H. let-7 microRNAs in development, stem cells and cancer. *Trends in Molecular Medicine*. 2008. p. 400–9.
561. Yong SL, Dutta A. The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev*. 2007;21(9):1025–30.
562. Madison BB, Jeganathan AN, Mizuno R, Winslow MM, Castells A, Cuatrecasas M, et al. Let-7 Represses Carcinogenesis and a Stem Cell Phenotype in the Intestine via Regulation of Hmga2. *PLoS Genet*. Public Library of Science; 2015;11(8).
563. Aqeilan RI, Calin GA, Croce CM. miR-15a and miR-16-1 in cancer: discovery, function and future perspectives. *Cell Death Differ*. 2010;17(2):215–20.
564. Pekarsky Y, Croce CM. Role of miR-15/16 in CLL. *Cell death and differentiation*. 2014. p. 1–6.
565. Lovat F, Fassan M, Gasparini P, Rizzotto L, Cascione L, Pizzi M, et al. miR-15b/16-2 deletion promotes B-cell malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(37):11636–41.
566. Li C, Gao Y, Zhang K, Chen J, Han S, Feng B, et al. Multiple Roles of MicroRNA-100 in Human Cancer and its Therapeutic Potential. *Cell Physiol Biochem*. 2015;2143–59.
567. Chen J, Zhang K, Xu Y, Gao Y, Li C, Wang R, et al. The role of microRNA-26a in human cancer progression and clinical application. *Tumor Biol*. 2016;1–14.
568. Fan W, Huang J, Xiao H, Liang Z. MicroRNA-22 is downregulated in clear cell renal cell carcinoma, and inhibits cell growth, migration and invasion by targeting PTEN. *Mol Med Rep*. Spandidos Publications; 2016 Jun 1;13(6):4800–6.
569. Chen J, Wang M, Guo M, Xie Y, Cong YS. miR-127 regulates cell proliferation and senescence by targeting BCL6. *PLoS One*. 2013;8(11).
570. Huan L, Bao C, Chen D, Li Y, Lian J, Ding J, et al. MiR-127-5p targets the biliverdin reductase B/NF-kappaB pathway to suppress cell growth in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Sci*. 2015;

571. Shi L, Cheng Z, Zhang J, Li R, Zhao P, Fu Z, et al. hsa-mir-181a and hsa-mir-181b function as tumor suppressors in human glioma cells. *Brain Res.* 2008;1236:185–93.
572. He S, Zeng S, Zhou Z-W, He Z-X, Zhou S-F. Hsa-microRNA-181a is a regulator of a number of cancer genes and a biomarker for endometrial carcinoma in patients: a bioinformatic and clinical study and the therapeutic implication. *Drug Des Devel Ther.* Dove Press; 2015 Jan 18;9:1103–75.
573. Karaayvaz M, Pal T, Song B, Zhang C, Georgakopoulos P, Mehmood S, et al. Prognostic significance of miR-215 in colon cancer. *Clin Colorectal Cancer.* Elsevier Inc.; 2011;10(4):340–7.
574. Chen XP, Chen YG, Lan JY, Shen ZJ. MicroRNA-370 suppresses proliferation and promotes endometrioid ovarian cancer chemosensitivity to cDDP by negatively regulating ENG. *Cancer Lett.* Elsevier Ireland Ltd; 2014;353(2):201–10.
575. Li B, Wang Y, Li S, He H, Sun F, Wang C, et al. Decreased expression of miR-378 correlates with tumor invasiveness and poor prognosis of patients with glioma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(6):7016–21.
576. Fogh J, Trempe G. *Human Tumor Cells in Vitro.* In: Fogh J, editor. Boston, MA: Springer US; 1975. p. 115–59.
577. Rao PK, Missiaglia E, Shields L, Hyde G, Yuan B, Shepherd CJ, et al. Distinct roles for miR-1 and miR-133a in the proliferation and differentiation of rhabdomyosarcoma cells. *FASEB J.* 2010;24(9):3427–37.
578. Diosdado B, van de Wiel M a, Terhaar Sive Droste JS, Mongera S, Postma C, Meijerink WJHJ, et al. MiR-17-92 cluster is associated with 13q gain and c-myc expression during colorectal adenoma to adenocarcinoma progression. *Br J Cancer.* Nature Publishing Group; 2009;101(4):707–14.
579. Knudsen KN, Nielsen BS, Lindebjerg J, Hansen TF, Holst R, Sørensen FB. MicroRNA-17 is the most up-regulated member of the miR-17-92 cluster during early colon cancer evolution. *PLoS One.* Public Library of Science; 2015;10(10).
580. Dar AA, Majid S, Rittsteuer C, De Semir D, Bezrookove V, Tong S, et al. The Role of miR-18b in MDM2-p53 Pathway Signaling and Melanoma Progression. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105(6):433–42.
581. Kim H-Y, Kwon HY, Ha Thi HT, Lee HJ, Kim G Il, Hahm K-B, et al. MicroRNA-132 and microRNA-223 control positive feedback circuit by regulating FOXO3a in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2016;n/a – n/a.
582. Ogawa H, Wu X, Kawamoto K, Nishida N, Konno M, Koseki J, et al. MicroRNAs induce epigenetic reprogramming and suppress malignant phenotypes of human colon cancer cells. *PLoS One.* 2015;10(5).
583. Rokavec M, Jenner MG, Hermeking H. Inflammation-induced epigenetic switches in cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences.* Birkhauser Verlag AG; 2016. p. 23–39.
584. Sathe A, Ayyar K, Reddy KVR. MicroRNA let-7 in the spotlight: Role in innate immunity. *Inflamm Cell Signal.* 2014;1–10.
585. Wang DJ, Legesse-Miller A, Johnson EL, Collier HA. Regulation of the let-7a-3 promoter by NF- κ B. *PLoS One.* 2012;7(2).
586. Iliopoulos D, Hirsch HA, Struhl K. An Epigenetic Switch Involving NF- κ B, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 Links Inflammation to Cell Transformation. *Cell.* 2009;139(4):693–706.
587. Svrcek M, El-Murr N, Wanherdrick K, Dumont S, Beaugerie L, Cosnes J, et al. Overexpression of microRNAs-155 and 21 targeting mismatch repair proteins in

- inflammatory bowel diseases. *Carcinogenesis*. 2013;34(4):828–34.
588. Yi R, Li Y, Wang F, Miao G, Qi R, Zhao Y. Global view MicroRNAs as diagnostic and prognostic biomarkers in colorectal cancer. 2016;8(4):330–40.
589. Staedel C, Darfeuille F. MicroRNAs and bacterial infection. *Cell Microbiol*. 2013;15(9):1496–507.
590. Sheedy FJ. Turning 21: Induction of miR-21 as a key switch in the inflammatory response. *Frontiers in Immunology*. Frontiers Research Foundation; 2015.
591. Wan J, Xia L, Xu W, Lu N. Expression and Function of miR-155 in Diseases of the Gastrointestinal Tract. *Int J Mol Sci*. 2016;17(5):709.
592. Pathak S, Grillo AR, Scarpa M, Brun P, D’Inca R, Nai L, et al. MiR-155 modulates the inflammatory phenotype of intestinal myofibroblasts by targeting SOCS1 in ulcerative colitis. *Exp Mol Med*. KSBMB.; 2015;47:e164.
593. Williams AE, Perry MM, Moschos S a, Larner-Svensson HM, Lindsay M a. Role of miRNA-146a in the regulation of the innate immune response and cancer. *Biochem Soc Trans*. 2008;36(Pt 6):1211–5.
594. Iyer A, Zurolo E, Prabowo A, Fluiter K, Spliet WGM, van Rijen PC, et al. MicroRNA-146a: A Key Regulator of Astrocyte-Mediated Inflammatory Response. *PLoS One*. 2012;7(9).
595. Zhao JL, Rao DS, O’Connell RM, Garcia-Flores Y, Baltimore D. MicroRNA-146a acts as a guardian of the quality and longevity of hematopoietic stem cells in mice. *Elife*. 2013;2013(2).
596. Boldin MP, Taganov KD, Rao DS, Yang L, Zhao JL, Kalwani M, et al. miR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice. *J Exp Med*. 2011;208(6):1189–201.
597. Lochhead RB, Ma Y, Zachary JF, Baltimore D, Zhao JL, Weis JH, et al. MicroRNA-146a Provides Feedback Regulation of Lyme Arthritis but Not Carditis during Infection with *Borrelia burgdorferi*. *PLoS Pathog*. Public Library of Science; 2014;10(6).
598. Zhao JL, Rao DS, Boldin MP, Taganov KD, O’Connell RM, Baltimore D. NF-kappaB dysregulation in microRNA-146a-deficient mice drives the development of myeloid malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(22):9184–9.
599. Low D, Nguyen DD, Mizoguchi E. Animal models of ulcerative colitis and their application in drug research. *Drug Design, Development and Therapy*. 2013. p. 1341–56.
600. Beck, PL; Morris, GP; Wade AW; Szewczuk, M and Wallance J. Immunological manipulation of disease progression in a rat model of chronic inflammatory disease of the colon. *Inflamm bowel Dis Curr status Futur approach*, Ed by RP MacDermontt Amsterdam Elsevier Sci Publ BV. 1988;201–6.
601. Appleyard CB, Wallace JL. Reactivation of hapten-induced colitis and its prevention by anti-inflammatory drugs. *Am J Physiol*. 1995;269(1 Pt 1):G119–25.
602. Solomon L, Mansor S, Mallon P, Donnelly E, Hoper M, Loughrey M, et al. The dextran sulphate sodium (DSS) model of colitis: An overview. *Comparative Clinical Pathology*. 2010. p. 235–9.
603. Mascaraque C, Aranda C, Oc??n B, Monte MJ, Su??rez MD, Zarzuelo A, et al. Rutin has intestinal antiinflammatory effects in the CD4+ CD62L+ T cell transfer model of colitis. *Pharmacol Res*. Academic Press; 2014;90:48–57.
604. Ostanin D V, Bao J, Koboziev I, Gray L, Robinson-Jackson S a, Kosloski-Davidson M, et al. T cell transfer model of chronic colitis: concepts, considerations, and tricks of the trade. *Am*

J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2009;296(2):G135–46.

605. Nahid M, Satoh M, Chan E. Interleukin 1 β -Responsive MicroRNA-146a Is Critical for the Cytokine-Induced Tolerance and Cross-Tolerance to Toll-Like Receptor Ligands. *J Innate Immun.* 2015;7(4):428–40.
606. Chassin C, Kocur M, Pott J, Duerr CU, Gutle D, Lotz M, et al. MiR-146a mediates protective innate immune tolerance in the neonate intestine. *Cell Host Microbe.* 2010;8(4):358–68.