

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**FACULTAD DE FARMACIA**

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II

**Programa Oficial de Posgrado en Biomedicina**



**Papel del receptor de glucocorticoides NR3C1 en el  
epitelio intestinal.**

Tesis doctoral para aspirar al grado de doctor presentada por

**Carlos José Aranda Clemente**

Bajo la dirección de los Doctores

Fermín Sánchez de Medina López-Huertas

Olga Martínez Augustin

**Granada, 2017**

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Carlos José Aranda Clemente  
ISBN: 978-84-9163-151-4  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/45490>



D. Alberto Vargas Morales, Director del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, certifica que la tesis doctoral titulada: "Papel del receptor de glucocorticoides NR3C1 en el epitelio intestinal", ha sido realizada por el Ldo. En Farmacia Carlos José Aranda Clemente.

Y los efectos legales que correspondan se firma la siguiente constancia en Granada a 8 de febrero de 2017.

Dr. Alberto Vargas Morales



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

En Granada a 8 de febrero de 2017

Directores de la tesis:

Fdo.: Fermín Sánchez de Medina López-Huertas

Fdo.: Olga Martínez Augustin

Doctorando,

Fdo.: Carlos José Aranda Clemente



*A mis padres*





*“Si alguien quiere ser grande,  
que se ponga al servicio de los demás”*

*Mateo 20, 26*







# ÍNDICE



ÍNDICE.....	15
SUMMARY.....	21
<b>1 Introduction.....</b>	<b>23</b>
<b>2 Material and methods.....</b>	<b>24</b>
<b>3 Aims.....</b>	<b>24</b>
<b>4 Results and discussion.....</b>	<b>25</b>
<b>5 Conclusions.....</b>	<b>27</b>
INTRODUCCIÓN.....	29
<b>1 Glucocorticoides.....</b>	<b>31</b>
1.1 Historia.....	31
1.2 Síntesis, liberación y regulación de los corticoides endógenos.....	31
1.3 Disponibilidad de GC en los tejidos: 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa.....	34
1.4 Transporte plasmático de GC: La globulina de unión a corticosteroides.....	34
1.5 Metabolismo y excreción.....	35
1.6 Acciones fisiológicas de los glucocorticoides.....	35
1.7 Síntesis extra-adrenal de glucocorticoides.....	35
1.7.1 Síntesis extra-adrenal de GC en el epitelio epidérmico.....	37
1.7.2 Síntesis extra-adrenal de GC en el epitelio intestinal.....	37
<b>2 El receptor nuclear 3C1 (NR3C1).....</b>	<b>39</b>
2.1 Estructura del GR.....	39
2.2 Interacción GC-GR y efectos sobre la transcripción.....	40
2.3 Mecanismo de acción molecular de los glucocorticoides.....	42
2.4 Modelos animales con alteraciones en GR.....	43
<b>3 Enfermedad inflamatoria intestinal.....</b>	<b>44</b>
3.1 Generalidades.....	44
3.2 Etiología.....	48
3.2.1 Factores genéticos.....	48
3.2.2 Factores ambientales.....	50
3.2.2.1 Microbiota intestinal.....	50
3.2.2.2 Estrés.....	51
3.2.2.3 Dieta.....	51
3.2.2.4 Tabaco.....	52
3.2.2.5 Apendicectomía.....	53
3.3 Inmunología de la EII.....	53
3.3.1 Homeostasis inmunológica en el intestino sano.....	53
3.3.1.1 Microbiota intestinal y tolerancia oral.....	53
3.3.1.2 Barrera epitelial.....	53
3.3.1.3 Reconocimiento antigénico e inmunorregulación.....	55
3.3.1.4 Procesamiento antigénico.....	58
3.3.1.5 Diferenciación de linfocitos T colaboradores.....	58
3.3.2 Disfunción del SI intestinal.....	60
3.3.2.1 Eventos primarios.....	60
3.3.2.2 Eventos secundarios.....	61
3.4 Glucocorticoides en el tratamiento de la EII.....	62



3.5	Glucocorticoides locales en la EII .....	64
<b>4</b>	<b>Glucocorticoides y el entorno intestinal. ....</b>	<b>64</b>
4.1	Efectos del estrés sobre la función de barrera epitelial.....	65
4.2	Efectos del estrés sobre el flujo hidroelectrolítico intestinal.....	65
4.3	Efectos del estrés sobre la permeabilidad intestinal a antígenos bacterianos y otras macromoléculas.....	66
4.4	Microbiota, estrés y glucocorticoides.....	67
4.5	Glucocorticoides en la inmunología intestinal.....	67
4.5.1	Efectos de los GC sobre células epiteliales.....	68
4.5.2	Efectos sobre la colitis inducida en ratón.....	69
4.5.3	Efectos sobre las células endoteliales.....	69
4.5.4	Efectos de los GC sobre células presentadoras de antígenos.....	70
4.5.5	Efectos de los GC sobre los leucocitos polimorfonucleares.....	71
4.5.6	Efectos sobre las células T.....	71
	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>75</b>
	<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>79</b>
<b>1</b>	<b>Reactivos.....</b>	<b>81</b>
<b>2</b>	<b>Animales de experimentación y modelos animales.....</b>	<b>81</b>
2.1	Genotipado de los ratones GR y VilCre.....	81
2.1.1	Extracción de DNA para genotipaje.....	81
2.1.2	Genotipaje de los ratones B6.Cg-Nr3c1 <sup>&lt;tm1.1Jda&gt;/J</sup> .....	81
2.1.3	Inducción de la delección del gen Nr3c1 en el epitelio intestinal.....	82
2.2	Diseño experimental de la caracterización de ratones con delección condicional inducible del GR en el epitelio intestinal.....	82
2.3	Estudio del efecto de la delección del gen Nr3c1 en el epitelio intestinal en un modelo de colitis aguda en ratones C57BL6/J.....	83
2.3.1	Inducción de colitis aguda por DSS.....	83
2.3.2	Diseño experimental.....	83
<b>3</b>	<b>Estudio del estado inflamatorio.....</b>	<b>85</b>
3.1	Determinaciones plasmáticas.....	85
3.1.1	Obtención del plasma.....	85
3.1.2	Determinación de nitratos y nitritos en plasma.....	85
3.1.3	Determinación de DKK1 y haptoglobina plasmáticas.....	85
3.1.4	Determinación de ACTH, TNF $\alpha$ , IL6 y leptina plasmáticas.....	86
3.1.5	Determinación de corticosterona.....	86
3.2	Evaluación del daño y la inflamación intestinal.....	86
3.2.1	Evaluación macroscópica del daño intestinal.....	86
3.2.2	Estudio histológico.....	86
3.2.3	Estudio de la permeabilidad intestinal <i>in vivo</i> .....	87
3.2.4	Estudio de la permeabilidad paracelular en tejido colónico distal <i>ex vivo</i> .....	87
3.2.5	Cuantificación de la sangre oculta en heces.....	87
3.2.6	Determinación de la actividad mieloperoxidasa y fosfatasa alcalina en colon.....	87
3.2.7	Estudio de la expresión proteica mediante Western Blot.....	88
3.2.7.1	Extracción y cuantificación de proteínas para análisis por Western Blot.....	88

3.2.7.2 Western Blot .....	88
3.2.8 Cuantificación de la expresión génica mediante qRT-PCR.....	89
3.2.8.1 Extracción de ARN y reacción de retrotranscripción.....	89
3.2.8.2 Análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real.....	89
3.2.9 Experimentos ex vivo.....	90
3.2.9.1 Cultivo de explantes de colon.....	90
3.2.9.2 Determinación de la secreción de citoquinas en explantes de colon por análisis Multiplex®.....	90
3.2.10 Hemograma y estudio hematológico.....	90
3.2.11 Separación de linfocitos intraepiteliales y células intestinales epiteliales.....	91
3.3 Citometría de flujo.....	91
<b>4 Análisis estadístico.....</b>	<b>92</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>95</b>
<b>1 Efecto de la budesonida en la colitis inducida por DSS.....</b>	<b>97</b>
<b>2 Caracterización de los ratones deficientes en GR en epitelio intestinal.....</b>	<b>98</b>
2.1 Generación de ratones con delección condicional inducible del GR en el epitelio intestinal.....	99
2.2 Caracterización de ratones con delección condicional inducible del GR en el epitelio intestinal.....	100
2.2.1 Estudio macroscópico y microscópico del colon.....	100
2.2.2 Estudio de la funcionalidad del epitelio intestinal.....	102
2.2.3 Estudio de parámetros de inflamación.....	104
2.2.4 Estudio de la producción de citoquinas en colon.....	108
2.2.5 Estudio de parámetros relacionados con la proliferación epitelial.....	111
2.2.6 Estudio de la composición celular de ganglios mesentéricos.....	113
2.2.7 Estudio de la composición celular en el bazo.....	115
2.2.8 Estudio de la composición de linfocitos intraepiteliales.....	116
2.2.9 Estudio de parámetros plasmáticos.....	117
2.2.10 Estudio de parámetros relacionados con los GCs endógenos.....	118
2.2.11 Estudio hematológico.....	121
<b>3 Papel del GR en el epitelio intestinal de animales al inicio de la colitis inducida por DSS.....</b>	<b>123</b>
3.1 Estudio macroscópico y microscópico de la respuesta temprana a la inducción de colitis por DSS.....	123
3.2 Estudio de la funcionalidad epitelial intestinal en la respuesta temprana a la inducción de colitis por DSS.....	126
3.3 Estudio de parámetros de inflamación en la respuesta temprana a la inducción de colitis por DSS.....	128
3.4 Estudio de parámetros relacionados con la proliferación epitelial en la respuesta temprana a la inducción de colitis por DSS.....	132
3.5 Estudio de la producción de citoquinas en colon en la respuesta temprana a la inducción de colitis por DSS.....	134
3.6 Estudio de parámetros plasmáticos en la respuesta temprana a la inducción de colitis por DSS.....	136

3.7 Estudio de parámetros relacionados con los GCs endógenos en la respuesta temprana a la inducción de colitis por DSS.....	137
3.8 Estudio hematológico en la respuesta temprana a la inducción de colitis por DSS.....	139
<b>4 Efecto de la colitis por DSS en ratones deficientes en GR en el epitelio intestinal. ....</b>	<b>141</b>
4.1 Evolución del estado general de ratones carentes de GR en el epitelio intestinal en la colitis inducida por DSS. ....	142
4.2 Estudio de la funcionalidad epitelial intestinal en ratones carentes de GR en el epitelio intestinal en la colitis inducida por DSS. ....	145
4.3 Estudio de los parámetros inflamatorios en la colitis inducida por DSS en ratones carentes de GR en el epitelio intestinal.....	148
4.4 Estudio de parámetros relacionados con la proliferación intestinal en la colitis inducida por DSS en ratones carentes de GR en el epitelio intestinal. ....	152
4.5 Estudio de la producción de citoquinas en colon en la colitis inducida por DSS en ratones carentes de GR en el epitelio intestinal. ....	154
4.6 Estudio de parámetros plasmáticos en la colitis inducida por DSS en ratones carentes de GR en el epitelio intestinal. ....	156
4.7 Estudios de parámetros relacionados con los GCs endógenos en la colitis inducida por DSS en ratones carentes de GR en el epitelio intestinal. ....	157
4.8 Estudio hematológico en la colitis inducida por DSS en ratones carentes de GR en el epitelio intestinal. ....	158
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>161</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>179</b>
<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>183</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>187</b>

# SUMMARY



## 1 Introduction.

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

Inflammatory bowel disease (IBD) is a chronic relapsing inflammatory disorder of the gastrointestinal tract that encompasses two idiopathic and major inflammatory diseases: Crohn's disease and ulcerative colitis. Both forms of IBD significantly impair quality of life, and require prolonged medical and/or surgical interventions. What makes it particularly challenging is its still unknown cause, its unpredictable presentations and symptoms, the less than optimal treatments, and a rise in its incidence and prevalence in many areas of the world.

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

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

The experimental evidence currently available on the application of synthetic GC in different models of colitis has been gathered after their empirical use in humans. In agreement with the well-known anti-inflammatory actions of these molecules, the majority of the results already published reflect a positive impact on the animals condition and (generally) survival. However, in the case of acute DSS-induced

colitis, the effect of GC administration was surprisingly different. Our laboratory has recently described that budesonide exerts both deleterious and protective effects in experimental colitis in mice. On one side, budesonide increased body weight loss, bacterial translocation, sepsis, and bleeding, with increased mortality. On the other side, inflammatory parameters such as MPO or IL6 were lower compared to the non-treated group. We additionally found that budesonide inhibits the proliferation of IECs, decreasing PCNA and CyclinD1 and causing an increase of intestinal permeability.

GR knockout mice are not fully viable, mainly because of a failure in pulmonary maturation which leads to premature death of the mice. Several tissue specific KO mice have been generated in the last few years. Skin (a tissue relatively similar to the intestinal epithelia) GR KO mice showed altered development and a basal inflammatory status that increased the susceptibility to detergent agents. Intestinal GR KO mice have been previously generated but only studied for its impact on glucose absorption and gastroparesis. This Doctoral Thesis will try to elucidate which alterations occurs after the GR deletion and its role in DSS colitis with or without budesonide treatment.

## **2 Material and methods.**

To carry out the objectives of the present Thesis, we used a wide variety of techniques, including tissue culture techniques, real time PCR, histology techniques, flow cytometry, ion transport in Ussing chambers, Western Blot, ELISA as well as DSS induced colitis.

Inducible tissue-specific knockout mice of the GR in the intestinal epithelia were generated by using Cre-loxp technology in a C57 background.

## **3 Aims.**

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

1. To characterize the role of the intestinal epithelial GR in gut physiology, particularly in mucosal barrier function and inflammation, and its bearing on the beneficial and harmful effects of corticoids in this context.

2. To improve current management of inflammatory bowel disease with corticoids by identifying possible pitfalls in their pharmacological effects in this condition, as well as possible ways to circumvent them.

#### 4 Results and discussion.

Our results can be split into two main sections.

##### *GR KO mice characterization*

Gene deletion was induced by the administration of tamoxifen for 5 days. Mice lacking the Cre gene, Vil-CreER<sup>T2</sup> or GRloxP/loxP, were used as wild-type controls. In these experiments mice were sacrificed after 7 or 14 days since the first tamoxifen injection to elucidate the possible changes at the first time point and if they persist at the second one. GR KO mice at day 7 exhibit an inflammatory status as evidenced by an increase of S100A9 and p-STAT3 expression in colonic tissue. Besides, colonic explants secreted higher levels of a wide range of pro-inflammatory cytokines such as GM-CSF 7 days after the deletion. One of the multiple anti-inflammatory effects of the GCs is related to the tethering union of the GR with STAT3 and NF- $\kappa$ B which are known to increase the expression of pro-inflammatory cytokines. Cytokine production could be abnormally increased due to the lack of the homeostatic GR tethering effect in the IECs provoking a *domino effect* in other immune cells. This effect was abolished or even counteracted fourteen days after the deletion, perhaps by compensating mechanisms, although some changes persisted (or were even begun) at this late stage.

The inflammatory condition was not limited to the colon. Plasmatic IL6 and TNF $\alpha$  were increased at 7 days, whereas leptin (which is known to decrease under inflammation) was diminished. The effect was completely abolished on day 14.

The role of GCs in cell proliferation is well known. To assess how GR deficiency is involved in proliferation we measured gene expression of cyclin D1 and cMYC, both of which were increased at 7 days. No great differences could be found when we measured protein expression of cyclin D1 or PCNA, although the trend was the same. STAT3 activation could lead to an increase of cyclin D1 gene expression. Our study also found that plasmatic DKK1 is reduced in GR mice. DKK1 is linked with WNT- $\beta$ -catenin pathway acting as an inhibitor.  $\beta$ -catenin and LRP6 could not be measured by western blot in isolated IECs for unidentified technical reasons, but future experiments will be done using intestinal organoids. Despite enhanced proliferation, the balance between the different epithelial lineages remained largely unaffected, as shown by the gene expression of LGR5, LYZ1, MUC2 and IAP.

In order to elucidate which mechanism lies beneath the compensative response, corticosterone was measured both in explants and in plasma. Colonic production of corticosterone increased only 14 days after the deletion. In contrast, plasmatic corticosterone was decreased at both 7 and 14 days. This result, plus the lack of an



ACTH response in DSS colitis (see below), point at a downregulation of the HPA axis in GR KO mice which should be explored in depth in the future.

Colonic segments exhibited a somewhat bloody appearance which was associated with significant anemia, but there was no sign of blood in feces either visually or with two different techniques. This puzzling result may be interpreted as indicating the occurrence of mucosal hemorrhage, but this will require additional confirmation.

*Role of epithelial GR in DSS-induced colitis*

Budesonide was administered to colitic mice (both WT and GR mice) starting alongside DSS in drinking water, which began 7 days after the first tamoxifen injection. Hence colitis was induced at the point of maximal colonic inflammation derived from GR deletion. In these experiments the administration of budesonide to WT mice elicited an enhancement of disease systemic severity, i.e. considering body weight evolution. This worsening was GR-dependent. On the other hand, GR mice showed stool bleeding starting on day 1 of DSS, whereas WT mice started bleeding at day 2-4. This led us to think that the inflammatory status described at day 7 in noncolitic (non DSS) mice alters the classical evolution of DSS-induced colitis. Because of this, a DSS-induced colitis experiment was done ending only 24 hours after the administration of DSS.

On the other side, the enhancement of disease severity was reversed by the end of the experiment, as mice in the GR DSS group started to regain weight and ended up on top of the WT group. If budesonide is administered to WT mice there is a continuous loss of weight starting at day 1-2 (instead of day 5 in the WT group), that is not present in GR<sup>ΔIEC</sup> DSS budesonide treated mice. Thus, GR<sup>ΔIEC</sup> mice are more sensitive to DSS initial damage, boosting the inflammatory response that is provoked by the gen deletion. On the other side, GR<sup>ΔIEC</sup> mice are protected from DSS-induced colitis at a later time.

The initial response of GR<sup>ΔIEC</sup> mice to DSS-induced colitis showed colonic signals of inflammation like infiltration, thickening and epithelial injury in the histological analysis as well as an increase of alkaline phosphatase activity and colonic cytokine secretion in explants (such as MIP1 $\alpha$ , MIP1 $\beta$ , GM-CSF, IP-10, MCP-1, RANTES, TNF $\alpha$ , etc.). S100A8/S100A9 levels were also upregulated in colonic tissue. Plasmatic inflammatory markers, which were increased in GR non DSS mice, were not further augmented by DSS colitis.

Mice exposed to DSS exhibited DKK1 levels greatly decreased compared to non-colitic mice and even comparing GR vs. WT. Tight junctions seem to be negatively regulated as seen with claudin 2 and 4 protein expression, which was downregulated, even though macromolecular permeability was unaffected, as assessed by FITC-Dextran 4 kDa transport *in vivo*.

Intestinal corticosterone is upregulated in DSS colitis, but without changes in GR<sup>ΔIEC</sup> mice. LRH-1 expression was not modified at 1 day post DSS but was highly upregulated in both GR groups after 7 days of DSS, suggesting the occurrence of negative feedback mechanism mediated by the GR.

## 5 Conclusions.

1. Genetic deletion of the GR in intestinal epithelial cells is stable and results in a moderate inflammatory response in the colon which is attributed to the secretion of proinflammatory mediators by the enterocytes and exhibits time-dependent effects.

2. GR deletion increases epithelial proliferation without affecting substantially the balance between the different epithelial lineages.

3. Mice with epithelial GR deletion exhibit signs of blood loss which are attributed to intramucosal hemorrhage, and which is enhanced by experimental DSS colitis.

4. Intestinal epithelial GR deletion greatly worsens the initial inflammatory response to DSS, but it has protective effects in later stages, which are attributed to the modulation of leukocyte trafficking, as well as to attenuated sepsis.

5. The HPA axis appears to be downregulated in GR<sup>ΔIEC</sup> mice by unknown mechanisms. This surprising outcome requires confirmation in additional studies and may be involved in the effects at the colonic level.

6. The intestinal production of corticosterone is upregulated in DSS colitis but is largely unaffected in GR<sup>ΔIEC</sup> despite evidence of an epithelial GR negative feedback mechanism regulating LRH1 expression, according to the increased expression in the absence of the receptor.

7. The harmful effects of budesonide in DSS colitis are mediated by the epithelial GR receptor. Protection may be related to avoidance of budesonide antiproliferative effects on the epithelium.



# INTRODUCCIÓN



## **1 Glucocorticoides.**

### **1.1 Historia.**

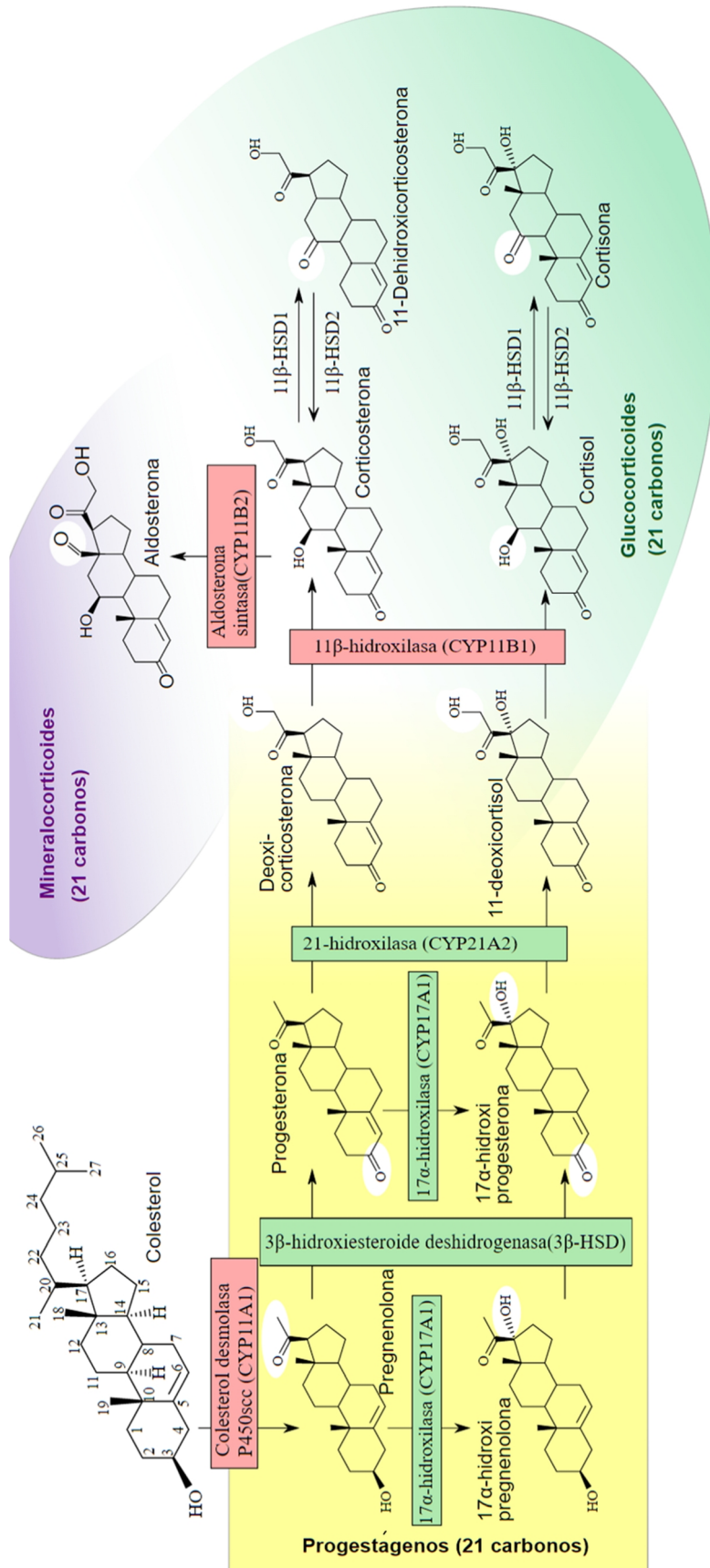
En el año 1855 Thomas Addison describió la observación clínica de un síndrome con los síntomas de pigmentación intensa de la piel, debilidad, pulso débil y malestar general de 11 pacientes que carecían de la glándula adrenal y que al final morían [1].

Años después se describieron moléculas que regulaban el metabolismo glucídico y lipídico y se denominaron glucocorticoides (GCs), mientras que aquellas que regulaban el equilibrio hidroelectrolítico recibieron el nombre de mineralocorticoides (MC). No fue hasta el año 1947 cuando Sarett sintetizó la cortisona que fue el primer glucocorticoide usado ampliamente en clínica.

### **1.2 Síntesis, liberación y regulación de los corticoides endógenos.**

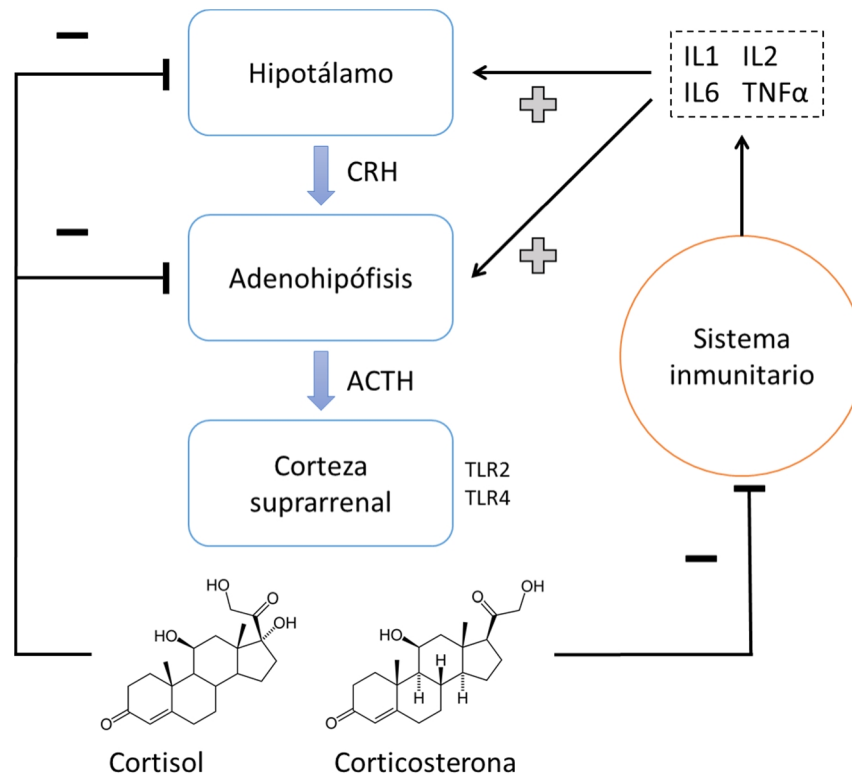
La síntesis de GC endógenos (cortisol en humanos y corticosterona en roedores) desde colesterol, se realiza principalmente en la zona media o fascicular de la corteza suprarrenal. En esta, se encuentran preferentemente los receptores para la corticotropina (ACTH). Esta hormona estimula la síntesis y liberación tanto de GC como de MC y actúa como factor trófico. De hecho, en respuesta a la ACTH se produce un rápido aumento de colesterol como sustrato y a su vez se estimula la síntesis de enzimas esteroideogénicas, en especial CYP11A1 que cataliza la primera reacción (esquema 1).

La síntesis de corticosteroides (GC y MC) se encuentra estrechamente regulada por el denominado eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HHA). El hipotálamo es rico en neuronas que contienen hormona liberadora de corticotropina (CRH), que se libera de forma controlada hacia el plexo hipofisario, por el cual llegará a la hipófisis donde encuentra a sus receptores específicos CRHR1/CRHR2. Estos dos receptores, desencadenan una cascada de transducción de señal induciendo la síntesis y posterior secreción de ACTH. La CRH recibe la colaboración de la arginina vasopresina (AVP), sintetizada en el núcleo paraventricular, que actúa como coadyuvante de la CRH estimulando la síntesis de ACTH en la hipófisis.



Esquema 1. Esteroidogénesis humana y murina.

Los mecanismos de regulación del eje HHA antes descrito se centran en tres vertientes. Una regulación negativa mediada por el efecto de los propios GC sobre el hipotálamo y la hipófisis [2], una regulación positiva por parte de citoquinas de carácter inflamatorio [3], así como de productos bacterianos que señalizan mediante receptor tipo toll (TLR) 2 y TLR4 en la corteza suprarrenal [4, 5], y una influencia positiva directa del estrés [6] que aumenta la liberación de CRH por parte del hipotálamo (esquema 2).



Esquema 2. Mecanismos de regulación del eje HPA.

La relevancia del diálogo entre el sistema inmunológico y el eje HPA queda experimentalmente patente en humanos [7] y en modelos animales de *shock* séptico en los cuales la adrenalectomía o la inhibición farmacológica del efecto de los GC implica una mayor susceptibilidad a dicho modelo [8-11]. La activación del eje HHA asociada al estrés psicológico, deriva del efecto directo de neurotransmisores de carácter excitador como acetilcolina, serotonina y noradrenalina sobre las neuronas liberadoras de CRH a nivel hipotalámico. Además en el caso de la noradrenalina se establece una relación de tipo bidireccional de *feedback* positivo, dado que mientras que ella misma activa el eje HPA, la CRH generada en el hipotálamo actúa de modo paracrino activando las sinapsis noradrenérgicas en el sistema nervioso central. Este fenómeno de retroalimentación positiva explica en gran medida la estrecha relación entre el estrés psicológico y el aumento en la esteroidogénesis [12, 13].



### **1.3 Disponibilidad de GC en los tejidos: 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa**

El eje HHA se considera responsable de la regulación de los niveles circulantes de GC, sin embargo, la disponibilidad del metabolito activo de los GC en los tejidos se ve regulado por las enzimas 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasas 1 y 2 (11 $\beta$ -HSD1 y 11 $\beta$ -HSD2) presentes en los distintos tejidos [14-17] como se explica a continuación.

Como se observa en el esquema 1 estas enzimas son responsables de la conversión reversible de cortisol o corticosterona en un metabolito inactivo desde el punto de vista biológico. De este modo, la enzima 11 $\beta$ -HSD1 actúa en algunos tejidos como un amplificador de la señal de exposición a cortisol, convirtiendo la cortisona (o en ratón 11 $\beta$ -dehidrocorticosterona) en cortisol (o corticosterona en ratón) como se ve en el esquema 1. Tanto es así, que una actividad irregular de esta enzima se ha visto implicada en enfermedades metabólicas e inflamatorias y su inhibidor selectivo se ha probado con éxito como tratamiento de la diabetes tipo 2 [18]

De manera inversa, la 11 $\beta$ -HSD2 protege a los tejidos ante una exposición excesiva de GC [18-21]. La deficiencia en esta enzima causa hipertensión secundaria debido a un exceso de activación del receptor de mineralocorticoides (MR) por el cortisol.

En el epitelio del tejido colónico se expresa la enzima 11 $\beta$ -HSD2 [22] y además dicha expresión aumenta ante la presencia de aldosterona [23]. En condiciones inflamatorias, en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII) esta enzima se encuentra disminuida acompañada de un aumento de 11 $\beta$ -HSD1 [24], lo que parece un intento de controlar la exposición local de GC en el tejido inflamado.

### **1.4 Transporte plasmático de GC: La globulina de unión a corticosteroides.**

Los GC debido a su carácter lipófilo precisan de una proteína transportadora en plasma, esta es la globulina de unión a corticosteroides (del inglés CBG). La CBG es una glucoproteína monomérica de 55 KDa de la superfamilia de las inhibidoras de la serín proteasa (serpinas) que actúa como proteína transportadora en plasma para los GC y en menor medida para los MC. Los tejidos que actúan como fuentes productoras de esta proteína son fundamentalmente el hígado y en menor medida los riñones, pulmones y testículos [25]. En condiciones normales, alrededor del 90% de los GC endógenos se encuentran unidos a la CBG, pero cuando se administra una dosis elevada de GC exógeno la capacidad de transporte se ve superada y

aumenta la fracción de GC libre en plasma. De esta forma, la CBG permite la formación de un reservorio de corticosteroides en sangre [26].

Recientemente se ha puesto de manifiesto su importancia en la regulación de la llegada y liberación local de GC en los tejidos diana. La elastasa secretada por los neutrófilos infiltrados en los focos inflamatorios modifica por proteólisis a la CBG, liberando GC en el foco inflamatorio [25, 27]. Por otro lado, existen receptores de superficie para el complejo GC-CBG que deben participar en la captación hacia el interior celular y/o la señalización por una cascada de transducción apropiada de los GC en dichas células diana [28, 29].

### **1.5 Metabolismo y excreción**

La metabolización de los GC se basa en la adición secuencial de átomos de oxígeno e hidrógeno y la posterior conjugación del compuesto obtenido con un grupo sulfato o glucurónico. El proceso bioquímico que conlleva la reducción del doble enlace en la posición 4,5 se puede dar en hígado o en localizaciones extrahepáticas, sin embargo, la sustitución del grupo cetónico del carbono 3 y la conjugación se producen exclusivamente en el hígado. Una vez generado el compuesto soluble final, este es eliminado mediante excreción renal.

### **1.6 Acciones fisiológicas de los glucocorticoides**

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

### **1.7 Síntesis extra-adrenal de glucocorticoides**

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

Tabla 1. Acciones fisiológicas más relevantes de los glucocorticoides.

Efectos sobre el metabolismo glucídico	
Aumento de la gluconeogénesis y del almacenamiento de glucógeno.	[30]
Menor secreción de insulina. Hiperplasia de células $\beta$ pancreáticas.	[31]
Efectos sobre el metabolismo lipídico	
Incremento de la lipólisis	[32, 33]
Redistribución de la grasa hacia cuello, cara y abdomen	
Efectos sobre el sistema cardiovascular	
Hipertensión por aumento de volemia y sensibilización a agentes vasoconstrictores.	[34, 35].
Riesgo de aterosclerosis, eventos de tipo anginoso, insuficiencia cardíaca	[36]
Hipertrofia muscular cardíaca	[37]
Efectos sobre el músculo estriado	
Efecto catabólico muscular	[38-40]
Inhibición de los procesos de regeneración muscular	[38, 41]
Osteoporosis	[42, 43]
Efectos sobre el sistema reproductor	
Inhibición de la síntesis de testosterona, estrógenos y progesterona.	[44]
Regulación de respuesta a hormona luteinizante (LH)	[44]
Efectos sobre el desarrollo embrionario	
Maduración tisular, sobre todo pulmonar	[45-47]
Maduración de la epidermis	[48]

Entre estos tejidos destacan células de naturaleza epitelial presentes en el timo, piel, y por supuesto intestino, siendo este último el más interesante en nuestro caso. El epitelio pulmonar y el endotelio vascular presentan algunas de las enzimas propias de la esteroidogénesis, pero a día de hoy no se les considera fuentes extraadrenales de GC. En el caso del epitelio pulmonar porque su demostrada capacidad de liberación de corticosterona no parece ser dependiente de síntesis *de novo*, sino de la reactivación local de deshidrocorticosterona a corticosterona mediada por  $11\beta$ -HSD1 [49] (esquema 1). Por otra parte, el endotelio vascular carece de algunas de las enzimas decisivas en la esteroidogénesis, lo que le inhabilita para la síntesis autónoma de GC, pero no para producir aldosterona de forma autónoma

[50, 51]. Por último, el caso del cerebro es quizá el de más compleja interpretación, pues diferentes estudios realizados en rata y ratón arrojan resultados poco congruentes, a pesar de la existencia de algunas evidencias que apuntan a que sobre todo en ratones existe una síntesis de corticosterona por parte de células de la glía, y a que incluso en el pez cebra se produce la síntesis de GC en cerebro, no se puede considerar al cerebro como un tejido esteroidogénico al mismo nivel que el epitelio intestinal, la piel o el timo [52-55].

### 1.7.1 Síntesis extra-adrenal de GC en el epitelio epidérmico

En la actualidad está demostrado en humanos que los queratinocitos y los melanocitos cuentan con toda la maquinaria biosintética necesaria para la esteroidogénesis, desde los transportadores de colesterol [56], hasta las propias enzimas que catalizan la conversión del colesterol en cortisol [57, 58]. Además, estas células expresan CRH y ACTH, así como el receptor para la última, por lo que poseen todos los componentes del eje HHA. De este modo, se puede hablar de la existencia de un eje análogo al HHA que funciona localmente regulando la síntesis y liberación auto-paracrina de cortisol de forma local en la piel [59]. Esta síntesis se ve estimulada por los procesos inflamatorios, que estarán mediados por la IL1 $\beta$  y factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), y por la propia CRH por su efecto directo sobre las uniones estrechas, mastocitos y estimulando la producción de ACTH. [60].

La activación de este eje, intenta evitar el desarrollo de procesos inflamatorios descontrolados tras una agresión a la mucosa epidérmica. Sin embargo, a pesar de que los GCs son antiinflamatorios, también está demostrado su efecto perjudicial sobre la restitución epitelial, debido a su efecto antiproliferativo. Por tanto, en el epitelio, existen mecanismos que regulan negativamente su producción y efectos. Los dos más relevantes son, por un lado la inhibición de la esteroidogénesis mediante *insulin growth factor 1* (IGF-1), que ve incrementada su expresión cuando se perturba la función de barrera epidérmica y, por el otro, un aumento de la expresión de 11 $\beta$ -HSD2 que cataliza en el entorno de la propia célula diana la conversión del cortisol en cortisona biológicamente inactiva [60].

### 1.7.2 Síntesis extra-adrenal de GC en el epitelio intestinal

Alrededor del año 1995 comenzó a ponerse de manifiesto la expresión de enzimas implicadas en la esteroidogénesis en la mucosa intestinal [61]. Estos hallazgos hicieron que se contemplase la posibilidad de que la mucosa intestinal tuviera la capacidad de sintetizar GC de forma autónoma, idea que se vio reforzada por otros experimentos que mostraban cómo algunos efectos de los GC sobre los linfocitos

intraepiteliales intestinales (IEL) infiltrados en dicha mucosa desaparecían al administrar mifepristona al animal y en cambio apenas se veían reducidos cuando estos eran adrenalectomizados.

Dentro de la complejidad que caracteriza al tejido intestinal, en un principio fue difícil estimar cuál era la fuente celular concreta de la corticosterona local en ratones. No obstante, el hecho de que en la corteza suprarrenal y en el timo fueran células epiteliales las encargadas de su síntesis y liberación, convirtió a este tipo celular en el primer candidato. De hecho, estudios basados en hibridación *in situ* y estudio de expresión de enzimas esteroidogénicas en poblaciones celulares intestinales confirmaron que la fuente de estos GC eran las células epiteliales intestinales (IEC), concretamente IECs localizadas en la base de las criptas [62-64].

Mediante estudios por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real, se ha demostrado que tanto el intestino delgado como el grueso expresan todas las enzimas que participan en la esteroidogénesis. Aunque dicha expresión es muy baja en animales sanos, se ve incrementada en procesos inflamatorios que cursan con afectación intestinal. Así la administración intraperitoneal de anticuerpos anti-CD3 (clúster de diferenciación 3) incrementó la liberación de corticosterona en fragmentos intestinales en cultivo [62], mientras que la exposición de macrófagos a lipopolisacárido (LPS) provoca un aumento significativo de la esteroidogénesis en las células epiteliales intestinales [65]. Al parecer el mediador inflamatorio para la conexión entre la respuesta inflamatoria celular y la estimulación de la síntesis intestinal de GC es el  $TNF\alpha$ , en la medida en que esta desaparece en animales deficientes en dicha citoquina o su receptor [65, 66].

La regulación de la producción local de GC en el intestino es totalmente diferente de la que se producen en la corteza suprarrenal. Mientras que en esta última está dirigida por la expresión del factor esteroidogénico 1 (SF-1, *steroidogenic factor 1*). En el epitelio intestinal este factor de transcripción no se expresa, pasando a desempeñar su papel otra molécula denominada receptor homólogo hepático 1 (LRH-1, *liver receptor homologue 1*), que cuenta con múltiples similitudes estructurales con la anterior. Ambas se unen a los promotores de los genes codificantes de las enzimas esteroidogénicas, produciendo un aumento de su expresión. Mientras que SF-1 en la corteza adrenal induce una esteroidogénesis de rápida respuesta y cuantitativamente alta, LRH-1 en el epitelio intestinal lo hace de un modo más progresivo y cuantitativamente limitado [67-69].

La expresión de LRH-1 en la mucosa intestinal se encuentra restringida a las células inmaduras, indiferenciadas y altamente proliferativas que se sitúan en la base de las criptas, de modo que al ir estas ascendiendo y diferenciándose van perdiendo la expresión [70]. Cuando se produce una agresión sobre el epitelio intestinal se ve incrementada la expresión de LRH-1, y en consecuencia la de Ciclina D1 [71], que a su vez aumenta la proliferación epitelial, contribuyendo así a la restitución de la función de barrera comprometida. Como ya se ha comentado, la diferenciación epitelial implica la pérdida de la expresión de LRH-1, lo que parece lógico para evitar crecimientos celulares incontrolados que podrían conducir a neoplasias, pero secundariamente limita la esteroidogénesis intestinal a las células epiteliales intestinales indiferenciadas de la base de las criptas.

## 2 El receptor nuclear 3C1 (NR3C1).

### 2.1 Estructura del GR.

El GR es una proteína de localización citoplasmática que es codificada por el gen NR3C1, concretamente por la región conformada por los exones que van desde el 2 al 9. Mediante mecanismos de *splicing* alternativo se generan tanto en humanos como en ratón, dos isoformas principales del GR,  $\alpha$  y  $\beta$ , que difieren en el extremo carboxilo terminal. Asimismo, se generan otras como la  $\gamma$ , A y P, que son funcionalmente poco relevantes y solo se les ha atribuido cierta relevancia en algunos casos de insensibilidad a GC [72]. Entre todas estas isoformas, la  $\alpha$  es la responsable de los efectos principales de los GCs debido a su localización citoplasmática. La isoforma  $\beta$  carece del bolsillo de unión a GCs y se encuentra en el núcleo actuando como inhibidor de la isoforma  $\alpha$  fundamentalmente, aunque también se ha descrito cierta actividad propia de esta isoforma como por ejemplo regulando la transcripción al unirse a la mifepristona [73]. En cualquier caso, GR $\alpha$  es la isoforma esencial en la farmacodinamia de los GC tanto endógenos como sintéticos, y será a la que nos referiremos de ahora en adelante cuando use la denominación genérica de GR, aunque cabe destacar que esta presenta a su vez ocho isoformas (A, B, C1, C2, C3, D1, D2 y D3) que se generan como consecuencia de la utilización de un punto variable en el inicio de la traducción dentro del exón 2, siendo todas ellas funcionalmente comparables entre sí [74].

La estructura proteica del GR es de tipo modular y presenta 4 regiones (esquema 3). Partiendo del extremo N-terminal se encuentra el dominio de transactivación (NTD, dominio N-terminal) que modifica la expresión del gen diana. A continuación reside el dominio de unión a DNA (DBD del inglés *DNA binding*

*domain*) que interacciona directamente con el elemento de respuesta a GC (GRE) en la región promotora del gen diana. [75]. Seguido de la región DBD existe una región bisagra entre el DBD y el dominio de unión a ligando (LBD), decisiva para la translocación del GR por un mecanismo dependiente de importina- $\alpha$  e importina-7 [72, 76]. Finalmente, en el extremo carboxilo terminal está el LBD donde se unen los GC y otros cofactores.



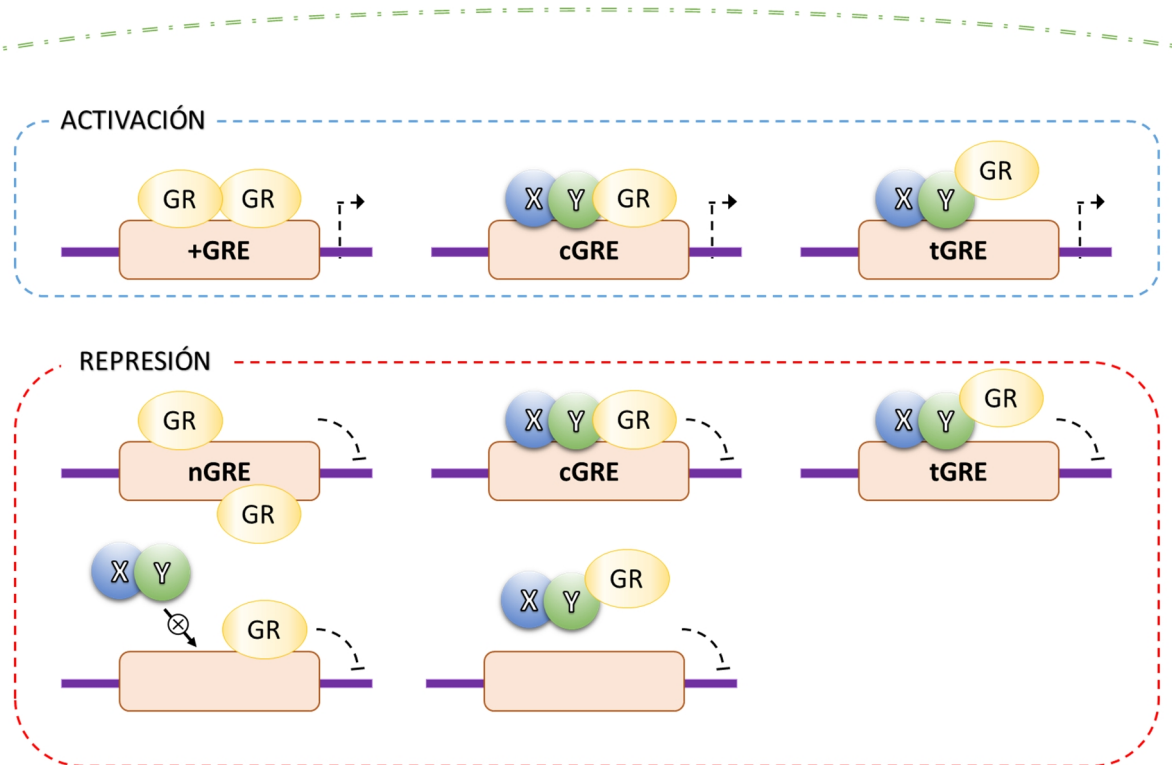
Esquema 3. Estructura del receptor para glucocorticoides GR $\alpha$ .

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

Los GC son moléculas de pequeño tamaño y carácter lipófilo que pueden difundir fácilmente a través de la membrana celular, aunque existen mecanismos de transporte poco relevantes en términos funcionales [77].

En ausencia de ligando, el GR se encuentra inactivo en el citoplasma como parte de un complejo multiproteico junto a la *heat shock-protein 90* (HSP90), *heat shock protein 70* (HSP70) e *immunophilin* (IP) [78]. Cuando al GR se le une un GC, provoca un cambio conformacional en el GR que lo libera del complejo multiproteico y deja expuestas sus señales de localización nuclear, promoviendo su transporte hacia el núcleo mediante la importina- $\alpha$  y la importina 7. El equilibrio en la presencia relativa de GR en núcleo y citoplasma está determinado por la funcionalidad de dichos mecanismos importadores y de la caltericulina y exportina-1 que median el proceso opuesto.

Una vez en el núcleo, puede unirse a los denominados GRE “simples” presentes en la región reguladora de los genes diana y que se caracterizan por la siguiente secuencia consenso palindrómica (GGTACAnnnTGTTCT) [79]. Es necesaria la unión de dos GR, unidos a sus ligandos, como homodímero para que tenga lugar la señalización. Cuando dicha situación conduce a un aumento de la expresión del gen diana, como ocurre con los genes para *glucocorticoid induced leucine zipper* (GILZ), *phosphoenolpyruvate carboxykinase* (PEPCK) o el propio NR3C1 [80], hablamos de un fenómeno de transactivación. El GR unido directamente a un GRE “simple” también puede reducir la expresión de este último, como ocurre en el caso del gen de la IL6, IL11, IL8 o la *matrix metalloproteinase 3* (MMP3), fenómeno conocido como represión clásica [81] (nGRE esquema 4).



Esquema 4. Mecanismos principales de interacción del GR.

Además de los GRE “simples”, existen otros que reciben el nombre de GRE *composite*, que se caracterizan por contener secuencias que permiten la unión del homodímero o monómero de GR conjuntamente con otros factores de transcripción, como ocurre en el promotor del gen que codifica para la CRH, que tiene un GRE que recibe a c-fos, c-jun y al propio GR [82]. La consecuencia final de este tipo de interacción puede ser una reducción de la expresión del gen en cuestión o en una activación. Aunque esa es la consecuencia más común, el modo en que el GR y alguno de esos factores de transcripción modifican de forma mutua la actividad del contiguo es bastante más compleja y se relaciona con una cierta capacidad del GR para estimular la competencia inmunitaria en condiciones basales [81] (esquema 4).

Otra forma por la cual el GR regula la expresión génica, es por *tethering* (atadura). En este caso, el GR en forma monomérica no interacciona con el DNA, sino que se une por su dominio LBD a otro factor de transcripción. Algunos de los casos más conocidos de este tipo de interacción son sobre los factores de transcripción *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- $\kappa$ B) [83, 84], *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) [85], *activator protein 1* (AP1) [86, 87], que son importantes de cara a los efectos inmunomoduladores y antiinflamatorios de los GC (esquema 4). Es también posible que el *tethering* impida la unión de los factores de transcripción al ADN. Incluso se ha descrito cómo el *tethering* del GR sobre algunos factores de transcripción genera inhibición, no de forma directa, sino provocando la



incorporación sobre ambos de elementos co-represores como la *hystone deacetylase* (HDCA3), *silencing mediator of retinoic acid receptor* (SMRT) o *nuclear receptor repressor complex* (NCoR)

Clásicamente se ha considerado que estas eran las únicas opciones con las que contaban los GC para interactuar con el GR. Sin embargo, más recientemente se ha descrito la existencia de algunos receptores anclados en las membranas celulares [88], que muestran capacidad para el reconocimiento de los GC. Estos receptores aún necesitan un estudio en profundidad pero parecen ser receptores GR clásicos pero anclados a membrana aunque hay otros asociados a proteínas G [89]. Las consecuencias suelen ser independientes de la modificación de expresión génica, por lo que aparecen a mucho más corto plazo. Uno de los ejemplos de esta opción es la cierta activación directa de la ruta de señalización de las *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) [90, 91]. Estos efectos rápidos de los GC tienen implicaciones funcionales potencialmente relevantes en los sistemas cardiovascular, inmunológico y por supuesto neuroendocrino.

Por último, es pertinente al menos citar otras dos posibilidades mecánicas mediante las cuales, tras la unión del GC al GR, este último genera ciertos efectos en la célula diana. Así, aunque generalmente se considera que el GR solo se homodimeriza al encontrarse ya unido a ácido desoxiribonucleico (DNA), existen evidencias que apuntan a que puede generar dímeros en solución de forma independiente del DNA, aunque su relevancia funcional es pequeña por tener baja afinidad por el DNA comparado con otros factores de transcripción [92]. Por otro lado, se ha descrito también que tras la unión del GC al GR, este último no solo es capaz de asociarse consigo mismo, sino que también lo puede hacer con el MR dando lugar a un heterodímero funcionalmente activo en términos de unión a DNA y por tanto como factor de transcripción [93, 94].

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

El mecanismo de acción de los GC es casi exclusivamente dependiente de su acción sobre el GR. No obstante, antes de que se dé la interacción del GC con su receptor específico, hay dos mecanismos que regulan la biodisponibilidad del GC en su forma activa y libre, lista para unirse a su receptor.

En referencia a los mecanismos que controlan el acceso del GC a su receptor, destaca por un lado la CBG en suero y un mecanismo mediado por las enzimas 11 $\beta$ -HSD1 y 11 $\beta$ -HSD2, que de un modo independiente del receptor regula la

especificidad de los GC sobre el GR y MR en determinados tejidos diana, como ya se explicó en el punto 1.3.

#### **2.4 Modelos animales con alteraciones en GR.**

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

En 1992 se produjo el primer animal en el que modifico genéticamente el GR. En él se incluyó la secuencia contrasentido del GR [95]. Como consecuencia, estos ratones eran obesos y presentaban la corticosterona y ACTH elevada en plasma.

Los ratones *knockout* (KO) completos han sido descritos por varios grupos [96] pero mueren en pocas horas por insuficiencia respiratoria, ya que los pulmones no maduran correctamente. Estos ratones poseen elevados niveles de corticosterona y ACTH por ausencia de señalización.

Debido a la imposibilidad de disponer de ratones GR KO completos y gracias a la tecnología *loxp-cre* [97] se han generado ratones KO específicos de diferentes tejidos como pulmón, piel, sistema cardiovascular, tejido adiposo, músculo, intestino, sistema inmune, hueso y sistema nervioso central, entre otros.

En el tejido pulmonar los efectos han sido discordantes entre los distintos grupos de investigación [47, 98, 99] de modo que no se han podido establecer conclusiones claras acerca de estos animales excepto una, el GR es indispensable para la maduración pulmonar como ya se intuía.

En los ratones que carecen de GR en la nefronas distales no se produce rescate de la respuesta hipertensiva por dexametasona [100] mientras que si lo hacen los KO de endotelio vascular [101], que además tienen especial sensibilidad al modelo de shock séptico. Si la delección ocurre en corazón [102], el resultado es arritmia cardiaca que desemboca en la muerte a los 6 meses por fallo cardiaco.

Con respecto al músculo estriado, la atrofia muscular inducida por dexametasona se corrige en los ratones KO en músculo de modo completo [103], lo que indica que es el GR el responsable de ésta. En tejido óseo se ha encontrado que es el GR de osteoblastos y no el de osteoclastos el principal responsable de la osteoporosis inducida por GC [104], aunque en estos últimos también debe jugar un papel importante.

Existen múltiples estudios sobre el papel del receptor en el sistema inmune, por citar algunos, los macrófagos carentes de GR son capaces de generar aterosclerosis

en ratones *low density lipoprotein receptor* (LDLR) KO [105] mientras que los linfocitos GR KO son los responsables del efecto terapéutico de los GC en un modelo de artritis reumatoide [106].

En tejidos relacionados con el metabolismo, la delección de GR en hígado enseñó que los GC son necesarios para la homeostasis de ácidos biliares [107], sin embargo, su delección en células  $\alpha$  o  $\beta$  pancreáticas no tuvo ningún efecto [108]. De modo interesante, la ausencia de GR en adipocitos provoca una menor capacidad lipolítica de los adipocitos mientras que mejora la obesidad asociada a dieta alta en grasa-envejecimiento y la tolerancia a la glucosa, demostrando que el GR juega un papel importante en los desórdenes metabólicos asociados a dieta alta en grasa y envejecimiento [109].

En la piel, y siendo de gran interés debido al parecido con el epitelio intestinal, los ratones GR KO ligado a keratinocitos mostraron un desarrollo alterado, una cierta inflamación y mayor susceptibilidad al daño por agentes detergentes y cáncer de piel [48, 110, 111].

Por último, y por ser el tema de estudio de esta tesis doctoral, los ratones GR KO ligados a villina, es decir a las IEC, se generaron en el año 2012 por el grupo del profesor Tuckermann [112, 113]. Su grupo describió que los ratones carentes en GR tienen aumentada la absorción de glucosa y que es el GR el responsable de inducir gastroparesia por la administración de dexametasona. Su trabajo no busca responder alteraciones inmunológicas o su papel en la colitis inducida por DSS.

### **3 Enfermedad inflamatoria intestinal.**

#### **3.1 Generalidades.**

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

La EC se caracteriza por una inflamación transmural del tracto gastrointestinal, que puede afectar a cualquiera de los segmentos, desde la boca hasta el ano. La EC

curso con una evolución no penetrante, de forma que solo alrededor del 15% de los casos presentan fístulas o abscesos. Clásicamente se produce una afectación inflamatoria discontinua o parcheada del segmento en cuestión, que en ocasiones se acompaña de otras complicaciones como estenosis o fístulas en la zona perianal. La frecuencia relativa con la que se ve afectado cada uno de los segmentos en los pacientes con EC es del 47% para el íleon terminal, 28% para el colon, 21% en el caso de la región ileocecal y solo de un 3% si consideramos el tracto gastrointestinal superior. La sintomatología puede ser muy diferente en cada paciente, en función de la región intestinal que esté afectada. Si la afectación es en colon el principal síntoma serán diarrea acompañada de presencia de sangre y moco. En cambio, si la afectación reside en el intestino delgado suele manifestarse dolor abdominal intenso en el cuadrante inferior derecho. La presencia de ulceraciones severas, fiebre y pérdida de peso derivada de una menor ingesta de alimentos para evitar el dolor postprandial, se presentan en la mayoría de los casos sin importar el segmento intestinal afectado [114].

En los segmentos inflamados en un paciente con EC se observa engrosamiento y rigidez intestinal dando aspecto de órgano macizo a la palpación, debido a la fibrosis y el edema. Además, las porciones afectadas se adhieren con frecuencia a otros segmentos intestinales, pudiendo ocasionar fístulas. Estos segmentos presentan una disminución de la luz intestinal y fibrosis en la pared. La mucosa suele presentar un aspecto en forma de “empedrado”, por la alternancia entre ulceraciones profundas y zonas edematosas. Cuando varias úlceras profundas se asocian entre sí, puede llegar a originarse una fístula, caso en que la afectación transmural alcanza la capa muscular [115, 116]. A nivel microscópico, destaca la infiltración difusa de linfocitos y células plasmáticas en la mucosa intestinal y la *lamina propria*. Asimismo, es frecuente encontrar granulomas localizados en submucosa, subserosa y ganglios linfáticos.

La CU se caracteriza por una inflamación no transmural (superficial) que solo afecta a la mucosa y que está anatómicamente restringida al colon. En función de la longitud del segmento colónico que se encuentre afectado, la CU recibe una denominación diferente. De este modo, se habla de proctitis si solo se ve afectado el recto, proctosigmoiditis cuando se ven afectados 25-30 cm en dirección proximal desde el recto, colitis izquierda cuando está afectado recto, sigma y colon ascendente, y finalmente pancolitis cuando se encuentra inflamada la totalidad del órgano. En algunas ocasiones estos pacientes sufren una inflamación que afecta a la zona distal del íleon, esto es conocido como “*backwash ileitis*”, y su aparición dificulta la realización de un adecuado diagnóstico diferencial entre EC y CU. La

sintomatología suele estar dominada por dolor abdominal sobre todo postprandial, diarrea con deposiciones muy mucosas e incluso acompañadas de pus, rectorragia y anorexia con la consecuente tendencia a la pérdida de peso o retraso en el crecimiento si hablamos de un paciente pediátrico. Cuando la sintomatología es muy exacerbada, se usa el término de CU fulminante. Si esta sintomatología perdura en el tiempo sin ser controlada clínicamente, puede terminar desembocando en un megacolon tóxico. En esta situación clínica, se produce una fuerte hemorragia intraluminal y la pared intestinal presenta un aspecto muy fino y frágil. Llegado a este punto, la única alternativa es la realización de una colectomía [117]. Cabe destacar que son frecuentes las alteraciones de tipo sistémico asociadas a la CU como artropatías periféricas, espondilitis anquilopoyética, problemas cutáneos como el pioderma gangrenoso, lesiones oculares, alteraciones renales como la pielonefritis e incluso algunas hepatopatías.

En la CU, a nivel macroscópico la mucosa en fase inflamatoria aparece hiperémica y con hemorragias puntiformes. A medida que el proceso inflamatorio evoluciona aparecen úlceras superficiales, que tienden a extenderse y fusionarse llegando a afectar grandes áreas de la mucosa colónica. Es también frecuente la presencia de pseudopólipos o pólipos inflamatorios que pueden confundirse fácilmente con adenomas. En fase de remisión este aspecto se normaliza bastante, pero la mucosa permanece lisa, brillante, granulosa y atrófica. En fases avanzadas de la enfermedad, el colon se torna fibrótico, estrecho y sensiblemente acortado con pérdida de las marcas australes [118-120]. A nivel microscópico, la *lamina propria* se encuentra infiltrada de células plasmáticas, linfocitos y neutrófilos. Junto a este infiltrado, se distorsiona la arquitectura normal de las criptas apareciendo disposiciones aberrantes. La extrema fragilidad tisular que ya se ha citado anteriormente asociada a la CU fulminante, puede reflejarse incluso en la aparición de agrietamientos patentes en la mucosa colónica [121, 122].

El diagnóstico diferencial fiable entre la EC y la CU es una cuestión que ha suscitado debate durante mucho tiempo en la comunidad médica. En general, este diagnóstico se hace atendiendo a las diferencias en la distribución anatómica de la afectación inflamatoria y sobre todo a la transmuralidad del proceso inflamatorio a nivel microscópico. Las técnicas de las que se hace uso para conocer estos detalles comprenden desde la endoscopia hasta la gammagrafía con leucocitos marcados, pasando por la ecografía y a radiografía. A pesar de la tecnología disponible y el creciente conocimiento sobre estas patologías, se dan casos de pacientes que presentan diagnóstico de EII pero que no pueden ser formalmente clasificados en

ninguna de las dos presentaciones clínicas antes descritas. Se habla en estos casos de colitis indeterminada [123].

De un modo comparativo entre EC y CU, la CU presenta una incidencia superior [124], estable en los últimos años. No obstante, la EC está viendo incrementada su incidencia fundamentalmente en aquellos países que inicialmente presentaban menos casos.

Distintos factores definen la epidemiología, entre ellos cabe destacar:

- Localización geográfica. Los mayores casos de incidencia se registran en países desarrollados, destacando norte de Europa, Reino Unido y Norteamérica. Sin embargo, aquellos que tradicionalmente presentaban una tasa baja, sur de Europa, Asia y África, están sufriendo un alarmante incremento en las últimas décadas paralelamente a la occidentalización de la dieta. [125-129]
- La edad parece ser un factor importante en el momento de la instauración de la enfermedad. La EC tiene un pico de máxima incidencia el comienzo de la madurez, entre los 20-40 años, mientras que la CU lo posee alrededor de los 60 [130]. En la última década ha aumentado incidencia de la EII en la edad pediátrica, principalmente EC [131].
- La influencia atribuida al sexo es relativamente pequeña en la instauración y severidad de la EII. Aunque sutiles, las diferencias apuntan una mayor afectación en la mujer por EC y en el hombre por CU [132, 133].
- Raza. Estudios realizados han demostrado una susceptibilidad a la EII comparable entre las razas negra y caucásica, cuando todos los individuos siguen un estilo de vida occidental comparable [134]. Existe una asociación significativa entre la condición judía y una mayor susceptibilidad a padecer la enfermedad en comparación con cualquier otra raza [135-137]. Dicha parece debida a factores estrictamente genéticos parecen ser los responsables [138].
- Procesos infecciosos. Las bacterias del género *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Mycoplasma* o *Listeria monocytogenes*, podrían tener un papel como factor desencadenante de la EII [139-142]. En ratones se asoció la infección con *Mycobacterium avium* con una inflamación similar a la enterocolitis necrotizante [143]. Algunas cepas de *E. coli* con capacidad adherente e invasiva sobre el epitelio intestinal se han aislados preferentemente de pacientes con EC, sin embargo hasta la fecha no se ha conseguido establecer una relación consistente [144-147]. Sorprendentemente, la presencia de *H.*

*pylori* en el tracto gastrointestinal se asocia con un cierto papel protector ante el desarrollo de la EII [148], aunque hay resultados controvertidos en ese sentido [149].

### 3.2 Etiología.

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

#### 3.2.1 Factores genéticos.

La EII tiene un alto componente genético observable tanto en la elevada tasa de agregación como en la mayor susceptibilidad de la población judía. Presentar un historial familiar positivo para la enfermedad es hoy en día el factor de riesgo independiente más relevante a considerar. En el caso de la EC el riesgo de desarrollar la enfermedad ante un caso positivo en un familiar de primer grado es de hasta el 35% [150, 151]. La evidencia más consistente acerca de la influencia de la predisposición genética en el desarrollo de cualquiera de las presentaciones clínicas de la EII, proviene de estudios realizados con gemelos monocigóticos [152, 153]. No obstante, incluso en este caso, la patología no concuerda en su totalidad entre individuos, lo cual da idea del carácter multifactorial de ésta y de lo significativo de la contribución relativa de los factores ambientales en el inicio de la misma [154-156].

Actualmente el modelo de herencia genética que mejor se ajusta es uno de tipo multi-*locus* u oligogénico. Estudios recientes, basados en la realización de *genome-wide association study* (GWAS) han elevado el número de *loci* asociados con la EII en más de 160, estando muchos de ellos a su vez relacionados con otros desórdenes de carácter autoinmunitario como la espondilitis anquilosante y la psoriasis, así como con una mayor susceptibilidad a infecciones por micobacterias [157].

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

El gen para la *nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2* (NOD2) es probablemente el que ha sido más estudiado, principalmente por la gran fuerza de asociación que ha mostrado respecto a la EC [158]. Este gen codifica uno de los receptores tipo NOD (nucleotide binding oligomersitiation) más relevantes, por lo que una mutación puede generar un cambio sustancial en la percepción del muramildipéptido (MDP) de naturaleza bacteriana, siendo esto relevante en células como las presentadoras de antígenos (APC) y principalmente las células de paneth. A día de hoy han sido descritas tres mutaciones en este gen (Arg702Trp, Gly908Arg y Leu1007insC) que, en términos patológicos, se relacionan con inflamación localizada en íleon y en ningún caso en colon, lo que justifica que dicha asociación quede restringida a la EC [159, 160].

Otro gen cuya mutación se ha mostrado fuertemente asociada con la EII es el que codifica la subunidad específica del receptor de la IL23 (IL23R). Este gen presenta varias mutaciones que determinan cambios sustanciales en la susceptibilidad a la EC y la CU, aunque en menor medida para la segunda [157]. La IL23 es producida fundamentalmente por macrófagos y células dendríticas, mientras que el receptor lo expresan estas mismas células, así como las células *natural killer* (NK) y las células linfoides innatas (ILC). Sobre macrófagos y células dendríticas la IL23 aumenta su actividad como APC. El IL23R de células *T helper 17* (Th17) regula la producción de IL17 e IL22 que juegan un papel relevante en la fisiopatología de la EC, justificando que las mutaciones que generan un receptor menos sensible a IL23 tienden a implicar cierta protección frente a la EC [161, 162], mientras que las de mayor sensibilidad se asocian con la esta patología [163]. La importancia del IL23R se ha demostrado haciendo uso del modelo de colitis inducida por sulfato de dextrano sódico (DSS) [164] y mediante el uso del modelo de colitis espontánea en animales IL10 KO [165].

Por último, hay múltiples genes de susceptibilidad a la EII que codifican proteínas decisivas en el desarrollo de las respuestas inmunológicas adaptativas. En línea con este concepto, en los genes STAT3, IL2RA, IL12B e IL18R1 se han encontrado variantes asociadas a la EC y/o CU [166]. También el gen codificante de la IL10 tiene variantes con asociación a EC y CU al verse afectado su papel inmunoregulador [167]. Independientemente de los genes relacionados con el SI, existe un grupo de ellos que intervienen en la regulación de la autofagia, destacando el polimorfismo (rs2241880) del gen de la *autophagy-related protein 16-1* (ATG16L1), que se encuentra muy asociado con la localización iliaca de la EC [168]. En concreto, la mutación *T300A* se asocia con una menor capacidad fagocítica para la destrucción de antígenos bacterianos y con una menor producción de péptidos antibacterianos



por parte de las células de Paneth [169]. El hallazgo de estos genes implicados en la autofagia, ha iniciado investigaciones enfocadas a dichos procesos [170].

### 3.2.2 Factores ambientales.

#### 3.2.2.1 Microbiota intestinal.

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

La microbiota ejerce un papel determinante en la EII como se puede deducir de la estricta dependencia de esta para el desarrollo del proceso inflamatorio en varios modelos de colitis espontánea, la descripción de cierta disbiosis intestinal típicamente asociada a los pacientes con EII, y finalmente, de la eficacia terapéutica de la microbiota intestinal, destacando el uso de prebióticos, probióticos y los trasplantes de microbiota fecal [171].

La disbiosis intestinal se caracteriza por una reducción en la diversidad bacteriana, siendo poco frecuente encontrar bacterias de los géneros *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, así como *Clostridium coccoides* y *Clostridium leptum*, con buena representación en condiciones normales [172, 173].

Sin duda la gran incógnita con respecto a la disbiosis es si esta es la causa o la consecuencia de la inflamación crónica intestinal. Las evidencias invitan a pensar preferentemente en la segunda posibilidad, de forma que sería la susceptibilidad genética del hospedador unida a diferentes factores ambientales la que determinaría un desequilibrio que genera un contexto inflamatorio. En este contexto inflamatorio, se produce una alteración importante en la producción de mediadores solubles por parte del hospedador que, en condiciones normales, contribuyen al equilibrio que la mucosa intestinal establece con la microbiota, justificándose de esta manera una disbiosis. Sin embargo, el hecho de que la mayor parte de las variantes genéticas asociadas con la EII se encuentren en genes que codifican proteínas implicadas en el reconocimiento y la respuesta ante antígenos presentes en la luz intestinal, caso de NOD2, IL23R o ATG16L1 antes descritos, hace que no se pueda descartar la posibilidad de que alteraciones cualitativas en la microbiota colaboren al menos en parte en la instauración de la inflamación intestinal [174-177].

### 3.2.2.2 Estrés

El sistema nervioso entérico controla la motilidad, transporte hidroelectrolítico y la microcirculación del tracto gastrointestinal [178]. Las investigaciones en este aspecto han terminado por definir al estrés como un factor escasamente implicado en la iniciación de la EII, pero que parece ser importante en cuanto a precipitar la recidiva de un paciente en remisión. La base fisiológica que fundamenta esta asociación recae por un lado en un aumento de las descargas de naturaleza colinérgica en dicho sistema nervioso entérico que se traduce en un aumento de la motilidad intestinal [179, 180] y de la secreción hidroelectrolítica [181], y por el otro en un aumento de los niveles de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y por ende de cortisol. Un aumento de CRH, y por tanto de cortisol, ejerce efectos inmunomoduladores que pueden alterar la homeostasis intestinal. La CRH actúa sobre los mastocitos produciendo la liberación de múltiples mediadores solubles que comprometen la función de barrera intestinal (FBI) al aumentar la permeabilidad transcelular [182]. En consecuencia, se ha observado que la administración de un bloqueante inespecífico de los dos subtipos de receptores para la CRH presenta un efecto antiinflamatorio consistente en un modelo de colitis inducida por la administración de la toxina A de *Clostridium difficile* [183]. Por otro lado, existen múltiples evidencias experimentales que relacionan la exposición crónica de roedores a diferentes modelos de estrés con una mayor susceptibilidad al modelo de colitis inducida por DSS [184-186]. Atendiendo a estas evidencias, se han realizado algunos estudios epidemiológicos tratando de establecer una conexión entre el éxito terapéutico en el control del estrés o la ansiedad y una menor tendencia a la recidiva en pacientes con EII, pero no se han obtenido resultados concluyentes en ningún sentido [187-189].

### 3.2.2.3 Dieta

Hasta la fecha se han realizado multitud de estudios, todos arrojando resultados negativos, orientados al establecimiento de relaciones de causalidad entre el consumo de alimentos como la leche y otros productos lácteos, cereales, margarina e incluso bebidas refrescantes carbonatadas, con una mayor susceptibilidad a la EII. En general, todos estos estudios han tratado de relacionar la dieta occidental, caracterizada por un desequilibrio nutricional a favor de los hidratos de carbono, con una mayor incidencia de EII. De hecho, hay algunos estudios que han conseguido encontrar cierta asociación con una mayor incidencia de CU [190, 191]. Un desequilibrio en el componente lipídico de la dieta y del balance cualitativo de los ácidos grasos del mismo, podría ser la causa subyacente de dicho fenómeno

[192, 193], en la medida que existen estudios que apuntan a un efecto beneficioso de los ácidos grasos  $\omega$ -3 en la inflamación intestinal [194-198].

La lactancia materna reduce significativamente en el lactante el riesgo de padecer tanto EC como CU [199, 200]. Diversos mecanismos pueden explicar al menos en parte esta asociación, destacando por un lado la composición rica en proteínas y oligosacáridos con capacidad inmunoestimulante [201], su riqueza en *transforming growth factor*  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) que promueve la polarización de células T *cluster of differentiation 4* (CD4) hacia el subtipo Treg que promueve la tolerancia antigénica [202], su alto contenido en inmunoglobulina A soluble (sIgA) y en CD14 soluble que contribuye a la defensa inespecífica de la mucosa intestinal del lactante [203-205], la microbiota que aporta de forma directa y que colabora en la conformación de una adecuada diversidad bacteriana en el intestino del neonato [205], e incluso el refuerzo directo de la FBI debido al efecto de algunos péptidos contenidos en ella que aumentan la expresión de proteínas de las uniones estrechas como la claudina 4 (CLD4) o la ocludina [206, 207]. Además, hay que considerar que la leche materna contiene una cantidad significativa de cortisol que favorece la maduración final del sistema gastrointestinal del neonato. Finalmente, es importante tener en cuenta que la realización de la lactancia materna completa implica un retraso en la introducción de la leche de vaca, lo que puede influir en el riesgo de forma independiente [208, 209].

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

### 3.2.2.4 Tabaco

El único factor ambiental cuyos datos epidemiológicos son lo suficientemente concluyentes para establecer una relación directa y fiable con una mayor o menor susceptibilidad a la EII es el tabaco. En concreto, está establecido un papel protector del consumo de tabaco respecto al desarrollo de CU [210, 211], siendo el porcentaje de fumadores entre los pacientes de CU solo del 10-15% [212]. Por el contrario, este mismo factor se asocia con un riesgo elevado ante el desarrollo de EC y con un peor pronóstico en los casos en los que ésta ya se ha diagnosticado [213-216]. El efecto protector mostrado por el tabaco en la CU parece deberse a los múltiples efectos inmunomoduladores de la nicotina, que ha mostrado efectos antiinflamatorios disminuyendo la producción de citoquinas como la IL8 o la IL1 $\beta$  [217], entre otros [218, 219].

### **3.2.2.5 Apendicectomía**

En la actualidad está descrita una disminución de la incidencia de la CU, una aparición más tardía de ésta y un perfil de enfermedad menos agresivo, así como una menor tasa de recidivas, entre los pacientes sometidos a apendicectomía, sobre todo si la intervención se produce durante las primeras etapas de la vida [220-225].

### **3.3 Inmunología de la EII.**

El tracto gastrointestinal es la superficie del organismo humano expuesta al medio externo de mayor extensión (alrededor de 200 m<sup>2</sup>). El objeto principal del sistema inmune (SI) es diferenciar lo propio de lo ajeno mientras el tracto gastrointestinal preserva la habilidad de digestión y absorción de nutrientes, fluidos y electrolitos a través de la mucosa [174]. El reto consiste en mantener la capacidad para responder a organismos potencialmente patógenos al tiempo que se tolera esa mayoría de antígenos no dañinos.

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

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

#### **3.3.1 Homeostasis inmunológica en el intestino sano.**

##### **3.3.1.1 Microbiota intestinal y tolerancia oral.**

Las bacterias comensales son capaces de modular la expresión de genes involucrados en diferentes funciones intestinales como la absorción de nutrientes, el fortalecimiento de la barrera mucosa, el metabolismo de xenobióticos, la angiogénesis o la maduración intestinal postnatal [156]. Esta relación simbiótica se establece durante los primeros 2 o 3 años de vida. Los mecanismos responsables del establecimiento y mantenimiento de la tolerancia oral hacia la microbiota y los antígenos procedentes de la dieta no están del todo claros [226].

##### **3.3.1.2 Barrera epitelial**

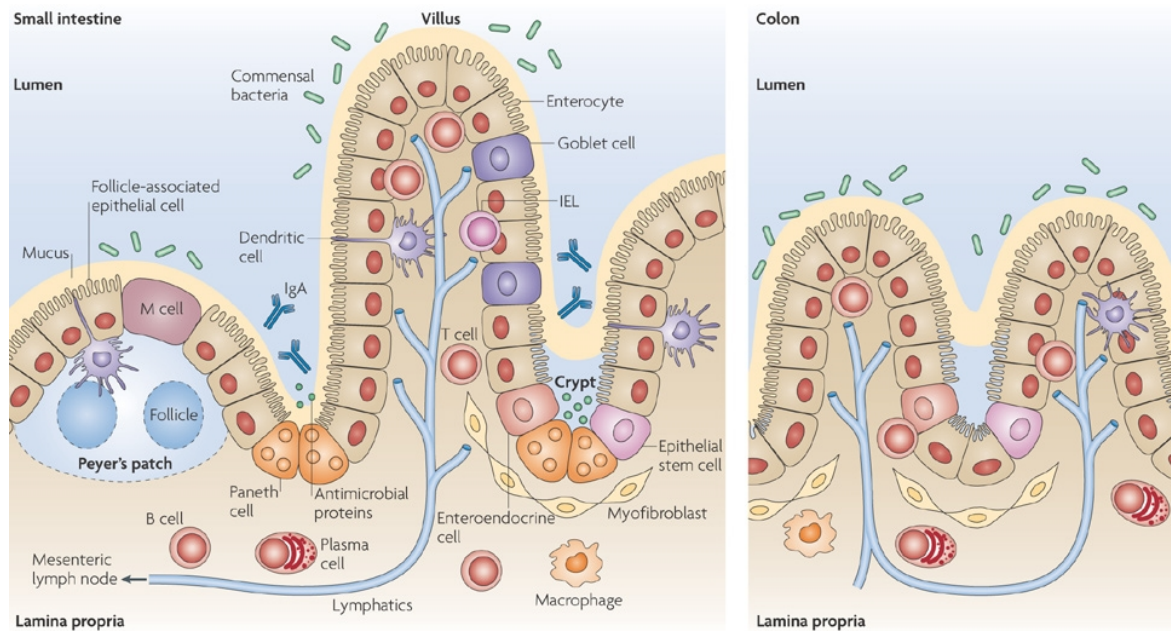
La barrera epitelial está compuesta por una monocapa celular heterogénea en cuanto a la naturaleza y especialización funcional de las células que la forman.

Todas ellas provienen de células madre pluripotenciales localizadas en las criptas de Lieberkühn [227], que proliferan continuamente permitiendo la renovación del epitelio que se completa en un periodo de 2-5 días [228]. Así, mediante la división de células pluripotenciales de las criptas se generan células que escalan dentro de la monocapa en dirección al borde apical. Paralelamente a la proliferación estas células van a sufrir un proceso de maduración selectiva regulado por distintos factores como la señalización de glucocorticoides de origen adrenal o local intestinal [229], las señales *wnt* y *neurogenic locus notch homolog protein* (NOTCH) [230-233] y la propia señalización de los antígenos de la microbiota comensal. Este proceso de transición progresiva desde un estado proliferativo hacia un estado madurativo-diferenciado, terminará dando lugar a los tipos celulares que componen el epitelio de la mucosa intestinal: enterocitos o células entero-absortivas (IEC); células caliciformes, productoras de moco; células de Paneth, destacadas por la secreción de péptidos antimicrobianos; y células enteroendocrinas, que son capaces de producir hormonas que conectan el tracto gastrointestinal con el sistema nervioso entérico.

Justo bajo el epitelio intestinal, a nivel de la *lamina propria*, podemos encontrar células estromales, células B (específicamente células plasmáticas productoras de inmunoglobulina A (IgA)), células T (linfocitos de la *lamina propria*), macrófagos y células dendríticas. Además, subpoblaciones especializadas de células T (linfocitos intraepiteliales) y algunas células dendríticas se localizan entre las IECs, estratégicamente posicionadas para detectar el contenido luminal [234-236] (esquema 5).

El movimiento de sustancias a través del epitelio intestinal se produce tanto por un transporte transcelular, mediante bombas y canales de membrana específicos, como paracelular, controlado por complejos proteicos de membrana denominados uniones estrechas (TJ, *tight junctions*), las cuales además mantienen la estructura polarizada de las IECs [237].

Originariamente se pensaba que la mucosa intestinal, y en general el epitelio, funcionaba únicamente como barrera ante una invasión bacteriana. Sin embargo, actualmente se reconoce que las IECs, junto con el resto de células del epitelio intestinal, mantienen una compleja y recíproca relación beneficiosa con la microbiota. Recientes estudios muestran cómo el epitelio intestinal no sólo tolera la presencia de antígenos con patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) procedentes de bacterias comensales sino que además, aprovecha señales procedentes de la microbiota entérica para el mantenimiento de la FBI [238].



Nature Reviews | Immunology

Esquema 5. Anatomía del sistema inmune intestinal. [235]

### 3.3.1.3 Reconocimiento antigénico e inmunorregulación

El reconocimiento y procesamiento de antígenos luminales comienza a nivel epitelial [239]. El epitelio intestinal expresa de forma constitutiva varios tipos de receptores con una estructura conservada evolutivamente, denominados receptores de reconocimiento de patrones (PRR; *pattern recognition receptor*). Estos receptores son capaces de reconocer PAMP como el LPS, el peptidoglicano, el ácido lipoteicoico, ácido ribonucleico (RNA) de doble y simple hebra o DNA no metilado (CpG). Las tres grandes familias de PRR incluyen los TLR (receptores tipo Toll; *Toll-like receptors*), los NLR (receptores tipo NOD; *Nod-like receptors*) y los RLR (receptores tipo RIG; *RIG-1-like receptors*).

Los TLR reconocen patógenos a nivel de la membrana celular y en endosomas (esquema 6), mientras que NLR y RLR los detectan en el citosol. Los TLR fueron descritos por primera vez en la mosca de la fruta [240, 241]. Los TLR están individualmente especializados, pero considerados en conjunto son capaces de reconocer la mayor parte de PAMPs. En colon humano, se ha detectado, principalmente por inmunohistoquímica, que las IECs expresan bajos niveles de TLR2 y TLR4 [242-244] en condiciones normales, mientras que TLR5 y TLR3 parecen estar ampliamente expresados a nivel proteico [243]. Por otro lado, casi todos los TLRs se han detectado a nivel de expresión de RNAm (RNA mensajero) en tejido colónico humano. Además, la expresión de TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 y TLR9 también se ha detectado en IECs de intestino delgado humano [242].

En la EII se producen alteraciones en la expresión de TLR. Las IECs procedentes de pacientes con EII mostraron una expresión muy elevada de TLR4 y similar o baja expresión de TLR2, TLR3, TLR5 y TLR9 [243, 245-247] respecto a pacientes sanos. Por otro lado se ha demostrado que las citoquinas inflamatorias regulan la expresión de TLR en IECs [247-250] lo que puede dar lugar a una expresión selectiva de los receptores en función del tipo de peligro [251]. Estudios recientes muestran que interferón  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) y TNF $\alpha$  inducen la transcripción de TLR4 y su correceptor *lymphocyte antigen 96* (LY96)[247, 249], mientras que IL4 e IL13 disminuyen la respuesta de las IECs al LPS, ligando del TLR4, sugiriendo que las citoquinas tipo Th2 disminuyen la expresión de TLR4 por IECs [248, 252]. Estudios que comparan ratones libres de gérmenes (GF del inglés *germ-free*) con ratones convencionales indican que las bacterias comensales inducen la expresión de ciertos TLR (TLR2, TLR3, TLR4 y TLR5) [253]. 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 [254].

La expresión de TLR en el intestino está también regulada de forma espacial, es decir existe expresión polarizada, apical o basolateral. Aunque la expresión de TLR2 y TLR4 es baja en colon adulto normal [243], TLR4 se expresa intensamente en la cara apical de IECs colónicas procedentes de pacientes con EC, aunque no con CU [243]. *In vitro*, TLR5 se expresa solamente en la cara basolateral [255-257]. En consecuencia, la flagelina luminal sólo podría activar al TLR5 tras daño en la barrera epitelial [257]. Sin embargo, otro estudio indica que TLR5 está presente en la cara apical de íleon de ratón [258]. En cuanto al TLR9, su estimulación apical da lugar a una inhibición de NF- $\kappa$ B, mientras que una estimulación basolateral lo activa. De hecho, la activación apical del TLR9 inhibe la respuesta inflamatoria desencadenada tras la estimulación basolateral, alcanzando lo que se conoce como un estado de tolerancia cruzada (*cross-tolerance*). Esto sugiere que no solo la localización, sino también la función de los TLR puede ser polarizada [256].

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





es incierta, ya que ratones sin la forma activa de las  $\alpha$ -defensinas o sin células de Paneth no desarrollan espontáneamente inflamación intestinal crónica [268, 269].

### 3.3.1.4 Procesamiento antigénico

Las células M (*villous microfold cells*) funcionan como canales conduciendo los antígenos hacia las APCs, las cuales captan, procesan y dirigen los antígenos hacia tejidos linfoides periféricos subyacentes (placas de Peyer en el intestino delgado y folículos linfoides en el colon) donde se inicia la respuesta inmunológica adaptativa. Aunque las células M son la vía más estudiada y conocida para el paso de antígenos a través del epitelio intestinal, en el intestino delgado concretamente, existen otras vías recientemente revisadas [270]. Una vía de paso es asociada a células caliciformes y otra las denominadas fugas paracelulares (*paracelullar leak*), mediante las cuales antígenos de pequeño tamaño (menores de 10kDa), llegan directamente a los nódulos linfáticos mesentéricos donde las células dendríticas residentes los captan y se desarrolla la respuesta inmunológica; además, las células dendríticas de la *lamina propria* tienen la capacidad exponer las dendritas a la luz intestinal adquiriendo la capacidad de reconocer antígenos directamente a ese nivel [271] (esquema 5).

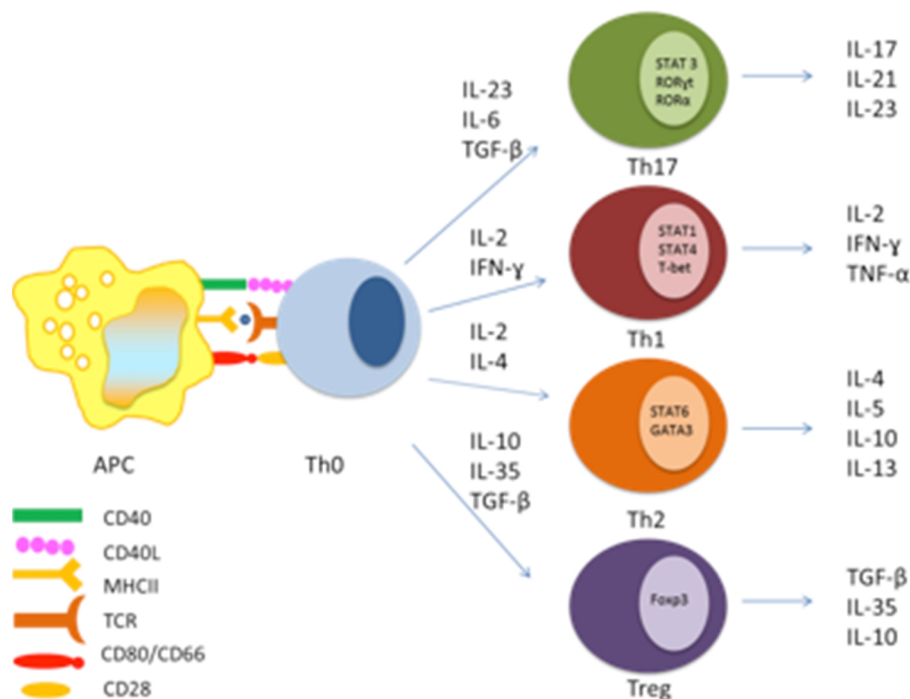
Las células dendríticas son células clave en el control de la inmunidad o tolerancia hacia bacterias comensales. En individuos sanos, tras el reconocimiento de antígenos comensales las células dendríticas muestran un fenotipo inmaduro (baja expresión en su superficie de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II [MHC-II] y de miembros de la familia B7: CD80 y CD86) y por tanto inducen ausencia de repuesta (anergia) en las células T *naïve* (Th0) [272]. Estudios *in vitro* sugieren que las células dendríticas interactúan con ciertas cepas bacterianas probióticas produciendo IL10, lo que induce una respuesta reguladora en lugar de efectora [273]. Ante estímulos de bacterias no comensales, las células dendríticas maduran y adquieren un fenotipo activado, expresando altos niveles de moléculas MHC-II y B7 en su superficie, así como moléculas estimuladoras, lo que les permite llevar a cabo las señales necesarias para la activación de células T *naïve* hacia células T efectoras [274].

### 3.3.1.5 Diferenciación de linfocitos T colaboradores

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

colaboradoras. Siguiendo este patrón, las citoquinas IL12, IL18, IL23 y  $TNF\alpha$  dirigen la polarización hacia el subtipo Th1 que producirán citoquinas proinflamatorias de tipo Th1 (IL2,  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$ ), las cuales participan en la perpetuación de la reacción inflamatoria; la diferenciación hacia el subtipo Th17 está mediado por IL6 y cantidades reducidas de  $TGF-\beta$  [275-278]. Estas células presentarán un fenotipo caracterizado por la expresión de IL17, IL22 o IL21.

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



Esquema 7. Diferenciación de linfocitos T colaboradores.

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

Además, la activación de macrófagos y células epiteliales también conlleva la producción de quimioquinas que van a crear un gradiente quimiotáctico que favorece la extravasación y la llegada de leucocitos desde el torrente sanguíneo hasta el foco inflamatorio [279].

### 3.3.2 Disfunción del SI intestinal.

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

#### 3.3.2.1 Eventos primarios.

En primer lugar, varios estudios han demostrado una menor resistencia epitelial y una permeabilidad incrementada en la barrera epitelial de mucosas de pacientes con EC y CU [280]. Estos defectos preceden al inicio clínico de la enfermedad en pacientes con riesgo familiar [281]. Defectos en la permeabilidad también han sido evidenciados en pacientes sanos con antecedentes familiares de primer grado y con la mutación en el gen NOD2, implicando un defecto genético [282]. Varios mecanismos han sido propuestos como desencadenantes del incremento de la permeabilidad, desde una alteración de las uniones estrechas mediada por células T hasta una disfunción neuronal entérica [280, 283-286].

En segundo lugar, pacientes con EII presentan un SI innato alterado. TLR3 se encuentra disminuido en EC, pero no en CU, mientras que TLR4 está aumentado en ambas [287]. Posiblemente debido a su expresión en la cara basolateral, la expresión de TLR5 está generalmente suprimida en la EII. Sin embargo, en la mucosa dañada la flagelina puede acoplarse al receptor y agravar la inflamación [288]. También se ha observado un incremento en la expresión de NOD2 en IECs, lo que puede ser consecuencia de la activación de la cascada de NF- $\kappa$ B, que puede comprometer la habilidad de la mucosa para la eliminación de patógenos, dando lugar a una inflamación crónica [263, 264].

En tercer lugar, el reconocimiento de antígenos y el procesamiento por APCs están alterados en la EII. Estudios *in vivo* e *in vitro* sugieren que las células dendríticas reconocen de forma incorrecta las bacterias comensales, induciendo una respuesta inflamatoria tipo Th1 y posiblemente Th17. De hecho, se ha observado un incremento en la expresión de TLR4 en células dendríticas en la EII [289]. Se ha demostrado un incremento en la frecuencia de APCs con fenotipo activado o maduro en la mucosa inflamada [289], así como una escasez de APCs circulantes inmaduras, potencialmente tolerogénicas [290]. En células dendríticas humanas

procedentes de pacientes con EII se ha observado un incremento en la expresión de marcadores de destino al intestino (*gut homing*), y una respuesta aberrante a estímulos tipo LPS o CpG [290]. Esta ausencia en la capacidad de regulación de estas células puede contribuir a una activación repetida de ciertas células T memoria, perpetuando la inflamación [274, 291].

En cuarto lugar, las APCs no profesionales como IECs, que en condiciones normales inducen anergia en células T CD4+, adquieren un fenotipo activado y un aumento en la expresión de moléculas de histocompatibilidad en presencia de citoquinas como IFN $\gamma$  o TNF $\alpha$ , quizás por la pérdida de moléculas B7 (CD80, CD86) [292]. Se ha observado que las IECs de pacientes con EII también expresan moléculas coestimuladoras alternativas, transformándolas en APCs funcionales. De hecho, se ha comprobado una activación de células T por IECs a través de vías alternativas no dependientes de MHC-II, como por ejemplo a través de la molécula CD1d, siempre que los antígenos alcancen la cara basolateral de las IECs donde se expresa esta molécula [293].

En quinto lugar, en la EII existe un defecto en el proceso de aclaramiento de células T autorreactivas. Debido a un fallo en la tolerancia central y periférica, las células T activadas persisten y no entran en apoptosis. Esta persistencia ha sido observada en pacientes con EC y de hecho está siendo actualmente abordada con terapias que actúa rompiendo este ciclo de activación [294, 295].

En sexto lugar, en el paciente de EII existe una incapacidad para controlar el estado de inflamación fisiológica en el intestino, y por consiguiente, esta reacción se perpetúa, dando lugar a la inflamación crónica. Además, existe un desequilibrio entre células T reguladoras y efectoras en la EII. En períodos activos de la enfermedad, las células T efectoras (Th1 y Th2) predominan sobre las reguladoras como consecuencia de un predominio en la diferenciación de células Th0 hacia Th1 (en la EC) [296]. En la UC, se ha detectado un incremento en el número de células NK activadas productoras de IL13 e IL5, perpetuando así la inflamación [297].

### 3.3.2.2 Eventos secundarios

Las vías inflamatorias iniciadas por los eventos anteriormente descritos convergen en una serie de eventos finales comunes. En primer lugar, en la EII se ha detectado una migración de células inflamatorias desde la vasculatura hacia la mucosa intestinal, siendo las principales responsables de tal migración las APCs profesionales y no profesionales. Este proceso se inicia con la liberación de moléculas quimioatrayentes tales como IL8, MIP-1 $\alpha$  y  $\beta$  (*macrophage inflammatory*

*protein*), RANTES (*regulated on activation normal T cells as secreted*) o MCP-1, 2 y 3 (*monocyte chemoattractant proteins*), que inducen cambios conformacionales en moléculas de adhesión de linfocitos, (integrina  $\alpha 4\beta 7$  o el receptor de quimioquinas 7) y de granulocitos (L-selectinas). Al mismo tiempo, citoquinas proinflamatorias como TNF $\alpha$  o IL1 $\beta$  secretadas por macrófagos activados inducen la expresión de moléculas de adhesión a nivel del endotelio vascular de la mucosa, promoviendo la adhesión leucocitaria y su extravasación al tejido [298, 299].

En segundo lugar, una gran cantidad de metabolitos y mediadores (NO, radicales de oxígeno, prostaglandinas, leucotrienos, histamina, proteasas y metaloproteasas) se acumulan en la mucosa produciendo daño tisular [300-303].

En tercer lugar, además de la inflamación intestinal, la EII se acompaña de una gran variedad de síntomas que afectan a distintos órganos más o menos distantes del tracto gastrointestinal. La mayor parte de estos síntomas se deben al efecto de las citoquinas proinflamatorias producidas en exceso durante la inflamación intestinal. Entre ellos se encuentran la respuesta de fase aguda, la caquexia o la pérdida de peso [304, 305], alteraciones de los hábitos alimenticios como la anorexia [306] o fiebre [307]. Las consecuencias hematológicas son múltiples: anemia [308-316], alteraciones de la coagulación, cambios en los factores hemostáticos, trombocitosis y aumento de la agregación plaquetaria, o leucocitosis [317]. Existe una gran controversia en lo que se refiere a las leucemias o linfomas asociados a la EII, ya que existen evidencias que apoyan que el mayor riesgo observado se debe a uso de terapias inmunosupresoras y no a la propia enfermedad [318-320].

En cuarto lugar, la EII se asocia con un incremento en el riesgo de padecer cáncer colorrectal, como consecuencia del mantenimiento del proceso inflamatorio crónico. El riesgo es directamente proporcional a la duración, extensión y gravedad de la EII [321-323]. La base molecular que explica la relación en cuestión está siendo investigada en profundidad en la actualidad. El factor de transcripción nuclear NF- $\kappa$ B se presenta como uno de los puntos clave en dicho fenómeno [324].

### **3.4 Glucocorticoides en el tratamiento de la EII.**

Los GC se usan en el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas desde hace décadas en virtud de sus efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores. Con el transcurso del tiempo se han desarrollado análogos sintéticos con mayor potencia antiinflamatoria, sin embargo, su uso se ve limitado por el amplio perfil de efectos adversos que presentan [325]. En la terapia de la EII los GC juegan un papel central,

pero su uso implica importantes riesgos que suponen un reto importante para el clínico.

Los GC son insustituibles dentro del manejo clínico de la EII, incluyendo tanto CU como EC, en las que son usados en la inducción de la remisión [326]. En general, los pacientes con EII se clasifican en tres grupos en función de su respuesta a la terapia con GC, pudiendo distinguirse entre pacientes respondedores, dependientes y no respondedores. Los primeros mejoran clínicamente tras una semana de tratamiento, entran de forma efectiva en remisión y se mantienen en dicha situación conforme se les van retirando progresivamente los GC. Los dependientes de la terapia, en cambio, responden del mismo modo en un principio pero luego sufren una recidiva inflamatoria asociada a la retirada del tratamiento.

Finalmente, los pacientes no respondedores no muestran mejoría clínica alguna independientemente del GC usado, dosis o tiempo de duración de la terapia, siendo el criterio específico para catalogarlos como tales el comportamiento refractario ante la prednisona dosificada a 40 mg/día. Este último tipo de pacientes supone alrededor del 20-30% del total de enfermos con EII [327], siendo esta una proporción similar a la encontrada en otros trastornos inflamatorios de carácter autoinmunitario, lo que parece reflejar un proporción de ausencia de respuesta a GC constante en la población en general [328, 329].

Los pacientes con EII producen cantidades elevadas de cortisol suprarrenal e intestinal producido localmente, si esta situación persiste durante mucho tiempo antes de la aplicación de los GC exógenos podría justificar al menos en parte la corticorresistencia. En los últimos años, se ha trabajado en encontrar algún parámetro predictivo sobre la capacidad de respuesta a GC de un determinado paciente, con objeto de adaptar las decisiones clínicas. Esto se ha intentado comparando la inhibición de la proliferación de células T *ex vivo* de pacientes refractarios y sensibles a GCs [330]. Por otro lado, las células polimorfonucleares de sangre periférica de pacientes con EII que responden a GC son más sensibles a la inhibición mediada por estos fármacos de la respuesta a LPS, si se compara con los resultados de pacientes con historial clínico de no respuesta a GC. Por tanto, este es un parámetro que en un futuro podría ser utilizado para estimar la pertinencia del uso de los GC en un determinado paciente en virtud de su sensibilidad [331].

Los GC están indicados en la EII cuando se produce una recidiva de la sintomatología para inducir el retorno al estado de remisión. No obstante, en algunos pacientes que muestran dependencia de GC, estos se pueden mantener durante períodos más prolongados de las 1-3 semanas en las que se usan

normalmente (alrededor de 10 semanas en el caso exclusivo de la budesonida por su escasa distribución sistémica), pero incluso en estos casos se recomienda mantener al paciente preferentemente con inmunosupresores (azatioprina o 6-mercaptopurina) o bien con un fármaco biológico anti-TNF [332]. Es importante destacar que los GC no se usan como terapia de mantenimiento en el estado de remisión en la EC ni en la CU, no solo porque sus efectos adversos lo hacen inviable, sino porque son ineficaces para dicho propósito según indican diversos estudios clínicos [333-340].

### **3.5 Glucocorticoides locales en la EII.**

Las evidencias que hoy en día existen del papel de los GCs locales derivan del estudio de ratones deficientes en LRH-1 en diversos modelos de colitis experimental, así como las alteraciones que se producen de dicho receptor nuclear y la esteroidogénesis en el tejido inflamado de pacientes afectados por EII.

En modelos de colitis experimental asociados a un perfil de citoquinas Th1, destacando el modelo inducido por DSS o por ácido 2,4,6-trinitrobenzosulfónico (TNBS), se produce un fuerte incremento de la expresión de enzimas esteroidogénicas y la liberación de corticosterona, que parece estar implicado en una acción antiinflamatoria, pero no en un modelo Th2 como el de la oxazolona [65, 66]. La administración de TNF $\alpha$  exógeno en este modelo estimula la esteroidogénesis en las células epiteliales intestinales de un modo similar a como sucede en modelos como el DSS o el TNBS. En línea con el concepto anterior, los animales con delección condicional de LRH-1 específicamente restringida sobre las células epiteliales intestinales son más susceptibles a la colitis inducida por DSS y TNBS, debido esencialmente a una menor esteroidogénesis intestinal [341].

Para terminar, el análisis de biopsias intestinales de pacientes con EII reveló que, independientemente de que se trate de EC o CU (ya que ambas cursan con un notable aumento de TNF $\alpha$ ), se establece una correlación inversa entre la expresión de LRH-1 y enzimas esteroidogénicas clave en el proceso biosintético, y la gravedad de la respuesta inflamatoria [341].

## **4 Glucocorticoides y el entorno intestinal.**

La mayor parte de los estudios que se tienen sobre el efecto de los GC en el contexto intestinal derivan de las alteraciones intestinales que se producen en modelos experimentales de estrés [342]. El estrés está relacionado con una elevación de los niveles de GC endógenos en el contexto intestinal y de los agentes mediadores de esta respuesta como puede ser la CRH.

Acerca del efecto de los GCs en el modelo de colitis inducida por DSS, que será el usado en esta tesis doctoral, existe poca bibliografía al respecto excepto un artículo de nuestro grupo de investigación que profundizó en el papel de la budesonida en la colitis experimental en ratón [343].

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

El epitelio de la mucosa intestinal, por su rápida capacidad de renovación, es un tejido muy sensible al estrés y los GC. Un estímulo estresante durante un periodo corto de tiempo es suficiente para generar un epitelio intestinal influido por este fenómeno [344].

Se conoce que los GC pueden modular la expresión y/o distribución de las uniones estrechas. En el caso del estrés, se produce una distribución irregular de ocludina y *zonula occludens 1* (ZO-1) a corto plazo, así como una contracción del citoesqueleto celular dependiente de la activación de la *myosin like chain* (MLC) por el TNF $\alpha$  [345]. Es poco probable que los elevados niveles de GC justifiquen estos efectos, pues los GC tienden a reducir la disfunción asociada al TNF $\alpha$  [346]. Sin embargo, el estrés reduce la expresión de ZO-1 en las células epiteliales intestinales de un modo sensible a mifepristona y por ende directamente dependiente de GC [347].

Curiosamente, los GC presentan otros efectos sobre las células epiteliales intestinales que se traducen en un refuerzo de la función de barrera, destacando un aumento de la expresión de TLR2 que facilita la respuesta reconstitutiva del epitelio ante una agresión [348] y una protección ante el estrés asociado a retículo endoplásmico [349]. Por tanto, resulta comprensible que el modo en que los GC contribuyen a la disfunción en la barrera epitelial intestinal sea objeto de gran controversia.

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

Los pacientes bajo estrés psíquico o físico muestran un aumento de la presencia de electrolitos y agua en la luz intestinal [181, 350]. Esto se debe a la reducción de los procesos de absorción iónica con un aumento de la secreción. Estos efectos aparecen en los diferentes segmentos intestinales e indistintamente asociados a los modelos de estrés agudo y crónico [351, 352]. Los efectos de la CRH directos sobre el epitelio intestinal, e independientes de la síntesis de GC, parecen los responsables de estos efectos, ya que los antagonistas específicos de estos receptores, administrados intraperitonealmente corrigen las alteraciones antes mencionadas.



Asimismo, la administración de CRH exógena formulada para no atravesar la barrera hematoencefálica mimetiza la afectación intestinal asociada al estrés, actuando sobre sus receptores periféricos CRHR1 y CRHR2 [353]. Otra razón que sustenta la independencia de estas alteraciones respecto de los elevados niveles de GC circulantes, es que sus acciones directas sobre el transporte hidroelectrolítico intestinal son bien conocidas. Concretamente, estimulan sustancialmente los procesos de absorción, en especial de  $\text{Na}^+$  y, aunque en mucha menor medida, también lo hacen con la secreción de  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  [354].

Dentro de la fisiopatología de la EII y los modelos de colitis experimental, la inhibición de los procesos de absorción y secreción iónica intestinal están directamente relacionadas con la inflamación, que se traduce en la acumulación de agua en la luz intestinal y en diarrea. Los GC contribuyen por tanto a la compensación de dicha disfunción epitelial asociada a la inflamación, no solo mediante su acción antiinflamatoria, sino por su efecto directo sobre el transporte generando absorción electrogénica [355].

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

En modelos de estrés experimental se observa un compromiso de la función de barrera y cierta inflamación intestinal, así como un incremento en la susceptibilidad en diferentes modelos de colitis experimental como el TNBS [356] y el DSS [184, 186, 357], estando estos últimos fenómenos relacionados en parte con un efecto estimulante de la CRH sobre los linfocitos de *lamina propria*.

Los mecanismos que relacionan el estrés con un intestino más permeable son básicamente dos. Por un lado, en el intestino de un animal sometido a estrés experimental se produce un aumento del número total de mastocitos y de su grado de desgranulación [358, 359]. La secreción del contenido granular de este tipo celular parece ser decisiva en el desarrollo de los cambios morfológicos, inflamatorios y de permeabilidad que se producen en el intestino de los animales estresados, ya que ratas deficientes en mastocitos sometidas a estrés no muestran dichas disfunciones. Este fenómeno es independiente de la acción de los GC endógenos, estando asociado en exclusiva a la acción de la CRH sobre los receptores CRHR1 y CRHR2 presentes en los mastocitos subepiteliales [182, 354]. Por otro lado, la barrera fisicoquímica de moco situada en contacto con el borde apical de las células epiteliales intestinales también se ve afectada. Por un lado la CRH promueve una depleción en el número de células caliciformes [360], al tiempo que los GC y la propia CRH inducen un aumento de expresión de mucinas y por tanto de secreción

de moco por parte de las mismas [361]. A corto plazo, dicha estimulación funcional de las células caliciformes puede contribuir a la función de barrera epitelial intestinal, pero se ha demostrado que en modelos de estrés más prolongados en el tiempo la reducción en su número genera un efecto opuesto que se traduce en un incremento de la adhesión bacteriana sobre el epitelio.

En general, la existencia de mucha más literatura describiendo la contribución de la CRH en las disfunciones intestinales asociadas al estrés, induce a pensar que esta es la responsable casi en exclusiva de este fenómeno. Sin embargo, aunque más escasos, también hay estudios que revelan como la adrenalectomía o la inhibición farmacológica de la esteroidogénesis reduce significativamente la afectación intestinal asociada al estrés experimental [362]. Además, la administración de GC a animales sanos produce síntomas intestinales que recuerdan a algunos de los ya mencionados, como el aumento de la adhesión bacteriana a la superficie epitelial y su tendencia a la translocación a tejidos extraintestinales [363, 364].

#### **4.4 Microbiota, estrés y glucocorticoides.**

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

La influencia es bidireccional, ya que el estrés produce cambios cualitativos en la microbiota intestinal, que hacen más sensibles al animal a otros modelos experimentales de estrés y también a modelos de colitis de naturaleza infecciosa como la inducida por *Citrobacter rodentium* [365].

Con respecto a los GC exógenos, la administración de dexametasona exógena tiende a incrementar la proporción relativa de bacterias aerobias Gram (-), anaerobias totales y de lactobacilos [363, 364].

#### **4.5 Glucocorticoides en la inmunología intestinal.**

Los GC sintetizados en la corteza suprarrenal, así como los producidos de forma local en tejidos como la mucosa intestinal, cerebro, epidermis o timo, juegan un papel clave en la regulación de la homeostasis inmunológica general y local. Este concepto se ve apoyado por dos factores: que la producción de hidrocortisona

endógena suprarrenal aumente hasta 10 veces ante situaciones de estrés intenso o infección grave, y que las acciones teóricamente fisiológicas y farmacológicas de estos sean mediadas por el mismo receptor.

### 4.5.1 Efectos de los GC sobre células epiteliales.

Las células epiteliales en general, y las intestinales en particular, son diana para los GC desde el desarrollo embrionario y durante la edad adulta. En estas, los GC favorecen la maduración del epitelio pulmonar, epidérmico e intestinal, no solo durante el desarrollo embrionario, sino también durante las primeras semanas de vida [366-368]. Precisamente, de estos efectos derivan algunas de las aplicaciones clínicas que presentan los GC.

La administración de GC exógeno durante el desarrollo favorece la formación de la barrera epidérmica, relacionándolo con una inducción madurativa [369, 370]. Además, mediante el uso de ratones GR KO, *knock in* GR<sup>dim/dim</sup> y con delección específica del GR en la epidermis, se ha mostrado que la epidermis de los ratones que no reciben GC durante su desarrollo muestra al nacer defectos graves en la función de barrera epitelial. Esta disfunción se acompaña de un estado inflamatorio basal e hiperproliferación epitelial que los hace más sensibles a la inflamación cutánea inducida por exposición a detergentes. Cabe destacar que este efecto no es dependiente de un fenómeno de *transactivación* o *represión clásica* mediada por el GR, ya que los ratones GR<sup>dim/dim</sup>, en los que no se da la homodimerización del GR ya unido a su GRE específico en cada caso, no muestran alteración alguna si se les compara con un ratón no modificado genéticamente [48, 371].

Sin embargo, hay evidencias de un papel perjudicial de los GC sobre la homeostasis del epitelio intestinal o dérmico. La exposición de la epidermis completamente desarrollada y madura a GC provoca severas alteraciones en la homeostasis de este epitelio, que conllevan un aumento de la permeabilidad y una función de barrera comprometida [372].

Por otro lado, las células cancerosas que componen los adenocarcinomas colónicos son capaces de producir de forma autónoma y constitutiva GC endógenos. En estas células el factor LRH-1 es decisivo, mediando tanto la esteroidogénesis, como su estado basal hiperproliferativo mediante mecanismos independientes entre sí. En los últimos años está comenzando a ser considerada la capacidad de las células tumorales intestinales para producir GC en su contexto local como un mecanismo específicamente utilizado por el tumor para evadir la

inmunovigilancia antitumoral y por tanto su propia destrucción, viéndose facilitado en ese sentido el desarrollo descontrolado del proceso neoplásico [373].

#### **4.5.2 Efectos sobre la colitis inducida en ratón.**

El artículo que se incluye en esta tesis doctoral [343] se estudió el efecto de distintas dosis de budesonida como tratamiento de la colitis experimental en ratón. La budesonida, por escasa distribución sistémica, fue el GC de elección en dichos experimentos. Los resultados fueron muy interesantes como precedentes de esta tesis doctoral mostrando que la budesonida, pese al efecto antiinflamatorio esperable, ejercía un efecto perjudicial aumentando el estado general del animal, la translocación bacteriana y la endotoxemia en el modelo de colitis inducida por DSS. Además, aumentó de manera sustancial el sangrado rectal y la pérdida de peso acompañado todo esto de un aumento de IL1 $\beta$  e IL6 en plasma.

Mediante inmunohistoquímica de bromodeoxiuridina se observó que la budesonida ejerció un papel inhibitor de la proliferación en las IECs. Este efecto pudo observarse también en la dosis de 12 $\mu$ g por ratón y día mediante una disminución de la expresión proteica de ciclina D1 y antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA). La función barrera se vio afectada por la budesonida aumentando la permeabilidad intestinal y disminuyendo la expresión proteica de claudina-2 y 4.

Es necesario destacar que estos resultados del papel perjudicial, aunque por otro lado antiinflamatorio, son principalmente en el modelo de colitis inducida por DSS, que es un modelo que afecta a las IECs en primer lugar generando una gran erosión, y en el que el papel de la reepitelización es más importante que en otros modelos. De hecho, en el modelo de colitis por transferencia linfocitaria la budesonida ejerce un papel beneficioso.

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

Las células endoteliales son elementos muy relevantes en la inmunología intestinal, determinan la integridad de la red microvascular que irriga la mucosa intestinal y controlan en parte la extravasación leucocitaria hacia el foco inflamatorio. El promotor del gen de la ocludina contiene un GRE simple, de modo que cuando el GR activado por GC se une al mismo se desencadena un fenómeno de transactivación [374]. Aunque ésta no es imprescindible para la formación de unas uniones estrechas bien desarrolladas a nivel estructural [375], la ocludina colabora en el adecuado ensamblaje de estas y en el control de la generación de poros [376, 377].

Las claudinas son proteínas que se integran dentro de la estructura de las uniones estrechas que regulan la función de barrera del endotelio vascular. Concretamente son las claudinas 1, 3, 5 y 12 las que se expresan en este tejido, siendo la CLD-5 la más importante en nuestro caso porque ejerce un papel positivo de cara a la función de barrera endotelial, reduciendo la permeabilidad paracelular. La expresión de CLD-5 se ve sustancialmente modificada por los GC [378-380].

La *vascular endothelial cadherin* (VE-cadherin) es el componente más importante de las *adherens junctions* (AJ), expresándose exclusivamente en el endotelio vascular, donde regula los procesos de adhesión mediados por  $\text{Ca}^{2+}$  [381]. El tratamiento de células vasculares endoteliales con dexametasona aumenta la expresión de VE-cadherin, aunque debe ser de forma indirecta pues el promotor de su gen carece de GRE [382]. Por tanto, globalmente los GC ejercen un papel beneficioso reduciendo la permeabilidad vascular [383].

Por otro lado, los GC reducen la extravasación leucocitaria en virtud de su capacidad para inhibir la expresión endotelial de proteínas de adhesión como *vascular cell adhesion 1* (VCA-1), *intercellular adhesion molecule* (ICAM-1, 2, 3), E-selectina y P-selectina [384-386].

Aparte de los efectos de los GC sobre el endotelio, estos inducen atrofia y una fragilidad en la microvasculatura del tejido óseo, piel y músculo esquelético [387-389]. Además, hay estudios *in vitro* que evidencian un efecto inhibitorio de la angiogénesis por parte de la corticosterona a concentraciones relativamente bajas que reflejan las condiciones fisiológicas, los cuales parecen estar asociados a una reducción en la expresión de *vascular endothelial growth factor* (VEGF), mayor expresión de MMPs e inhibición del desarrollo de la estructura tubular vascular, siendo todos estos efectos mediados por el GR [390, 391].

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

##### Células Dendríticas

Los GC inducen apoptosis en las células dendríticas (DC) que se encuentran en estado inmaduro, de un modo no dependiente de caspasas [392]. Sin embargo, no lo hacen sobre aquellas que ya están activadas por haber reconocido un PAMP o bien están recibiendo estimulación por parte de CD40L [393]. Los efectos sobre las DC activadas se caracterizan por una reducción en su recirculación hacia nódulos linfoides mesentéricos (MLN) [394], menor expresión de marcadores de activación como CD40, MHCII, CD80/86 y un perfil de producción de citoquinas atenuado [395, 396]. Todos estos efectos contribuyen a inducir un fenotipo tolerogénico en las

DC, caracterizado por producción de IL10 e inducción de anergia en aquellas células T con las que establecen sinapsis inmunológica [397, 398]. Por tanto, no es extraño que existan estudios que revelan cómo la dexametasona contribuye en la inducción de este fenotipo tolerogénico. La co-transferencia de DC que recibieron dexametasona *ex vivo* además de vitamina D3 suprimen el desarrollo del modelo de colitis por transferencia linfocitaria [399].

### Macrófagos

Las respuestas celulares de los macrófagos, son dependientes de la unión PAMP a sus receptores PRR. Dado que la señalización intracelular de estos últimos es muy dependiente del eje NF- $\kappa$ B/IRF3, el efecto inhibitorio de los GC se ha achacado a la modulación por "*tethering*" de estos factores de transcripción [400]. De hecho, se asume que los macrófagos expuestos a GC tienen un comportamiento inmunosupresor caracterizado por una mayor producción de IL10, mayor expresión superficial de Gr1 y el receptor propio de "*scavenger antiinflamatorios*" CD163, así como una menor expresión de receptor de quimioquina (C-X3-C motif) ligando 1 (CX3CR1), que es un receptor de quimioquinas propio de monocitos inmunológicamente activados [401].

#### 4.5.5 Efectos de los GC sobre los leucocitos polimorfonucleares.

Los efectos directos de los GC sobre los neutrófilos en un contexto inflamatorio se deben a una reducción de su extravasación e infiltración posterior en el tejido inflamado. Por un lado, los GC reducen la liberación de quimioquinas por parte de mastocitos y otras células mieloides, mientras que por el otro reducen la expresión de marcadores de "*rolling*" celular como *very late activation antigen 4* (VLA-4), *lymphocyte function associated antigen 1* (LFA-1) y *macrophage antigen 1* (MAC-1) en la superficie de los neutrófilos [384]. Independientemente de lo anterior, los GC curiosamente aumentan la producción de neutrófilos en la médula ósea y por tanto su presencia en el torrente sanguíneo, característica que es utilizada en la clínica para tratar la neutropenia en combinación con *granulocyte colony stimulating factor* (G-CSF) [402].

#### 4.5.6 Efectos sobre las células T.

El epitelio del timo es una fuente de GC local siendo decisivos en la modulación del proceso de selección de timocitos en dicho órgano. Las señalizaciones propias del TCR y la de los GC (ambas inductoras de apoptosis en este caso) se antagonizan mutuamente a nivel molecular en su señalización intracelular, esto recibe el nombre de "*antagonismo recíproco*". Por tanto, en los timocitos que expresan un TCR con

mucha apetencia por antígenos propios, la señalización de este no puede ser compensada por la de los GC locales del timo y por tanto entran necesariamente en apoptosis inducida por el TCR. En cambio, si el timocito presenta un TCR con escasa avidéz por antígenos propios, este entrará igualmente en apoptosis pero en este caso inducida por los GC. De esta forma, solo en aquellos timocitos que expresen un TCR con afinidad moderada por los antígenos propios, ambas señalizaciones se verán adecuadamente compensadas, no habrá inducción efectiva de apoptosis y dicha célula podrá sobrevivir evolucionando hacia la diferenciación. La controversia en relación con este sistema de selección tímica deriva de la aparición de varios estudios en los que la eliminación de la expresión del GR en las células T no generaba ninguna alteración a ese nivel [403, 404], lo que contradice los demás estudios [405, 406].

En las células T periféricas, por el contrario, sí se ha demostrado cómo una breve exposición a GC desorganiza el complejo multiproteico que utiliza el TCR para su señalización intracelular, probablemente debido a una interferencia cruzada de la proteína HSP90 y en todo caso independiente de un efecto del GR sobre la expresión génica [407, 408]. De hecho, existe un estudio que revela la necesidad del GR en estado quiescente en el citoplasma para una adecuada señalización del TCR, aunque otros investigadores han constatado señalización de TCR en ausencia de GR pudiendo explicarse dicho fenómeno por un mecanismo compensatorio [409].

De este modo, las células T CD4 Th1 ven reducida la acción de los factores de transcripción T-Bet y STAT4, así como la producción de citoquinas como IL2, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ . Las del subtipo Th2 sufren una reducción en la acción nuclear de moléculas como GATA3 y STAT6, así como de la producción de IL4, IL5 e IL13. Asimismo, las células Th17 ven reducido su número, ya que los GC inactivan STAT3 por un mecanismo de "*tethering*" y este es imprescindible para la polarización hacia Th17 mediada por ROR $\gamma$ t, efecto que se acompaña de una inhibición en la producción de citoquinas como la IL17A o la IL22 en las células ya polarizadas [410]. En cambio, las células Treg sufren un aumento en su abundancia relativa como consecuencia de la exposición a GC. Esto parece estar relacionado con una menor sensibilidad de estas a la apoptosis inducida por GC comparado con los subtipos proinflamatorios, aunque también influye el hecho de que los GC inducen un fenotipo tolerogénico en las APC, lo que favorece la polarización preferencial de las células T vírgenes hacia este subtipo [411, 412].

En los animales con la esteroidogénesis intestinal específicamente inhibida, las células T CD8 que forman parte de las poblaciones celulares descritas como IEL,

LPL o localizadas en el GALT, presentan un estado basal de activación mayor monitorizada por un incremento en la producción de IFN $\gamma$  [413].





# OBJETIVOS



Con base en los experimentos anteriores que se encuentran recogidos en el artículo que acompaña a esta tesis doctoral que sugerían un papel determinante del GR en el epitelio, se formularon los siguientes objetivos:

1. Caracterizar el papel del GR epitelial intestinal en la fisiología intestinal, particularmente en la función barrera de la mucosa e inflamación, así como su relevancia en el papel beneficioso o perjudicial de los corticoides en este contexto.
2. Mejorar el manejo clínico de la enfermedad inflamatoria intestinal con corticoides identificando posibles inconvenientes en sus efectos farmacológicos en esta patología, así como posibles maneras de subsanarlos.



MATERIAL  
Y  
MÉTODOS



## 1 Reactivos.

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

## 2 Animales de experimentación y modelos animales.

En los experimentos *in vivo*, se realizaron en ratones B6.Cg-Nr3c1<tm1.1Jda>/J [414] (GR<sup>loxp/loxp</sup>) y Tg (Vil Cre/ ERT2) 23Syr (Vil-Cre) [415] que fueron cruzados entre sí hasta obtener ratones B6-Cg-Nr3c1-VilCre/ERT2, a los que denominaremos GR. Tanto los ratones B6.Cg-Nr3c1<tm1.1Jda> como los Tg (Vil Cre/ ERT2) 23Syr fueron utilizados como controles y serán denominados WT. Los animales fueron mantenidos bajo estrictas condiciones libres de patógenos específicos en jaulas de Makrolon® sometidas a microventilación automática y a ciclos de 12 horas de luz/oscuridad en la Unidad de Experimentación Animal (Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada). Para su alimentación se empleó una dieta estándar para roedores (Harlan-Teklad 2014), y agua *ad libitum*, excepto en el caso del modelo de colitis inducida por sulfato de dextrano sódico (DSS). Dichos estudios *in vivo* han sido aprobados por el Comité de Bienestar Animal de la Universidad de Granada y se han llevado a cabo de acuerdo con la Guía para el cuidado y uso de animales de experimentación de los Institutos Nacionales de Salud de EEUU.

### 2.1 Genotipado de los ratones GR y VilCre.

#### 2.1.1 Extracción de DNA para genotipaje.

Para la extracción de DNA se tomó una muestra de oreja de ratón con un punzón de 2 mm de diámetro y se introdujo en un tubo de 200 µl. A continuación se añadieron 75µl de una solución 25mM NaOH y 0.2 mM Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y se sometió a 98°C durante 1 hora seguido de un enfriamiento rápido hasta 15°C. Posteriormente se equilibró el pH incorporando 75ul de Tris HCl 40 mM (pH 5.5).

#### 2.1.2 Genotipaje de los ratones B6.Cg-Nr3c1<tm1.1Jda>/J.

Para el genotipaje se utilizó la técnica de reacción en cade de la polimerasa (PCR). Se mezclaron 2 µl del DNA extraído anteriormente y 23 µl de REDExtract-N-Amp™ PCR ReadyMix™ (Sigma®). Para los ratones B6.Cg-Nr3c1<tm1.1Jda>/J (GR<sup>loxp/loxp</sup>) la mezcla de PCR contenía los cebadores (0.6 µM) siguientes: cebador Nr3c1 sentido ATGCCTGCTAGGCAAATGAT y cebador Nr3c1 antisentido TTCCAGGGCTATAGGAAGCA que amplifican un fragmento del gen Nr3c1 mutado de 300pb o normal de 247pb. El protocolo de PCR fue el siguiente: 94º 2min,



10 ciclos de una secuencia 94° 20seg-65°-15seg-68<sup>a</sup>10seg, 28 ciclos de una secuencia 94° 15s- 65° 15s- 72° 10s y 72° 2min.

Para el genotipaje de los ratones Vil-Cre la mezcla de PCR contenía los cebadores (0.8  $\mu$ M) siguientes: un cebador del gen Cre sentido GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC, un cebador del gen Cre antisentido GTGAAACAGCATTGCTGTCACCTT y dos cebadores correspondientes a un control interno a la misma concentración siendo las secuencias de los cebadores sentido y antisentido las siguientes: CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCTy GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC. El protocolo de PCR fue el siguiente: 94° 3min, 35 ciclos de una secuencia 94° 30s- 51.7° 1min- 72° 1min y 72° 2min.

El producto de PCR se cargó en un gel de agarosa al 1.8% en tampón TAE y se visualizó en transiluminador ultravioleta gracias a la incorporación en el gel de GelRed Biotium Inc. (Hayward, CA, EEUU)

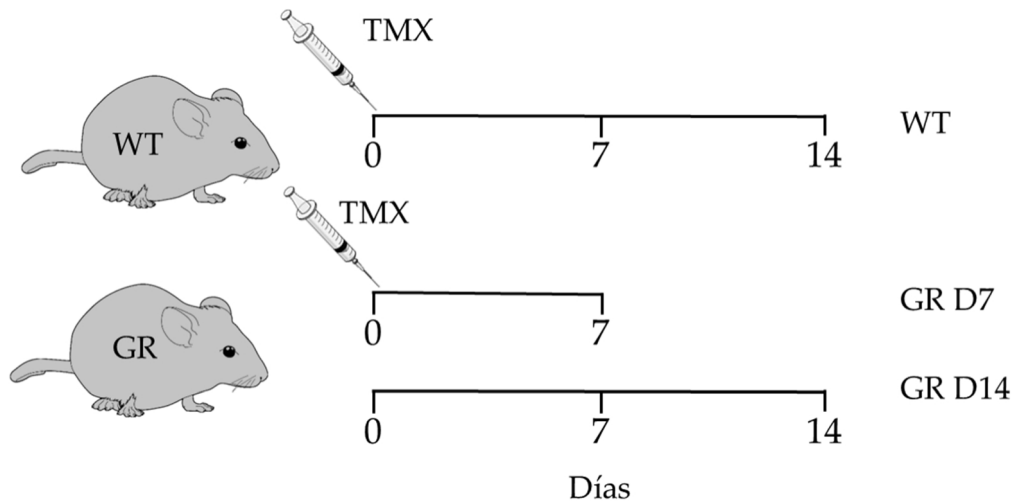
### **2.1.3 Inducción de la delección del gen Nr3c1 en el epitelio intestinal.**

La delección del gen fue inducida mediante la administración intraperitoneal de 100  $\mu$ l de tamoxifeno (TMX) 10mg/ml en etanol/aceite de girasol (1:10) durante 5 días consecutivos. Dicha solución fue recibida tanto por los ratones GR<sup>AIEC</sup> como por los ratones WT.

### **2.2 Diseño experimental de la caracterización de ratones con delección condicional inducible del GR en el epitelio intestinal.**

Ratones WT (n=8) o GR<sup>AIEC</sup> recibieron tamoxifeno y a los 7 (n=8) o 14 días (n=8) de la primera inyección de tamoxifeno se procedió al sacrificio de los animales en campana de flujo laminar (esquema 8). Para ello, los animales fueron anestesiados mediante la administración intraperitoneal de una solución de ketamina y xilacina.

Una vez perdido el reflejo plantar en los ratones, se procedió su exanguinación vía intracardiaca, y seguidamente se les practicó la dislocación cervical. Así, en condiciones de esterilidad, se extrajeron los órganos de los animales y, según la finalidad de los mismos, fueron procesados en el momento o congelados en nitrógeno líquido para su posterior análisis. Todo ello será detallado en el apartado correspondiente.



Esquema 8. Diseño experimental de la caracterización de ratones con delección condicional inducible del GR en el epitelio intestinal.

### 2.3 Estudio del efecto de la delección del gen *Nr3c1* en el epitelio intestinal en un modelo de colitis aguda en ratones C57BL6/J.

#### 2.3.1 Inducción de colitis aguda por DSS.

La inducción de la colitis se realizó mediante la administración de DSS 2.5% (p/v) en agua de bebida, siendo ésta repuesta a diario durante la totalidad del experimento, que duró 7 días [416]. La monitorización del estado de los animales se realizó atendiendo a los criterios recogidos en el índice de daño de la enfermedad (tabla 2). Del mismo modo, se realizó un seguimiento diario de la evolución del peso corporal, representado de forma relativa al peso inicial de cada animal.

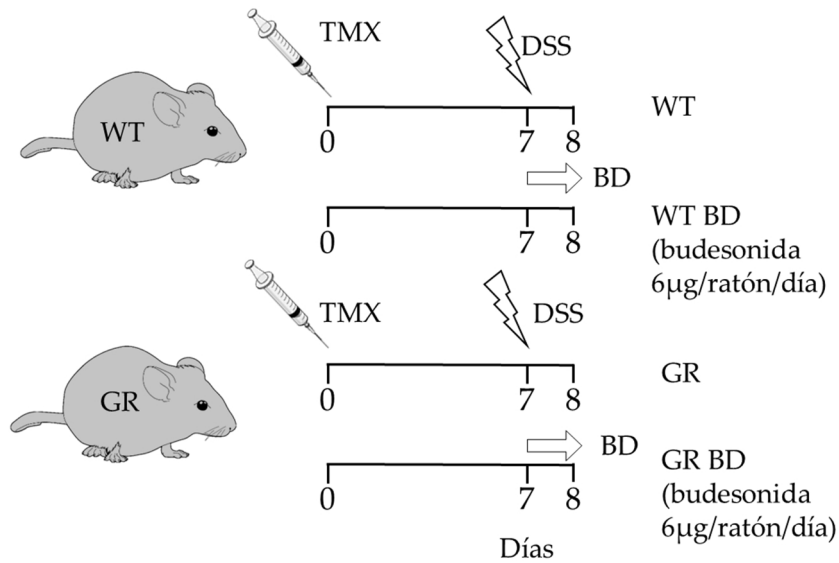
Tabla 2. Criterios de valoración del índice de actividad de la enfermedad (DAI) asociado a la colitis por DSS.

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

#### 2.3.2 Diseño experimental.

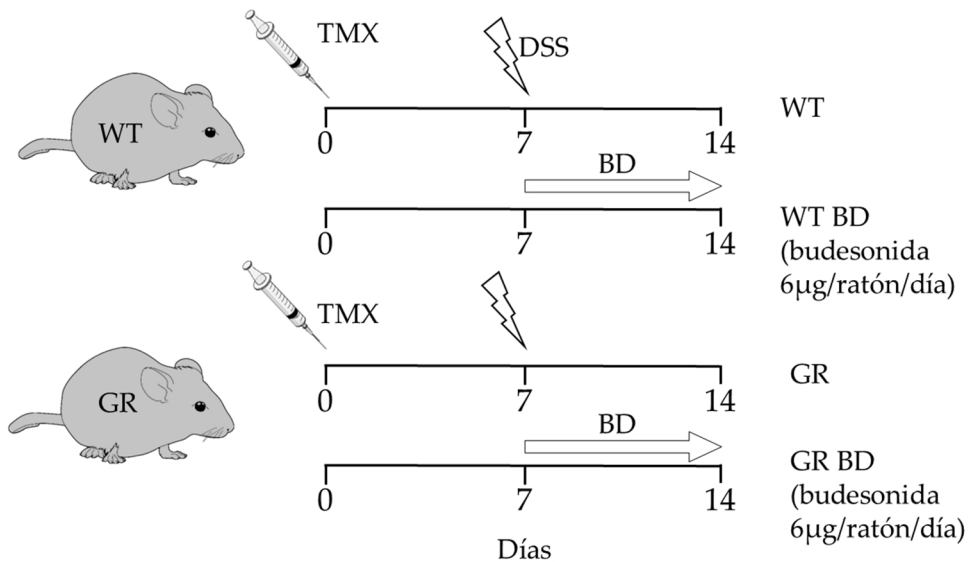
Se establecieron cuatro grupos experimentales: WT (B6.Cg-*Nr3c1*<sup><tm1.1Jda></sup> o Tg (Vil Cre/ERT2) 23Syr), GR (*GR*<sup>ΔIEC</sup>), WT BD (ratones WT tratados con budesonida

6µg/ratón/día) y GR BD (GR<sup>ΔIEC</sup> tratados con budesonida 6µg/ratón/día), con un número de animales variable entre 7 y 10. Los grupos WT recibieron aceite el día 0 mientras que los grupos GR recibieron TMX vía intraperitoneal.



**Esquema 9. Diseño experimental de la respuesta en la fase temprana de la colitis aguda inducida por DSS en ratón.** WT (Ratones con receptor de glucocorticoides), TMX (tamoxifeno), GR (GR<sup>ΔIEC</sup>), BD (budesonida).

En un primer experimento para observar la respuesta en la fase temprana de la colitis por DSS se administró DSS al 2,5% en agua de bebida al séptimo día tras la primera administración de TMX. A su vez se administró una dosis de 6µg de budesonida por ratón.



**Esquema 10. Diseño experimental en la colitis aguda inducida por DSS en ratón.** WT (Ratones con receptor de glucocorticoides), TMX (tamoxifeno), GR (GR<sup>ΔIEC</sup>), BD (budesonida).

En un segundo experimento comenzó la administración de DSS al 2,5% en agua de bebida al séptimo día de la primera administración de TMX. A su vez se administró budesonida a los grupos BD a la dosis de 6µg por ratón y día. Transcurridos 7 días de administración de DSS, se procedió al sacrificio de los animales en campana de flujo laminar. Se sacrificaron los animales como se indica en el apartado 2.2.

### **3 Estudio del estado inflamatorio.**

#### **3.1 Determinaciones plasmáticas.**

##### **3.1.1 Obtención del plasma.**

La extracción de sangre se realizó vía intracardiaca en el momento del sacrificio de los animales. Se utilizó heparina de litio como anticoagulante (5000 UI/ml) y se depositó en tubos BD Microtainer PST LH. La sangre fue sometida a una centrifugación a 6000 g durante 2 minutos a 4°C para obtener el plasma. Las muestras fueron conservadas a -80°C hasta su uso.

##### **3.1.2 Determinación de nitratos y nitritos en plasma.**

Dada la asociación entre una elevación de los niveles de nitratos/nitritos en plasma (derivados de un aumento de la presencia de NO), con la reacción inflamatoria sistémica típicamente asociada a la septicemia, se aplicó un protocolo basado en la reacción de Griess [417] para la cuantificación de nitratos/ nitritos éstos en plasma. Brevemente, en primer lugar se realiza la conversión de todos los nitratos presentes hacia nitritos, ya que la reacción de Griess solo es sensible a éstos. Posteriormente, los nitritos así generados fueron cuantificados espectrofotométricamente mediante una reacción en presencia de sulfanilamida 1% (p/v) y naftiletieno diamina dihidrocloruro 0.1% (p/v) y H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 2.5% (p/v), mediante la cual se genera un producto coloreado detectable a 540 nm. Paralelamente se realizó una curva patrón generada con nitrito sódico. Los resultados son expresados en concentración (µM).

##### **3.1.3 Determinación de DKK1 y haptoglobina plasmáticas.**

Se determinaron DKK1 y haptoglobina plasmáticas mediante ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) (R&D Systems Inc., Minneapolis, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **3.1.4 Determinación de ACTH, TNF $\alpha$ , IL6 y leptina plasmáticas.**

En el plasma se determinó ACTH, TNF $\alpha$ , IL6 y leptina mediante una multidetección por inmunoensayo. La medida se realizó haciendo uso de un kit Milliplex® diseñado para estos analitos (EMD Millipore Merck, Darmstadt, Alemania) y la lectura se realizó en un equipo Luminex 200 (Luminex Corporation).

### **3.1.5 Determinación de corticosterona.**

La concentración de corticosterona sistémica o en explantes fue determinada mediante ELISA (R&D Systems Inc., Minneapolis, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante.

## **3.2 Evaluación del daño y la inflamación intestinal.**

### **3.2.1 Evaluación macroscópica del daño intestinal.**

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

En el modelo de colitis inducida por DSS además del colon se obtuvieron segmentos de íleon siguiendo el mismo protocolo descrito para el colon.

### **3.2.2 Estudio histológico.**

Una de las secciones transversales de colon obtenidas tras el sacrificio fue conservada en formaldehído al 4% (p/v). A continuación estas muestras se incluyeron en bloques de parafina para posteriormente realizar cortes de un grosor de 5  $\mu$ m empleando un micrótopo de parafina. Los cortes realizados fueron montados en portas y sometidos a una tinción de rutina con hematoxilina y eosina (H&E), que permite el estudio de la morfología, integridad y grado de infiltración del tejido objeto de estudio. Asimismo, los cortes fueron sometidos a una tinción a base de azul alcian y rojo nuclear, que permite conocer la actividad funcional de las células caliciformes en relación a la producción de mucinas y su liberación a la

interfase epitelio – luz intestinal. Las imágenes estudiadas se capturaron con un microscopio Leica DMI3000 B, con un aumento 10x en todos los casos.

### **3.2.3 Estudio de la permeabilidad intestinal *in vivo*.**

Para el estudio de la permeabilidad intestinal se administró a los ratones una solución de FITC dextrano (MW 4000 Da) vía oral a una concentración de 40mg/100g de peso en PBS, 4 horas antes del sacrificio, quedando los animales en ayuna tras recibir el sondaje. La intensidad de la fluorescencia (excitación 490 nm; emisión, 540 nm; usando el fluorímetro FLUOstar-Control, Polarstar OPTIMA, BMG Labtech), la permeabilidad al FITC-dextrano se calculó haciendo uso de una curva de FITC dextrano disuelto en PBS y plasma murino (1:1 v/v) (1000–1 µg/ml) de la cual se obtuvieron los pertinentes valores de fluorescencia.

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

El ensayo de permeabilidad *ex vivo* se realizó tomando una pieza de aproximadamente 0.5 cm de colon distal de ratón que se sumergió en solución Ringer fría (en mM: 115 NaCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 MgCl<sub>2</sub>, 2.4 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.4 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, y 10 glucosa). Se hicieron montajes de tejido intacto sobre cámaras de Ussing con dispositivos de voltaje DVC-1000 (World Precision Instruments, Aston, United Kingdom). Transcurridos 10-15 minutos del montaje del tejido se consiguió la estabilización de los valores de I<sub>sc</sub> (I<sub>0</sub>) y conductancia (G<sub>0</sub>). A continuación se añadió carbacol (300 µM), agonista colinérgico que actúa como secretagogo, anotándose la respuesta de I<sub>sc</sub> del tejido colónico.

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

Se homogenizaron las heces en HEPES 20mM con BSA 1% en una proporción 1:20 (p/v) y el sobrenadante se empleó para la medida de hemoglobina. A la muestra se añadió un reactivo de coloración en tampón citrato (25mM ácido cítrico y 50mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) con TMB 0.416mM (1,3',5,5'-tetrametilbencidina) y 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en proporción 1:4 (muestra:reactivo). Tras 20 minutos la reacción se detiene con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N y se realizó la medida espectrofotométricamente. Paralelamente se usó sangre con concentración de hemoglobina conocida como curva patrón.

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

Una de las muestras de colon obtenidas tras el sacrificio del animal fue homogeneizada en un tampón compuesto por Tris Base (50 mM) y HTAB al 0,5%

(p/v). Una vez centrifugado el homogenado, el sobrenadante resultante fue empleado para la determinación de actividades enzimáticas en colon. La determinación de la actividad mieloperoxidasa (MPO), utilizada como marcador de infiltración neutrofílica, se llevó a cabo mediante un método espectrofotométrico basado en el uso de o-dianisidina en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [418]. Los resultados fueron expresados como mUnidades/mg de proteína. Igualmente, la actividad fosfatasa alcalina (AP) fue determinada usando para ello un método espectrofotométrico descrito por Sánchez de Medina *et al* en el cual el sustrato de la reacción catalizada por dicha enzima es el p-nitrofenilfosfato sódico [419]. Los resultados se expresan igualmente como mU/mg de proteína.

### **3.2.7 Estudio de la expresión proteica mediante Western Blot.**

#### **3.2.7.1 Extracción y cuantificación de proteínas para análisis por Western Blot.**

El tejido objeto de estudio fue sometido a homogenización mecánica en tampón de lisis RIPA frío compuesto por dodecil sulfato sódico (SDS) 0.1%, desoxicolato sódico 0.1% y Tritón X-100 1% en PBS, conteniendo un cocktail inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich, P8340) en una proporción de 1:200 (v/v) así como de fosfatasas (SC-45045, Santa Cruz Biotechnology®, Dallas, Texas, EEUU) en una proporción de 1:100 (v/v). Seguidamente el homogenado se expuso a ultrasonidos para forzar la completa lisis celular y finalmente se sometió a centrifugación a 10.000 rpm, 10 min y a 4°C con objeto de eliminar los restos celulares. En el sobrenadante obtenido tras la centrifugación se determinó la concentración de proteínas mediante el método del ácido bicinonínico [420], empleando albúmina sérica bovina como estándar.

#### **3.2.7.2 Western Blot.**

Las muestras obtenidas mediante el procedimiento anterior fueron mezcladas en la proporción adecuada con el tampón de carga comercial 4X suministrado por BioRad® (Hércules, CA, EEUU) y calentadas a 95°C durante 5 minutos. Tras la separación de las proteínas mediante electroforesis en geles de gradiente de concentración de acrilamida comprendido entre 4-16%, éstas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa 0.25 µm (BioRad®). Las membranas fueron bloqueadas durante 1 hora a temperatura ambiente, utilizando para ello leche en polvo desnatada al 5% en TBS-T (Tris 50mM, NaCl 0.15 M y Tween-20 1% (v/v)). A continuación, la membrana fue expuesta al anticuerpo primario específico durante toda la noche a 4°C en agitación. Los anticuerpos y las diluciones (v/v) empleados fueron: actina (1:500) de Hybridoma Bank (Iowa, EEUU); PCNA (1:1000) de la casa

BD Biosciences® (California, EEUU); GR (1:1000); pSTAT3 (1:2000), STAT3 (1:1000); Ciclina D1 (1:1000) de Cell Signaling Technology® (Massachusetts, EEUU); S100A9 (R&D Systems®, Minneapolis, MN); claudina 2 (1:1000) y claudina 4 (1:1000) de Life Technologies® (Nueva York, EEUU). Todos estos anticuerpos fueron diluidos en TBS-T con albúmina sérica bovina al 5% (p/v). Como control de carga genérico se usó la expresión de actina o gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), excepto en aquellos casos en los que se hace una relación directa entre la expresión de la proteína fosforilada y la de la proteína total. Las membranas fueron posteriormente expuestas durante 60 minutos al anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, de la especie apropiada según el anticuerpo primario empleado. Las bandas fueron detectadas usando un reactivo generador de quimioluminiscencia suministrado por Perkin Elmer, Life Sciences (Boston, MA, EEUU). La cuantificación de los resultados obtenidos se llevó a cabo mediante el software Image J.

### **3.2.8 Cuantificación de la expresión génica mediante qRT-PCR.**

#### **3.2.8.1 Extracción de ARN y reacción de retrotranscripción.**

El ARN total se obtuvo usando RNeasy Mini Kit (Qiagen®, California, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación de RNA de las distintas muestras se realizó usando un Nanodrop® (Thermo Scientific) considerando asimismo la relación 260 nm/280 nm con el fin de estimar la pureza e integridad del ácido nucleico. Una cantidad total de 1 µg de RNA por muestra fue retrotranscrito para la obtención del DNA complementario, utilizando transcriptasa inversa según las indicaciones del fabricante del kit (iScript Select cDNA Synthesis Kit, Biorad Laboratories®, California, EEUU). El DNA complementario se mantuvo congelado a -20°C hasta su uso, mientras que el RNA restante se conservó a -80°C.

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

La reacción en cadena de la polimerasa fue realizada usando Sybr Green como fluoróforo (iQ™ SYBR® Green Supermix, Biorad Laboratories, California, EEUU) para el análisis de la expresión de diversos genes. Los genes de referencia elegidos fueron generalmente la subunidad 18S del RNA ribosómico (RN18S), hipoxantina-guanina-fosforribosil transferasa (HPRT) y peptidil-prolil cis-trans isomerasa B (PPIB) siendo generalmente el promedio de su expresión empleado como control de carga en los distintos experimentos. Los cebadores empleados en cada caso vienen detallados en la 0.



### **3.2.9 Experimentos ex vivo.**

#### **3.2.9.1 Cultivo de explantes de colon.**

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

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

#### **3.2.9.2 Determinación de la secreción de citoquinas en explantes de colon por análisis Multiplex®.**

En el sobrenadante obtenido de los explantes de colon se determinó la concentración de distintos mediadores proteicos secretados por el colon. TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , G-CSF, GM-CSF, IL1 $\beta$ , IL2, IL4, IL5, IL6, IL9, IL10, IL12p70, IL13, IL18, IL17A, IL22, IL23, IL27, Eotaxina, GRO- $\alpha$ , IP-10, MCP-1, MCP-3, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MIP-2 y RANTES. La medida se realizó haciendo uso de un kit ProcartaPlex® (Affimetrix, eBioscience, Inc.) y la lectura se realizó en un equipo Luminex 200 (Luminex Corporation).

#### **3.2.10 Hemograma y estudio hematológico.**

Antes de obtener el plasma de los animales, se separó una alícuota de sangre (30-50 µl) para determinar la cantidad de glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas, la cantidad total de hemoglobina en sangre y la fracción de sangre compuesta por glóbulos rojos (hematocrito) y plaquetas (trombocrito). Dicho análisis fue realizado en un contador hematológico (Mythic® 22CTC2 Diagnostics).

### 3.2.11 Separación de linfocitos intraepiteliales y células intestinales epiteliales.

Para la separación de células epiteliales intestinales (IECs) y linfocitos intraepiteliales (IELs) se utilizó el método descrito por Neurath *et al* [421], con algunas modificaciones adaptadas por Mucida *et al* [422-425]. Brevemente, se limpiaron los fragmentos de intestino con PBS, diferenciando desde ahora intestino delgado y grueso, se abrieron longitudinalmente y se limpió en una solución de HBSS (*Hanks balanced salt solution*) con DTT 1mM y se cortaron en fragmentos de aproximadamente 0.5cm. Los fragmentos se sometieron a 2 incubaciones sucesivas en HBSS con FBS 5% y EDTA 2mM. De estas incubaciones se obtuvo tras un percoll 80:40 (v/v) las IECs y los IELs.

### 3.3 Citometría de flujo.

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

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

#### **4 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 dos vías (ANOVA) y un test de significancia *a posteriori* (Fisher LSD). La significancia estadística se consideró para un valor de  $P < 0.05$ . El análisis estadístico descrito se realizó mediante GraphPad Prism versión 7.00 (GraphPad Software, La Jolla California USA).

Tabla 3. Secuencia de los cebadores utilizados en la PCR cuantitativa a tiempo real.

Gen	Hebra sentido 5'-3'	Hebra sentido 3'-5'
Rn18s	TGGTGGAGCGATTTGTCTGG	ACGCTGAGCCAGTCAGTGTACG
Hprt	AGGGATTTGAATCACGTTTG	TTTACTGGCAACATCAACAG
Ppib	CAAATCCTTTCTCTCCTGTAG	TGGAGATGAATCTGTAGGAC
Nr3c1	CTTCTCTCCTCAGTTCCTAAG	CCAATTCTGACTGGAGTTTC
Alpi	CATGGACATTGATGTGATCC	AGACTGGTTACTGTCACTTG
Muc2	CCCAGAAGGGACTGTGTATG	TTGTGTTTCGCTCTTGGTCAG
Lyz1	CAAGATCTAAGAATGCCTGTG	TTCCGAATATACTGGGACAG
Lgr5	AGAACACTGACTTTGAATGG	CACTTGGAGATTAGGTA ACTG
Reg3	CAGAGGTGGATGGGAGTGGAG	CACAGTGATTGCCTGAGGAAGAGA
Muc3	AAAGATTACCTCCCATCTCC	TAAACTAAGCATGCCCTTG
Tff3	TATCAGTCGGATCGAGGCTATG	AGGTACCGATCCCATCTGTGT
S100a8	GCCCTCTACAAGAATGACTTCAAG	ATCACCATCGCAAGGAACTCC
S100a9	CTTTAGCCTTGAGCAAGAAG	TCCTTCCTAGAGTATTGATGG
Il22	ATCAGTGCTACCTGATGAAG	CATTCTTCTGGATGTTCTGG
Il6	AAGAAATGATGGATGCTACC	GAGTTTCTGTATCTCTCTGAAG
Myc	TTTTGTCTATTTGGGGACAG	CATAGTTCCTGTTGGTGAAG
Ccnd1	GTCCTACTGTTTGCGGCITG	GCAGACGCCTCTTGGGTCTACAATA
Nr5a2	TTGAGTGGGCCAGGAGTAGT	ACGCGACTTCTGTGTGTGAG
Cyp11b1	CATTTTCAGGCACAGTGTAG	CTCTATGGACTATCCAGGATTC
Hsd11b1	CTCATAGACACAGAAACAGC	TCAAAGGCGATTTGTCATAG
Hsd11b2	CAATAGCACTGCTTATGGAC	CATTAGTCACTGCATCTGTC



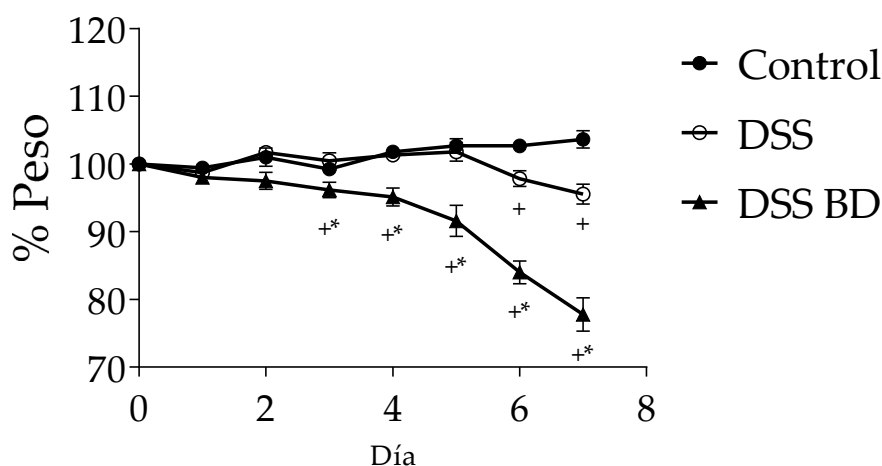
# RESULTADOS



## 1 Efecto de la budesonida en la colitis inducida por DSS.

En el artículo que se recoge en esta tesis doctoral se estudia el efecto perjudicial y beneficioso de la budesonida en la colitis experimental. En estos experimentos se usaron dosis diferentes de budesonida para comprobar cuál de ellas podría tener efectos sistémicos y observar posibles relaciones entra la concentración y los efectos observados. En este apartado mostraremos únicamente los valores del grupo con budesonida a 6µg por ratón y día que será la dosis escogida en este trabajo.

Los ratones que recibieron budesonida a la durante la colitis inducida por DSS, lejos de mostrar una mejoría clínica por el peso o el DAI empeoraron de manera consistente en comparación con el grupo no tratado, llegan a adelantar el sacrificio de los animales un día debido a razones éticas (figura 1).



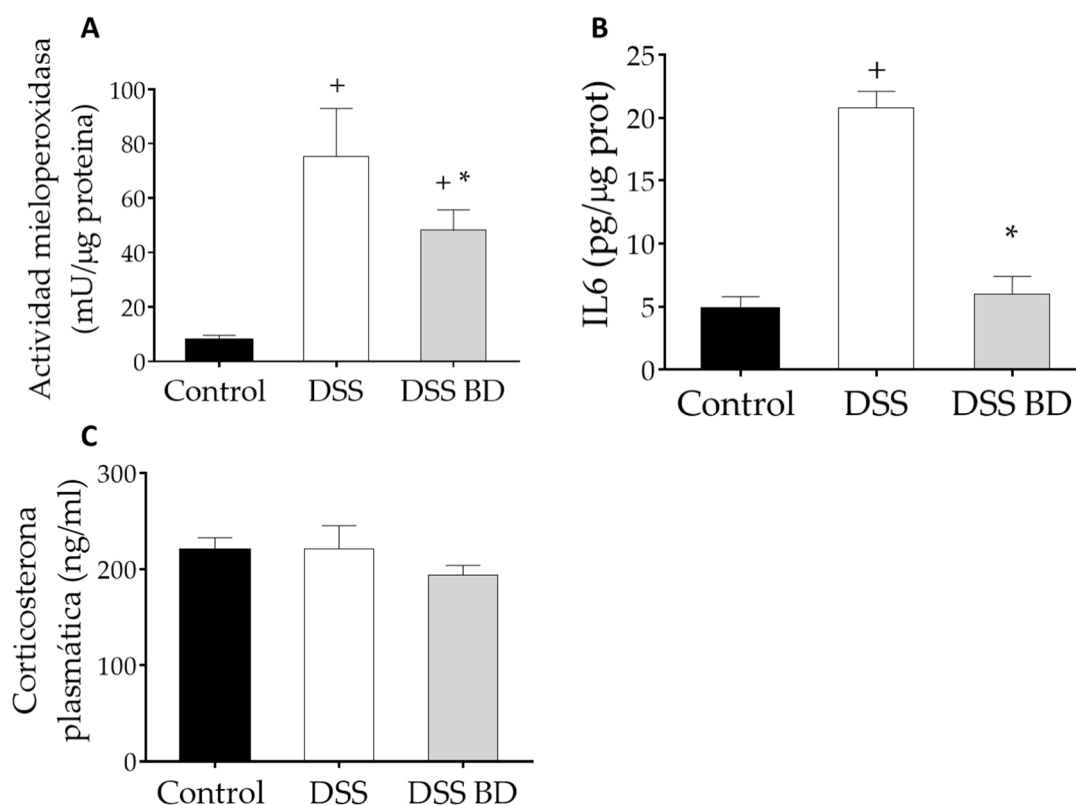
**Figura 1. Evolución de pesos en la colitis inducida por DSS.** Evolución del peso de los animales durante el transcurso de la colitis inducida por DSS en ratones C57BL6/J, no tratados (DSS) o bajo tratamiento con budesonida (DSS BD) a 6 µg/ratón/día. Los controles no recibieron BD. Los resultados son expresados como % de peso, tomando como referencia el día de comienzo del experimento. Los datos se expresan como media ± error estándar. + P<0,05 Control vs. DSS; \* P<0,05 DSS vs. DSS BD.

De un modo coherente con su actividad farmacológica, la budesonida, ejerció un contundente papel antiinflamatorio como se puede observar en la actividad mieloperoxidasa colónica que aumentó en el grupo colítico y disminuyó por efecto del glucocorticoide (figura 2A). La producción de IL6 en explantes de colon confirmó también el efecto antiinflamatorio, aumentando en gran medida debido a la colitis y revirtiendo por el efecto farmacológico de la budesonida (figura 2B).

El efecto de la budesonida se debió fundamentalmente a un efecto local como cabría de esperar, ya que de conseguir acceder al torrente sanguíneo habría inhibido



la producción de corticosterona plasmática que se mantuvo por igual tanto en el grupo control como en ambos grupos DSS (figura 2C).



**Figura 2. Determinación de parámetros inflamatorios en tejido colónico en la colitis inducida por DSS.** (A) Actividad mieloperoxidasa (mU/mg tejido) en tejido colónico completo, (B) IL6 en explantes colónicos y (C) corticosterona plasmática tras la colitis inducida por DSS en ratones C57BL6/J, no tratados (DSS) o bajo tratamiento con budesonida (DSS BD) a 6 μg/ratón/día. Los controles no recibieron BD. Los resultados son expresados como % de peso, tomando como referencia el día de comienzo del experimento. Los datos se expresan como media ± error estándar. <sup>+</sup> P<0,05 Control vs. DSS; <sup>\*</sup> P<0,05 DSS vs. DSS BD.

Por estos datos y por otros recogidos tanto en el artículo como en la tesis doctoral de Borja Ocón Moreno se planteó la hipótesis de que la budesonida podría tener un papel perjudicial cuando actuaba sobre las células intestinales epiteliales.

## 2 Caracterización de los ratones deficientes en GR en epitelio intestinal.

El GR juega un papel fundamental en el desarrollo de algunos tejidos, como se ha descrito en la introducción. Sin embargo, se conoce poco sobre el papel del GR expresado en el epitelio intestinal, pese a que otro grupo (Tuckermann et al.) generó hace algunos años ratones deficientes en GR en el epitelio, dado que estos investigadores no profundizaron de ningún modo en posibles alteraciones en la inmunología de la mucosa intestinal.

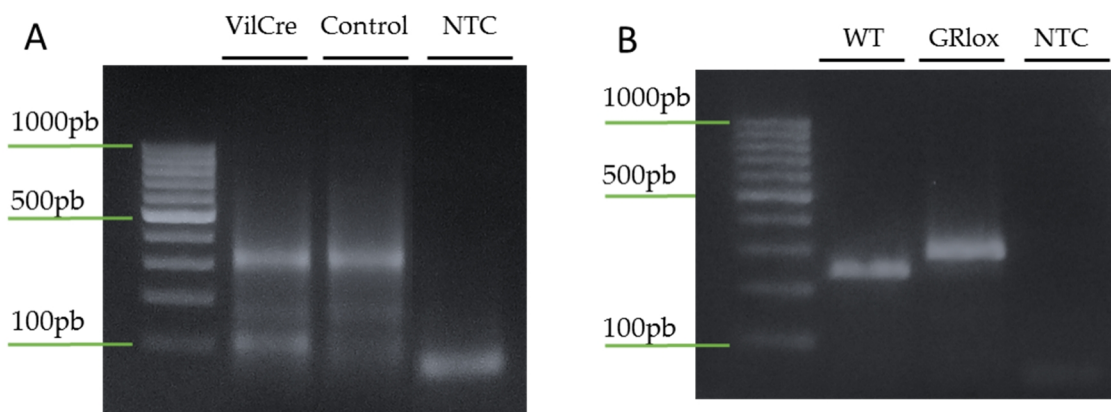
Con objeto de caracterizar estos efectos desarrollamos un modelo de ratón con delección inducible del GR en las IECs. Elegimos el modelo de delección inducible por

dos razones fundamentales: para evitar los posibles efectos del GR en el desarrollo epitelial, y para evitar posibles compensaciones a largo plazo que enmascarasen el efecto de la delección.

### 2.1 Generación de ratones con delección condicional inducible del GR en el epitelio intestinal.

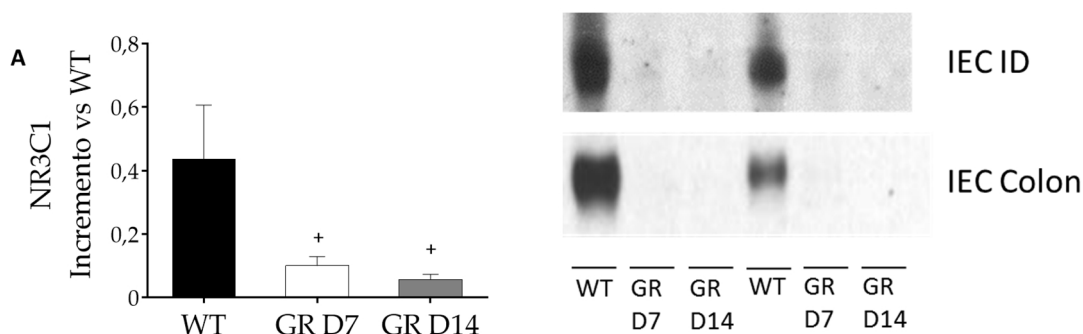
Para generar la línea transgénica se partió de ratones Vil-Cre ERT2 y GR<sup>loxp/loxp</sup>. Es importante destacar que los ratones GR<sup>loxp/loxp</sup> tienen el exón 3 flanqueado por las secuencias *loxp*, que corresponden a la secuencia DBD, asegurando de esta manera que la proteína no se produzca y que, aun si llega a hacerlo, no tenga afinidad por el DNA. Los ratones Vil-Cre se genotiparon mediante una PCR combinada con 2 cebadores para la secuencia de la proteína CRE y 2 cebadores para una secuencia control (figura 3A). Del mismo modo se genotiparon los ratones GR<sup>loxp/loxp</sup>, usando cebadores para la secuencia *loxp*-GR o GR normal (figura 3B).

Del cruce repetido de ratones Vil-Cre y GR<sup>loxp/loxp</sup> se obtuvo finalmente una línea homocigótica para GR<sup>loxp/loxp</sup> que presenta el gen *Cre* asociado al promotor de la villina. En lo sucesivo se denominará en esta memoria GR a estos ratones.



**Figura 3. Genotipado de ratones Vil-Cre y GR<sup>loxp/loxp</sup>.** Electroforesis en agarosa del producto de PCR para genotipar ratones Vil-Cre y GR<sup>loxp/loxp</sup>. (A) Se pueden observar 2 bandas de alrededor de 100 pb y 320 pb en los ratones que presentan la enzima CRE, mientras que solo se observará la de 320 pb en los ratones WT, NTC (control sin molde). (B) El genotipaje de ratones GR<sup>loxp/loxp</sup> da lugar a una sola banda, de 247 pb si son WT o de 300 pb si contienen la secuencia *loxp*, NTC (control sin molde).

Para la inducción de la delección se administró a los ratones TMX durante 5 días consecutivos por vía intraperitoneal. Como se puede observar en la figura 4A, tras 7 días desde el inicio de la administración de TMX la expresión de GR estudiada mediante qRT-PCR fue mucho más baja en colon de los animales GR que en los WT. Además, esta inhibición se mantuvo al menos hasta el día 14 del inicio de la administración.



**Figura 4. Expresión de GR en el epitelio intestinal de ratones transgénicos tras la administración de tamoxifeno.** Se estudió la expresión del gen NR3C1 mediante (A) qRT-PCR en colon o (B) Western blot de IECs de WT y en ratones GR sacrificados a los 7 (D7) y 14 (D14) días del inicio de la administración de tamoxifeno. Los resultados se expresan como incremento relativo tomando como referencia el grupo WT. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar. <sup>+</sup>  $P < 0,05$  vs. WT.

La baja expresión del gen se vio acompañada de una presencia virtualmente nula a nivel proteico según medida por WB en células epiteliales intestinales aisladas de intestino delgado (ID) y colon (figura 4B).

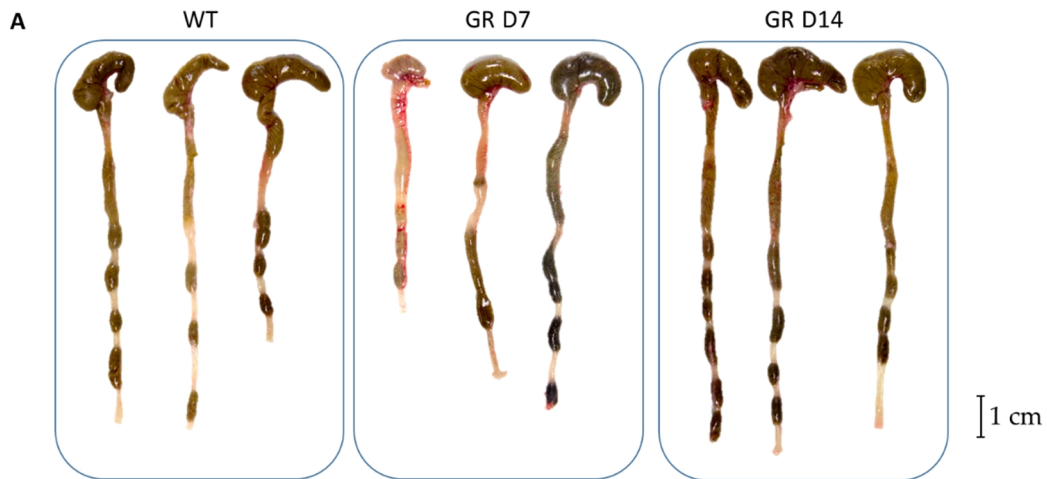
Resultados previos de nuestro grupo indicaron que la budesonida ejercía un papel perjudicial sobre las células epiteliales intestinales colónicas en el modelo de colitis por DSS; por este motivo centramos nuestra atención en este segmento intestinal.

## 2.2 Caracterización de ratones con delección condicional inducible del GR en el epitelio intestinal.

### 2.2.1 Estudio macroscópico y microscópico del colon.

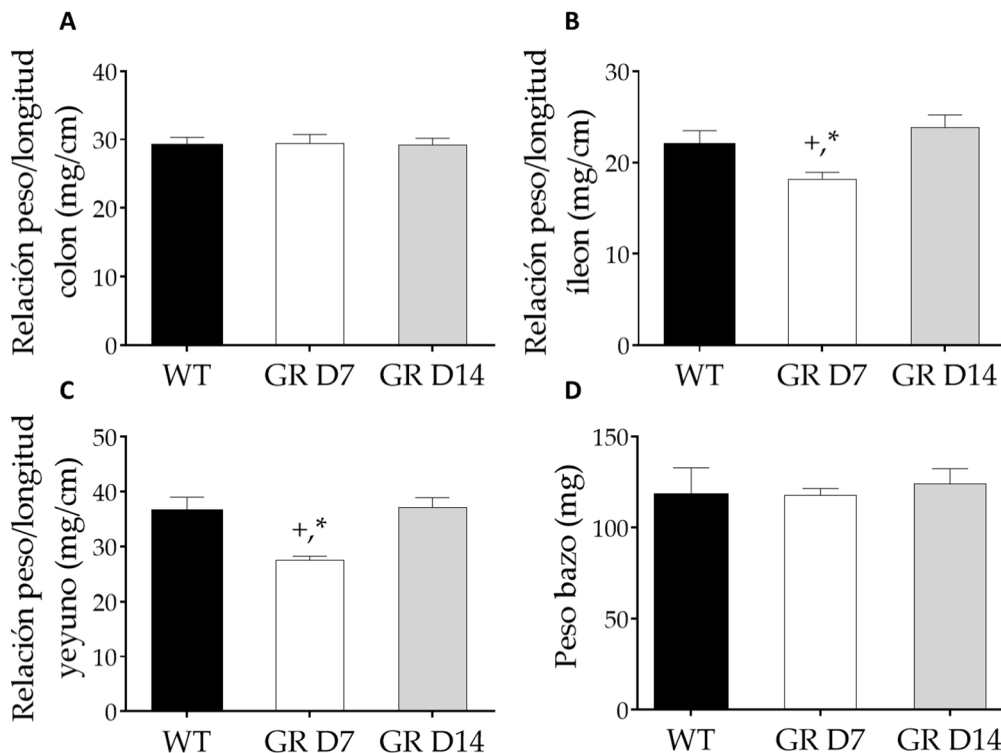
Inicialmente caracterizamos el efecto de la delección de GR en el colon a los 7 y 14 días del inicio de la administración de tamoxifeno. El efecto a 7 días era especialmente relevante con vistas a la realización de experimentos posteriores de inducción de colitis con DSS, ya que normalmente el tiempo de seguimiento en este modelo es precisamente de 7 días.

Como puede observarse en la figura 6A, el colon de ratones GR presentaba un aspecto comparable al de animales colíticos en algunos animales, aunque no en todos (figura 40). Por el contrario, a los 14 días del inicio de la administración de tamoxifeno no se observaron diferencias entre los ratones WT y los animales con delección de GR. Tampoco se observaron alteraciones en la relación colónica peso/longitud (figura 6B).



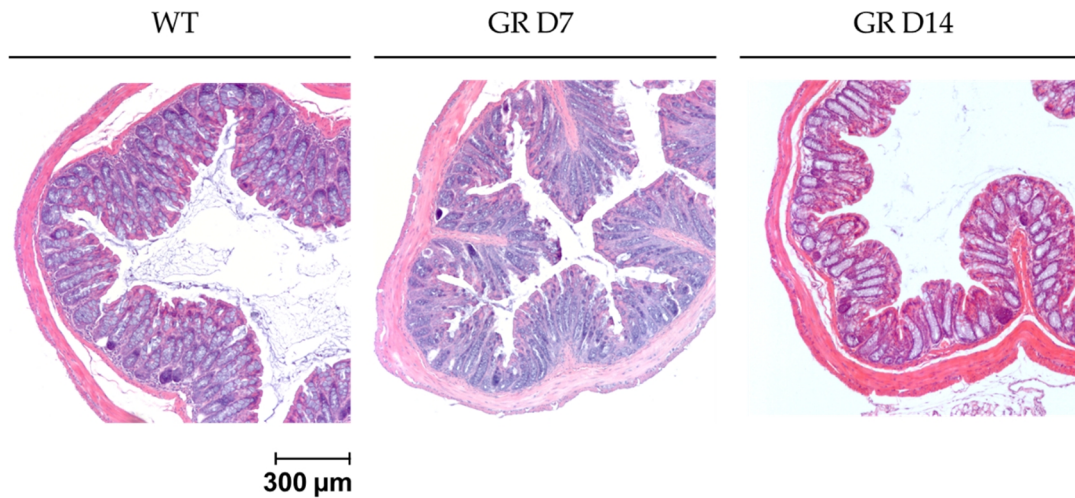
**Figura 5. Aspecto macroscópico de colon.** Fotografías representativas del colon de ratones WT y ratones GR a los 7 (D7) o 14 (D14) días del inicio de la administración de tamoxifeno.

Sin embargo, sí se observó una disminución de la relación peso/longitud de yeyuno e íleon a los 7 días, aunque no a los 14 días (figura 6C y D, respectivamente). Este parámetro no se vio acompañado de ninguna diferencia observable a simple vista al igual que en el peso de los bazo, que no se encontró diferencia entre los diferentes grupos (figura 6D).



**Figura 6. Relación peso-longitud de colon, yeyuno, íleon y peso del bazo.** Relación peso (mg) / longitud (cm) de colon (A), íleon (B) y yeyuno (C) en ratones WT y ratones GR a los 7 (D7) o 14 (D14) días del inicio de la administración de tamoxifeno y (D) peso del bazo. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar. Datos representativos de dos experimentos de n=8. + P<0,05 vs. WT; \* P<0,05 vs. GR D14.

Las histología de los ratones GR no mostró grandes diferencias con los WT, particularmente en el caso de los ratones GR D14. Algunos cortes histológicos de ratones GR D7 mostraron una morfología algo distorsionada, con apariencia de mayor descamación epitelial y algo de infiltración, mientras que otros cortes del mismo grupo fueron totalmente normales.

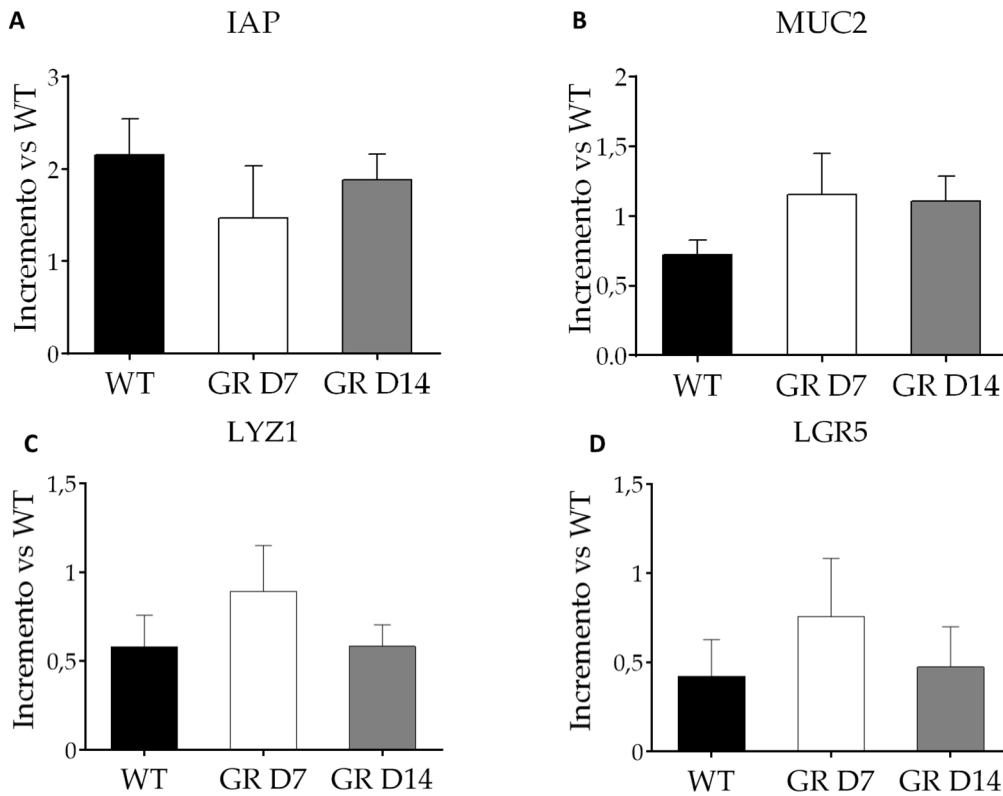


**Figura 7. Histología del colon.** Fotografías representativas de cortes histológicos con tinción hematoxilina/eosina del colon de ratones WT y GR tratados con tamoxifeno. Los animales fueron sacrificados a los 7 (D7) y 14 (D14) días del inicio de la administración del tamoxifeno. Fotografías representativas de dos experimentos de n=8.

### 2.2.2 Estudio de la funcionalidad del epitelio intestinal.

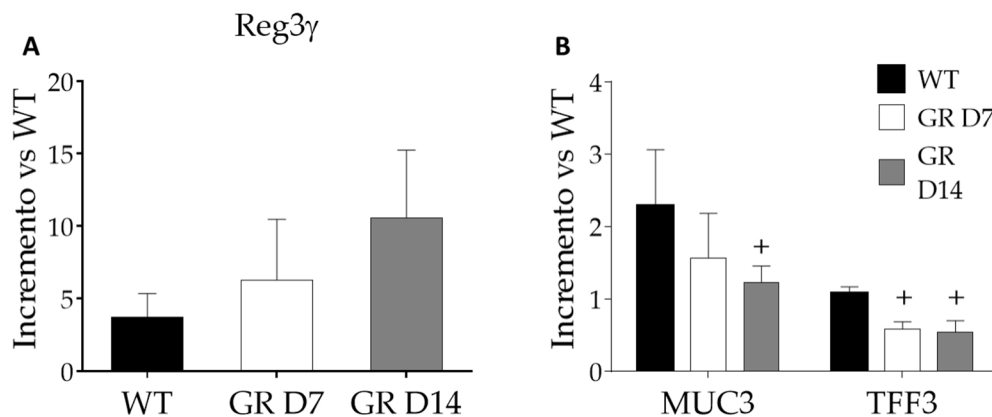
Uno de los componentes más importantes de la inmunidad innata de la mucosa intestinal es el propio epitelio. Mediante qRT-PCR se estudió la expresión de marcadores específicos para cada uno de los 4 tipos celulares que conforman el epitelio. La delección de GR no produjo variaciones en la expresión de fosfatasa alcalina intestinal (IAP), utilizada como marcador de diferenciación de IECs, ni de MUC2, característica de células caliciformes, aunque en éste último caso se apreció una tendencia al aumento ( $p=0,15$  en ambos casos) (figura 8A-B).

Tampoco se encontraron variaciones significativas en la expresión de lisozima 1 (LYZ1), un marcador para las células de Paneth (figura 8C), ni en la expresión de LGR5, un marcador específico de células madre epiteliales intestinales (IESCs) (figura 8D).



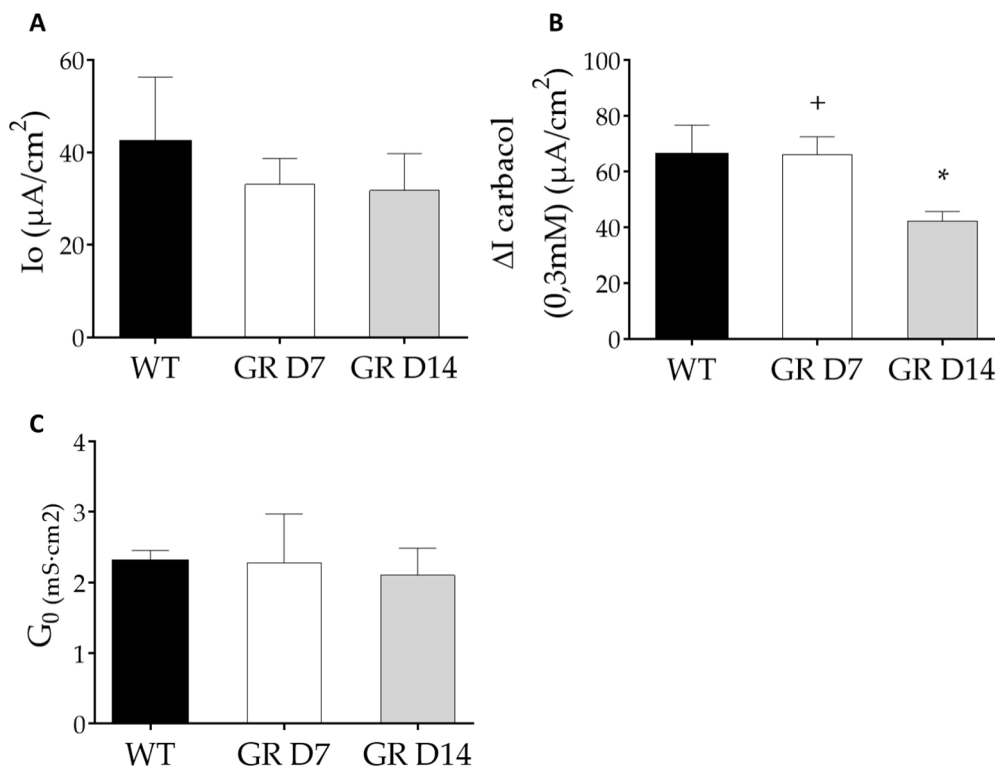
**Figura 8. Estudio de la expresión génica de IAP, MUC2, LYZ1 y LGR5.** Expresión génica medida por qRT-PCR en tejido colónico completo de ratones WT y GR a los 7 (D7) y 14 (D14) días del inicio de la administración de tamoxifeno. (A) IAP, (B) MUC2, (C) LYZ1 y (D) LGR5. Datos representativos de dos experimentos de n=8. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar.

Dado el resultado obtenido con LYZ1 y MUC2, que apunta a una tendencia al aumento de expresión, se procedió a estudiar otros péptidos relacionados con la defensa bacteriana. En concreto se estudió la expresión de REG3 $\gamma$ , MUC3 y TFF3 (figura 9A y B). Como en los casos precedentes, REG3 $\gamma$  mostró una tendencia al incremento de expresión tras la eliminación del GR, mientras que, por el contrario, la expresión de MUC3 y TFF3 disminuyó significativamente a lo largo del experimento.



**Figura 9. Estudio de la expresión génica de REG3 $\gamma$ , MUC3 y TFF3.** Expresión génica estudiada mediante qRT-PCR en tejido colónico completo de ratones WT y GR a los 7 (D7) y 14 (D14) días del inicio de la administración de tamoxifeno. (A) REG3 $\gamma$ , (B) MUC3 y TFF3. Datos representativos de dos experimentos de n=8. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar. \* P<0,05 vs. WT

Dado el importante efecto de los GC sobre la permeabilidad intestinal descrito por algunos autores [426, 427], era pertinente el estudio del transporte iónico electrogénico mediante cámara de Ussing en el tejido colónico completo. La corriente de cortocircuito ( $I_{sc}$ ) basal no se vio afectada en ninguno de los dos tiempos estudiados (figura 10A). No obstante, al evaluar la respuesta del tejido a la estimulación con un secretagogo como el carbacol a concentración submáxima (300  $\mu$ M) se observó una disminución, que alcanzó significación estadística a los 14 días (figura 10B), indicando alteraciones del transporte iónico en estos ratones. Tampoco se observó cambios en  $G_0$  hay que poner algo más.

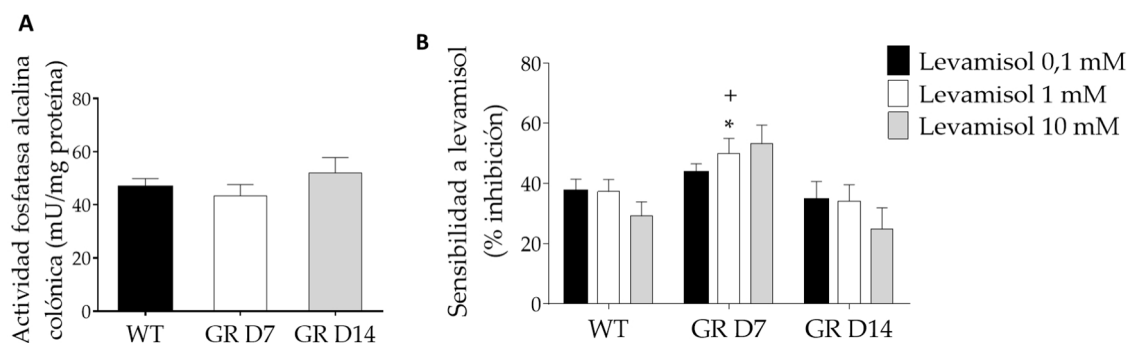


**Figura 10. Evaluación del transporte iónico electrogénico en fragmento de tejido colónico completo en cámara de Ussing.** Datos representativos de dos experimentos de n=8. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar. + P<0,05 vs. WT; \* P<0,05 vs. GR D7.

### 2.2.3 Estudio de parámetros de inflamación.

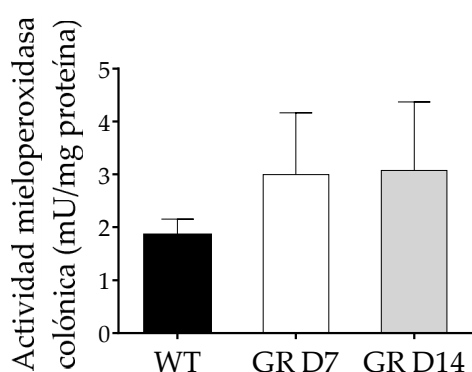
El aspecto macroscópico del colon y la disminución de la respuesta a carbacol incitaban a pensar que los ratones presentaban algún tipo de inflamación. Por tanto, como primera aproximación, se analizaron varios parámetros inflamatorios en el colon.

En primer lugar se estudió la actividad fosfatasa alcalina (AP), como parámetro inflamatorio general colónico. Los resultados mostraron que no aumenta por la eliminación de GR a ninguno de los tiempos estudiados (figura 11A), sin embargo, sí se apreció una mayor sensibilidad a la inhibición por levamisol in vitro a día 7, característica de un cambio de isoforma, que a su vez podría indicar la presencia de inflamación (figura 11B). Este cambio desapareció a los 14 días.



**Figura 11. Determinación de actividad fosfatasa alcalina en tejido colónico.** (A) Actividad AP (mU/mg proteína); (B) Sensibilidad de la actividad AP a distintas concentraciones de levamisol in vitro, expresado como porcentaje de inhibición de la actividad AP. Datos representativos de dos experimentos de n=8. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar. \* P<0,05 vs. WT; \* P<0,05 vs. GR D7.

No se observaron diferencias significativas en la medida de mieloperoxidasa (figura 12), aunque se observó una ligera tendencia a aumentar en los grupos GR. Por tanto, el fenómeno de aparente inflamación no parece deberse en principio a la infiltración neutrofílica.

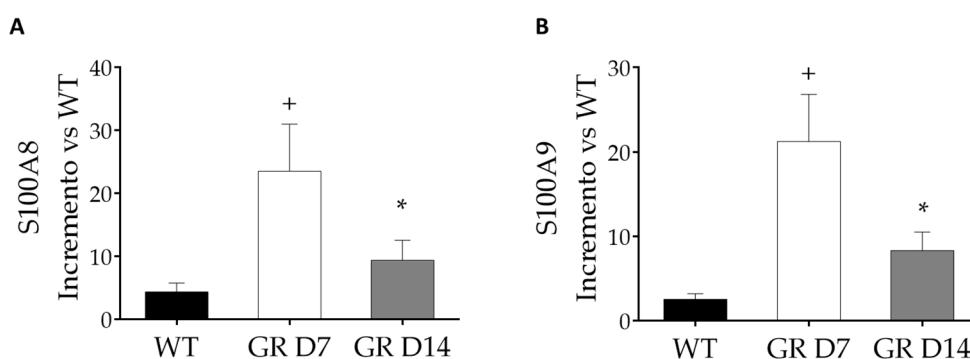


**Figura 12. Determinación de actividad mieloperoxidasa en tejido colónico.**

Se utilizó tejido colónico completo de ratones WT y GR a los 7 (D7) y 14 (D14) días del inicio de la administración de tamoxifeno. Datos representativos de dos experimentos de n=8. Los datos se expresan con media  $\pm$  SEM.

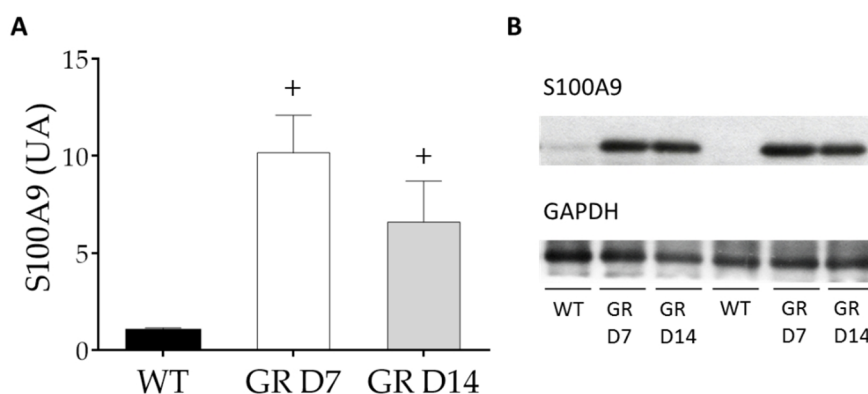
Mediante qRT-PCR se estudió en colon completo la expresión de genes que convencionalmente aumentan en modelos de colitis, como S100A8 y S100A9 (figura 13A y B). En ambos casos se produjo un aumento en la primera semana, que se veía disminuido al final del experimento.





**Figura 13. Estudio de la expresión génica de S100A8 y S100A9.** Expresión génica por qRT-PCR en tejido colónico completo de ratones WT y GR a los 7 (D7) y 14 (D14) días del inicio de la administración de tamoxifeno. (A) S100A8 y (B) S100A9. Datos representativos de dos experimentos de n=8. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar. + P<0,05 vs. WT; \* P<0,05 vs. GR D7.

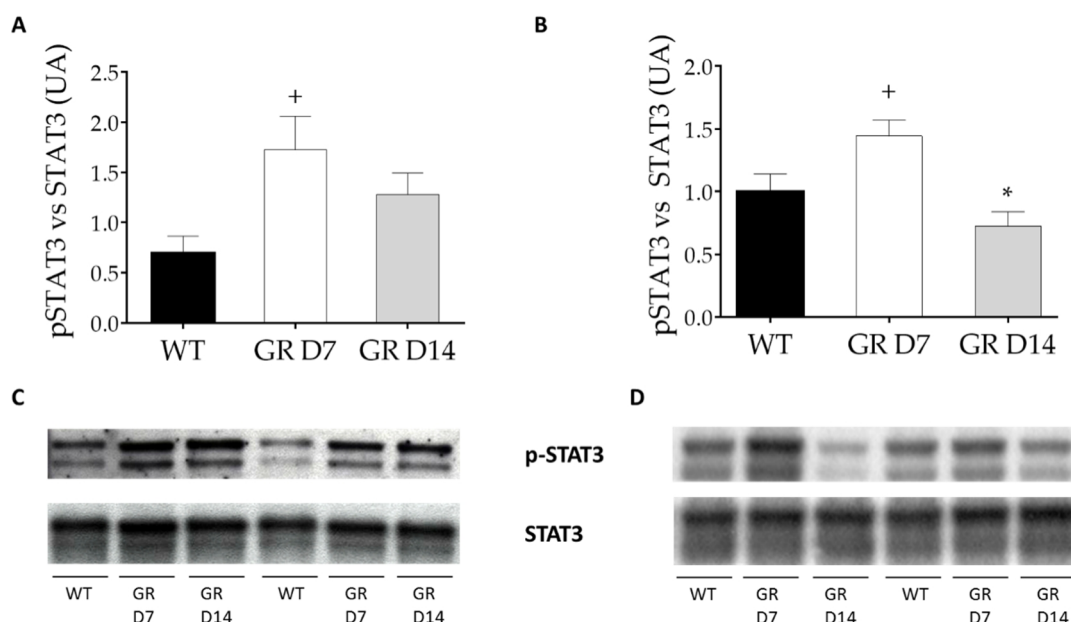
Para comprobar la contribución de las IECs en el aumento de S100A9 (figura 13B) se separaron las IECs colónicas del resto de componentes celulares y se estudió expresión de S100A9 mediante WB. Nuestros resultados indican que la delección de GR en IECs indujo la expresión de S100A9 (figura 14) en este tipo celular. Aunque esta preparación no es pura e incluye células no epiteliales, el grado de pureza y la magnitud del efecto indican que el aumento de expresión corresponde a IECs. Este hecho es coherente con la ausencia de expresión de S100A8 (datos no mostrados), que acompaña normalmente a S100A9 en leucocitos, en tanto que se ha descrito que las IECs expresan S100A9 pero no S100A8.



**Figura 14. Expresión proteica de S100A9.** (A) La expresión de la S100A9 se evaluó mediante Western blot en extractos proteicos totales de IECs aisladas de ratones WT y GR a los 7 (D7) y 14 (D14) días del inicio de la administración de tamoxifeno. Los niveles de GAPDH se usaron como control de carga. (B) Membrana representativa de los resultados obtenidos. Datos representativos 1 experimento de n=8. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar. + P<0,05 vs. WT.

La respuesta inmune está íntimamente relacionada con el papel de los GC, que de hecho son utilizados comúnmente como agentes antiinflamatorios. Por tanto, un déficit en la señalización mediada por GR en las IEC podría dar lugar a inflamación

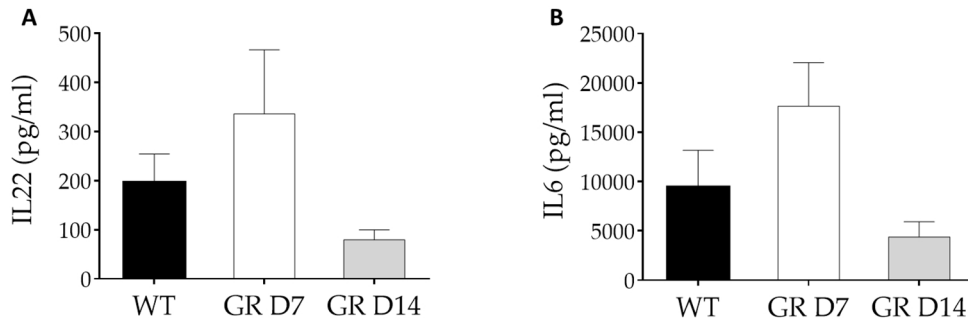
relacionada con alteraciones en vías de señalización inhibitorias. El factor de transcripción STAT3 media respuestas que antagonizan la inflamación. Entre sus efectos, se ha observado que STAT3 se une directamente al promotor de S100A9, inhibiendo su expresión. Por tanto, merecía la pena observar si éste podría ser el responsable del aumento de S100A9.



**Figura 15. Expresión proteica de p-STAT3.** La expresión de p-STAT3 y STAT3 se evaluó mediante Western blot de extractos proteicos totales de (A) IECs aisladas o (B) colon total de ratones WT y GR a los 7 (D7) y 14 (D14) días del inicio de la administración de tamoxifeno. Los niveles de STAT3 se usaron como control de carga. Membrana representativa de los resultados obtenidos en (C) IECs y (D) colon. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar. +  $P < 0,05$  vs. WT.

La fosforilación, y por tanto la activación, de STAT3 aumentó en los ratones carentes de GR en IECs aisladas (figura 15A-C) de manera más pronunciada a los 7 días de la delección que a los 14. Este aumento se observó de igual manera cuando se analizó p-STAT3 en tejido colónico total, en este caso disminuyendo a nivel del control WT el nivel de fosforilación a los 14 días (figura 15B-D).

Tanto la IL22 como la IL6 pueden inducir sinérgicamente la activación de STAT3 en células epiteliales. En nuestro caso, la producción de estas dos citoquinas por explantes de colon tendió a incrementarse al día 7, aunque el incremento no llegó a alcanzar significación estadística (figura 16).

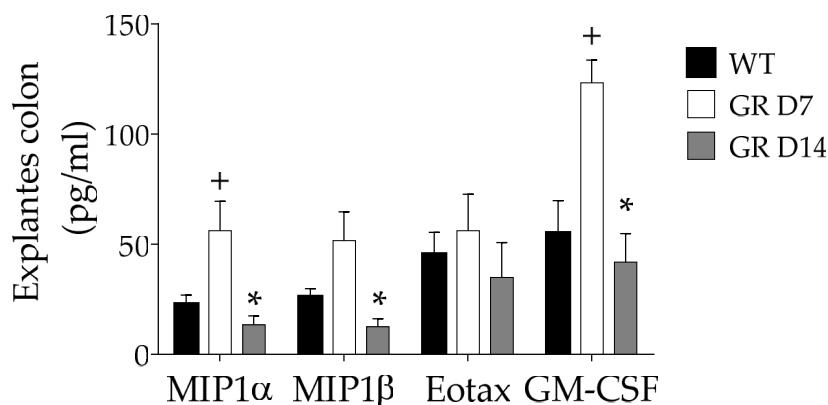


**Figura 16. Producción de IL22 e IL6 en explantes colónicos.** Se evaluó mediante multiplex la producción de IL6 e IL22 en explantes colónicos de ratones WT y GR a los 7 (D7) y 14 (D14) días del inicio de la administración de tamoxifeno. (A) IL22 e (B) IL6. Los explantes fueron cultivados durante 24 horas en medio carente de GC. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media ± error estándar.

### 2.2.4 Estudio de la producción de citoquinas en colon.

Las citoquinas tienen una gran importancia en el entorno intestinal. Éstas pueden ser producidas por las propias IECs y por células inmunes presentes en el tejido, como células dendríticas, macrófagos, linfocitos intraepiteliales y células linfoides innatas (ILC), entre otras. Se decidió realizar un análisis multiplex para determinar en la misma muestra de explantes de colon un abanico de citoquinas amplio.

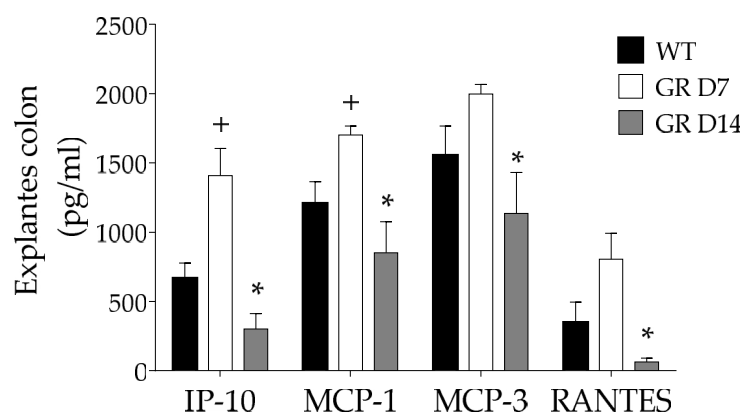
Se observó un aumento de MIP1 $\alpha$  y MIP1 $\beta$  en la primera semana post-delección, aunque solo de manera significativa en el primer caso (figura 17). Estas citoquinas están relacionadas, entre otras acciones, con el reclutamiento de linfocitos  $\gamma\delta$  al entorno intestinal.



**Figura 17. Producción de MIP1 $\alpha$ , MIP1 $\beta$ , Eotaxina y GM-CSF en explantes colónicos.** Se evaluó la producción de citoquinas mediante multiplex en explantes de colon de ratones WT y GR a los 7 (D7) y 14 (D14) días del inicio de la administración de tamoxifeno. Los explantes fueron cultivados durante 24 horas en medio carente de GC. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media ± error estándar. + P<0,05 vs. WT; \* P<0,05 vs. GR D7.

No se observaron cambios en la eotaxina, mientras que sí se observó un aumento sustancial en la producción de GM-CSF, que actúa en el epitelio como señalización para la proliferación celular y aumenta el tropismo intestinal (*gut homing*) de linfocitos mediante la inducción de ácido retinoico por parte de las células dendríticas (figura 17).

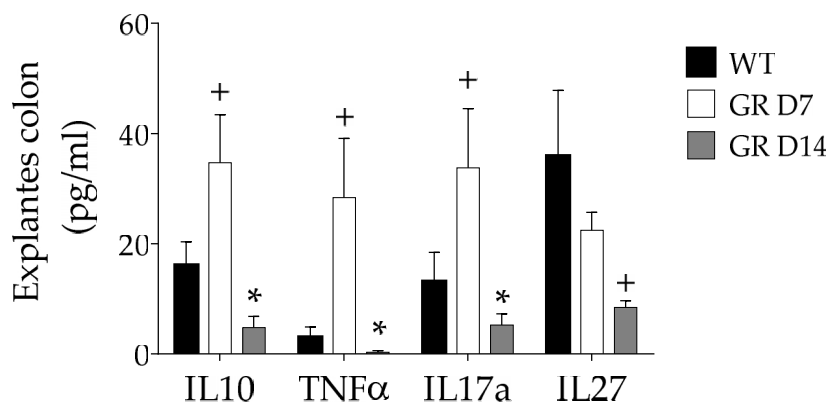
Otras citoquinas inflamatorias analizadas fueron IP-10, MCP-1, MCP-3 y RANTES. Estas cuatro siguieron un patrón similar, mostrando una mayor presencia en el sobrenadante a los 7 días y disminuyendo a los 14 (cambios general, pero no siempre, significativos). Estas citoquinas suelen actuar como quimio atrayentes de monocitos o linfocitos, y suelen encontrarse incrementadas en pacientes con colitis ulcerosa (figura 18).



**Figura 18. Producción de IP-10, MCP-1, MCP-3 y RANTES en explantes colónicos.** Se evaluó la producción de citoquinas mediante multiplex en explantes de colon de ratones WT y GR a los 7 (D7) y 14 (D14) días del inicio de la administración de tamoxifeno. Los explantes fueron cultivados durante 24 horas en medio carente de GC. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar. + P<0,05 vs. WT; \* P<0,05 vs. GR D7.

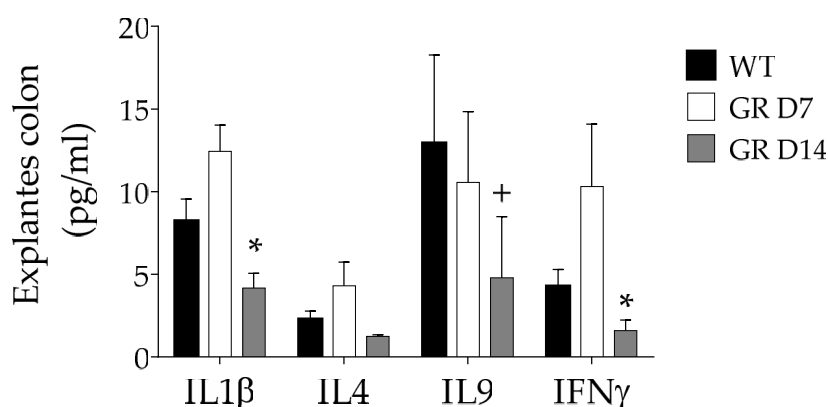
La producción de IL10, TNF $\alpha$  e IL17a presentó el mismo perfil: aumentó a los 7 días de manera significativa con respecto a los ratones WT, y posteriormente se redujo hasta quedar por debajo del nivel de los ratones WT (sin alcanzar el umbral de significación estadística, figura 19).

Estas citoquinas están producidas fundamentalmente por leucocitos, ya sean linfocitos o macrófagos. Por el contrario, la IL27 disminuyó a lo largo del tiempo. Esta citoquina está relacionada con la vía de STAT3, y se le atribuye un papel protector. Su origen es fundamentalmente células dendríticas o macrófagos.



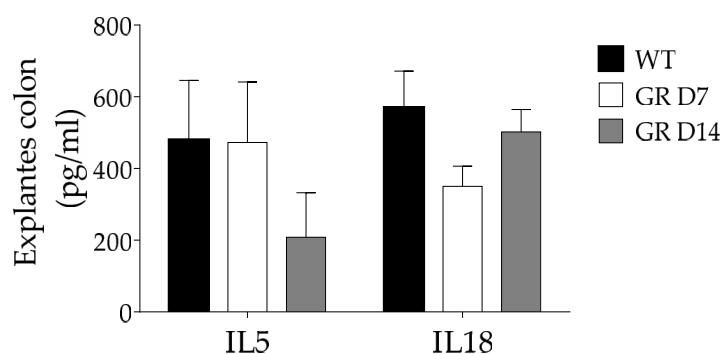
**Figura 19. Producción de IL10, TNF $\alpha$ , IL17a e IL27 en explantes colónicos.** Se evaluó la producción de citoquinas mediante multiplex en explantes de colon de ratones WT y GR a los 7 (D7) y 14 (D14) días del inicio de la administración de tamoxifeno. Los explantes fueron cultivados durante 24 horas en medio carente de GC. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar. + P<0,05 vs. WT; \* P<0,05 vs. GR D7.

La producción de IL1 $\beta$  e IFN $\gamma$  aumentó solo ligeramente a los 7 días (no significativo), para disminuir posteriormente. La IL1 $\beta$  es producida sobre todo por macrófagos, mientras que el IFN $\gamma$  proviene fundamentalmente de linfocitos T. La IL4 colabora junto con el GM-CSF para aumentar el tropismo intestinal, y está producida fundamentalmente por linfocitos Th2. Aunque mostró un perfil equiparable al de la IL1 $\beta$  e IFN $\gamma$ , el nivel de expresión e inducción fue muy bajo. La IL9 siguió un patrón similar al de la IL27 (disminución paulatina). Esta citoquina es producida por linfocitos Th9 y recientemente ha sido descrito que puede contribuir a originar colitis ulcerosa (figura 20).



**Figura 20. Producción de IL1 $\beta$ , IL4, IL9 e IFN $\gamma$  en explantes colónicos.** Se evaluó la producción de citoquinas mediante multiplex en explantes de colon de ratones WT y GR a los 7 (D7) y 14 (D14) días del inicio de la administración de tamoxifeno. Los explantes fueron cultivados durante 24 horas en medio carente de GC. Datos representativos 2 experimento de n=8. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar. + P<0,05 vs. WT; \* P<0,05 vs. GR D7.

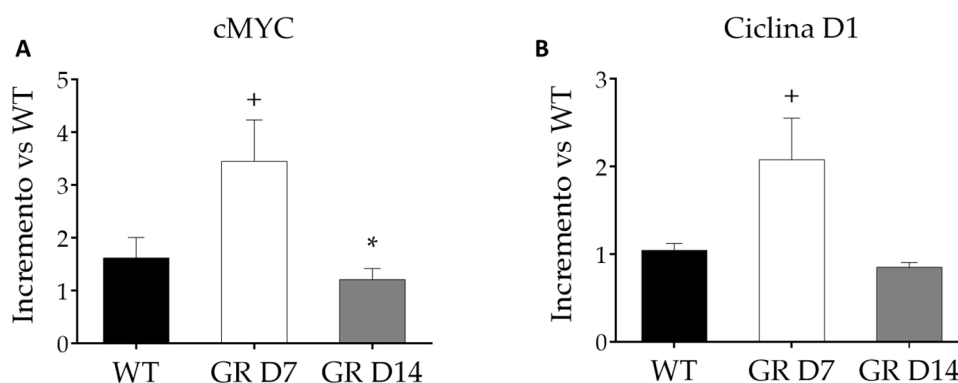
Por último, no se encontraron diferencias significativas en la producción de IL5 ni de IL18 (figura 21).



**Figura 21. Producción de IL5 e IL8 en explantes colónicos.** Se evaluó la producción de citoquinas mediante multiplex de en explantes de colon de ratones WT y GR a los 7 (D7) y 14 (D14) días del inicio de la administración de tamoxifeno. Los explantes fueron cultivados durante 24 horas en medio carente de GC. Datos representativos de 2 experimentos de n=8. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar.

### 2.2.5 Estudio de parámetros relacionados con la proliferación epitelial.

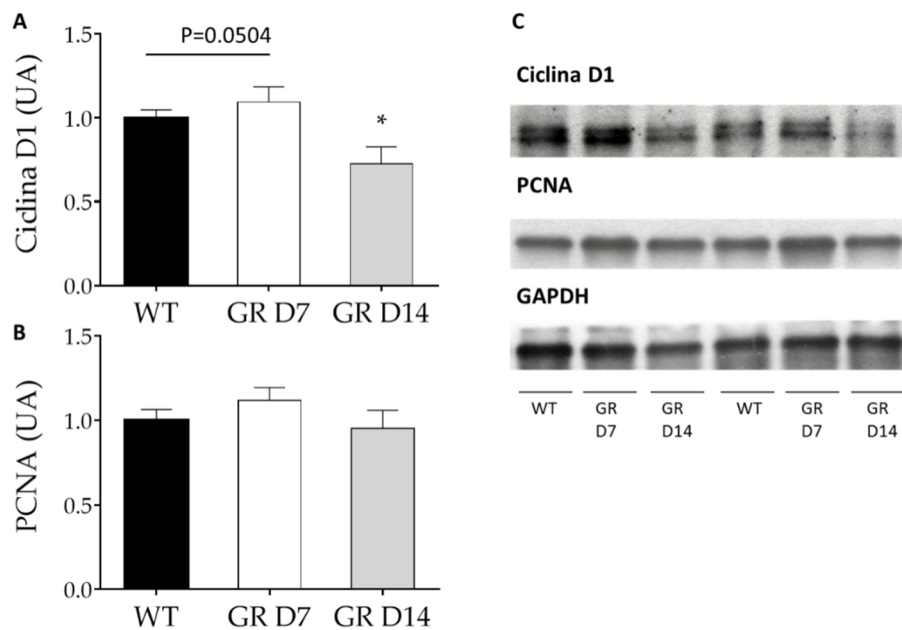
Es conocido el papel de los GC sobre el ciclo celular, por lo que quisimos estudiar si la proliferación a nivel epitelial estaba aumentada. Para ello se midió por qRT-PCR cMYC y la ciclina D1 (figura 22A y B). A los 7 días del inicio de la administración de tamoxifeno, la delección del GR produjo un incremento significativo de la expresión de ambos genes. Estos resultados concuerdan con los efectos anti proliferativos mediados por el GR.



**Figura 22. Estudio de la expresión génica de cMYC y Ciclina D1.** Expresión génica por qRT-PCR en tejido colónico completo de ratones WT y GR a los 7 (D7) y 14 (D14) días del inicio de la administración de tamoxifeno. (A) cMYC y (B) ciclina D1. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar. \*  $P < 0,05$  vs. WT.

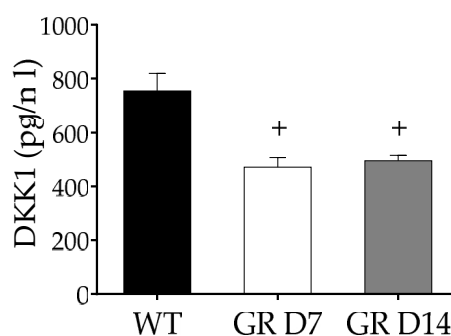
Mediante WB se estudió la expresión proteica de ciclina D1, además de PCNA (figura 23A y B). Los datos obtenidos mostraron cambios más moderados y, aunque se aprecia una ligera tendencia aumentar a los 7 días, no se registraron efectos

significativos, excepto una disminución de la expresión de ciclina D1 a las dos semanas.



**Figura 23. Estudio de la expresión proteica de Ciclina D1 y PCNA.** Expresión génica por Western blot en IECs aisladas de ratones WT y GR a los 7 (D7) y 14 (D14) días del inicio de la administración de tamoxifeno (A) ciclina D1 y (B) PCNA. Membrana representativa de los resultados obtenidos en (C) IECs aisladas. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar. \*  $P < 0,05$  vs. GR D7.

Por último se determinó DKK1 en plasma (figura 24). La proteína DKK1 es antagonista de la señalización WNT, y su aumento suele promover una inhibición de la proliferación. Es conocido que los glucocorticoides aumentan la producción de esta proteína. La ausencia de señalización mediada por el GR en las IECs redujo la concentración plasmática de DKK1 tanto a día 7 como a día 14.

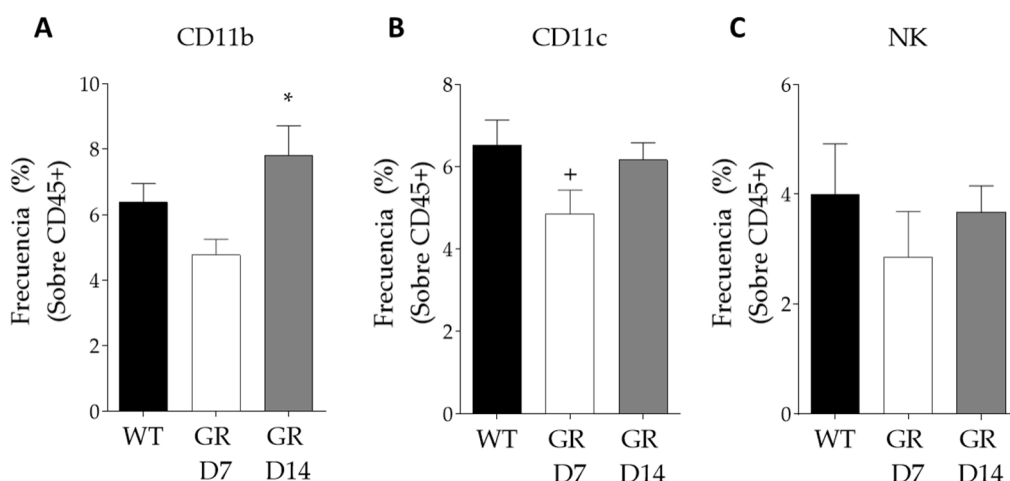


**Figura 24. Estudio de DKK1 plasmática.** Medida de DKK1 en plasma de ratones WT y GR a los 7 (D7) y 14 (D14) días del inicio de la administración de tamoxifeno mediante ELISA. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar. +  $P < 0,05$  vs. WT.

### 2.2.6 Estudio de la composición celular de ganglios mesentéricos.

Según los resultados que hemos expuesto hasta ahora en esta memoria, la ausencia del GR en las células epiteliales ha mostrado tener consecuencias no solo en las propias células epiteliales, sino también en células de la inmunidad innata y adaptativa. Por este motivo se realizó un análisis por citometría de flujo de la composición relativa de los leucocitos presentes en los ganglios mesentéricos.

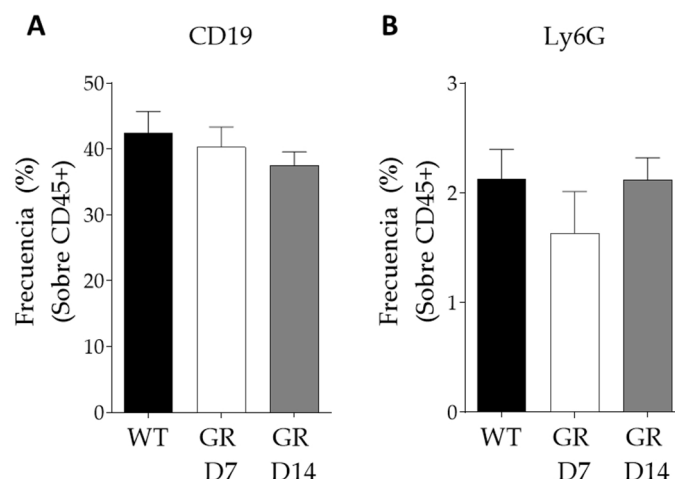
El análisis se hizo en referencia a las células que expresaron CD45, que se usó como marcador general leucocitario. Se produjo una ligera disminución de los macrófagos y las DC a los 7 días tras la administración de tamoxifeno (figura 25A y B), aunque solo fue significativo en el caso de estas últimas. Este efecto fue revertido a la siguiente semana, produciéndose incluso un aumento significativo de los macrófagos, pero no de las DC. No se observaron diferencias significativas en el caso de las células NK (figura 25C).



**Figura 25. Citometría de ganglios mesentéricos (I).** Análisis por citometría de flujo de células CD11b (macrófagos), CD11c (células dendríticas) y NK (linfocitos *natural killer*) en ganglios mesentéricos de ratones WT y GR a los 7 (D7) y 14 (D14) días del inicio de la administración de tamoxifeno. El análisis se realizó tomando como referencia (*gate*) las células CD45+. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar. + P<0,05 vs. WT; \* P<0,05 vs. GR D7.

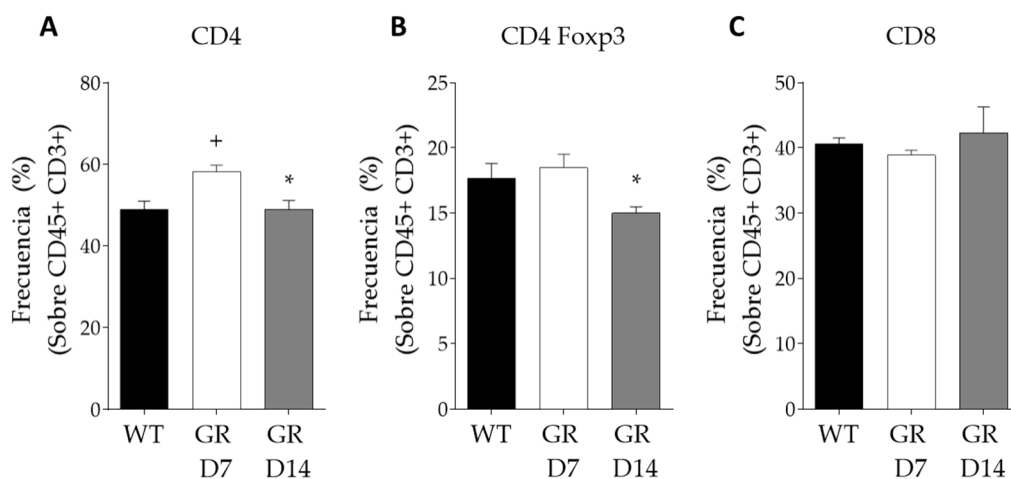
Se observó una disminución de la presencia relativa de linfocitos B en ganglios mesentéricos a lo largo del tiempo, sin llegar a ser significativa ni a 7 ni a 14 días (figura 26A). Del mismo modo, las variaciones de las células Ly6G+ (figura 26B), que son en su gran mayoría neutrófilos, tampoco alcanzó la significación en ninguno de los tiempos.





**Figura 26. Citometría de ganglios mesentéricos (II).** Análisis por citometría de flujo de células CD19+ (linfocitos B) y Ly6G+ (neutrófilos) en ganglios mesentéricos de ratones WT y GR a los 7 (D7) y 14 (D14) días del inicio de la administración de tamoxifeno. El análisis se realizó tomando como referencia (*gate*) las células CD45+. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar.

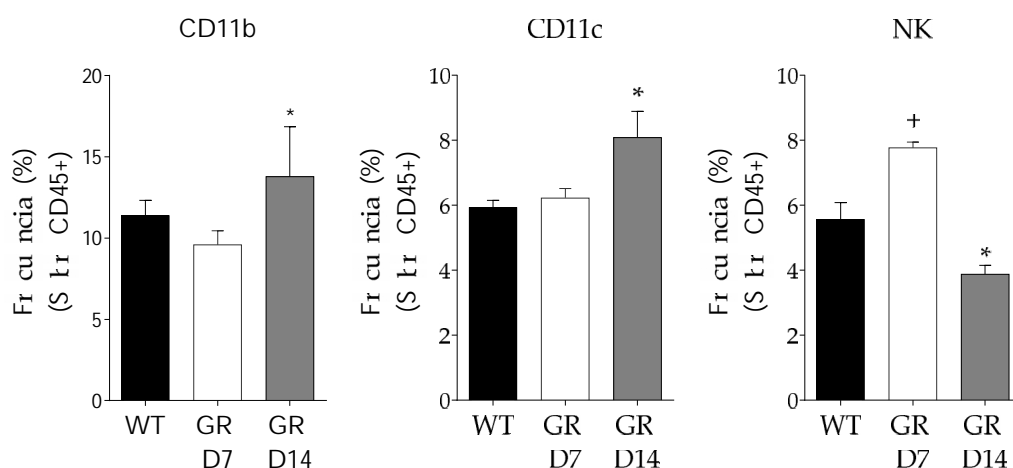
Por último, se analizó la presencia en ganglios mesentéricos de linfocitos T partiendo de un *gate* en CD45 y CD3. Los linfocitos T CD4+ aumentaron a los 7 días, factor que se vio corregido a los 14 días de la administración de tamoxifeno (figura 27A). De estas células CD4+, la cantidad de células FOXP3+, es decir, linfocitos T reguladores, permaneció inalterada a los 7 días y disminuyó a los 14 (figura 27B). No se observaron diferencias en los linfocitos T CD8+ (figura 27C).



**Figura 27. Citometría de ganglios mesentéricos (III).** Análisis por citometría de flujo de linfocitos (A) CD4+, (B) CD8+ y (C) CD4+Foxp3+ en ganglios mesentéricos de ratones WT y GR a los 7 (D7) y 14 (D14) días del inicio de la administración de tamoxifeno. El análisis se realizó tomando como referencia (*gate*) las células CD45+ y CD3+. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar. <sup>+</sup> P<0,05 vs. WT.

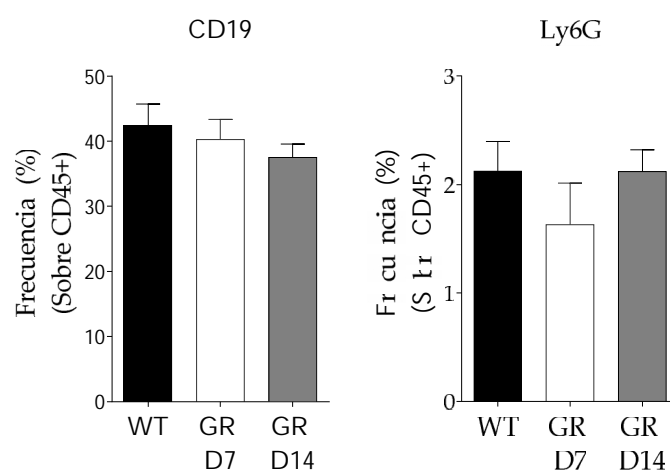
### 2.2.7 Estudio de la composición celular en el bazo.

Del mismo modo que en el apartado anterior, se estudió por citometría de flujo la composición celular del bazo. Tanto los macrófagos como las células dendríticas aumentaron de manera significativa a los 14 días (figura 28A y B), mientras que el número de células NK aumentó a los 7 días y posteriormente disminuyó, en ambos casos con carácter significativo (figura 28C).



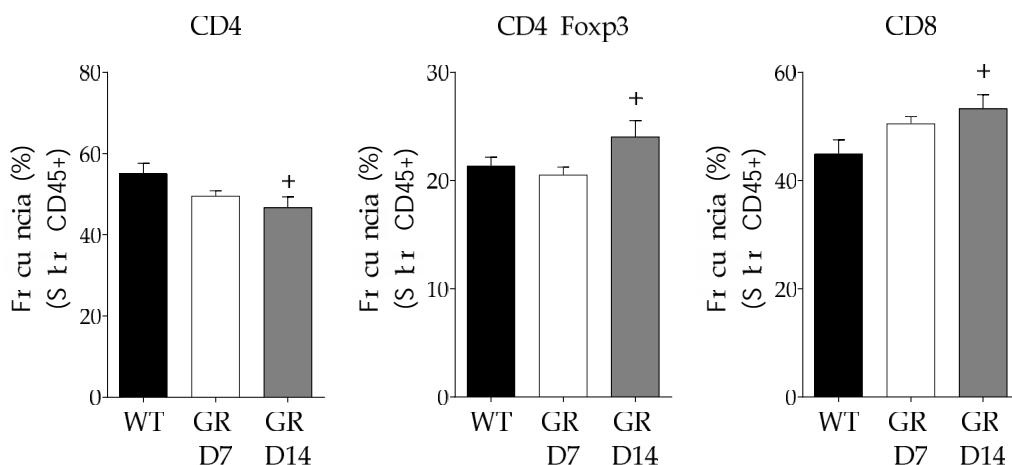
**Figura 28. Citometría de bazo (I).** Análisis por citometría de flujo de células CD11b, CD11c y NK en el bazo de ratones WT y GR a los 7 (D7) y 14 (D14) días del inicio de la administración de tamoxifeno. El análisis se realizó desde un *gate* sobre células CD45+. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar. + P<0,05 vs. WT; \* P<0,05 vs. GR D7.

No se encontraron diferencias en el porcentaje de linfocitos B ni de neutrófilos que se encontraban en el bazo (figura 29).



**Figura 29. Citometría de bazo (II).** Análisis por citometría de flujo de células CD19+ (linfocitos B) y Ly6G+ (neutrófilos) en el bazo de ratones WT y GR a los 7 (D7) y 14 (D14) días del inicio de la administración de tamoxifeno. El análisis se realizó desde un *gate* sobre células CD45+. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar.

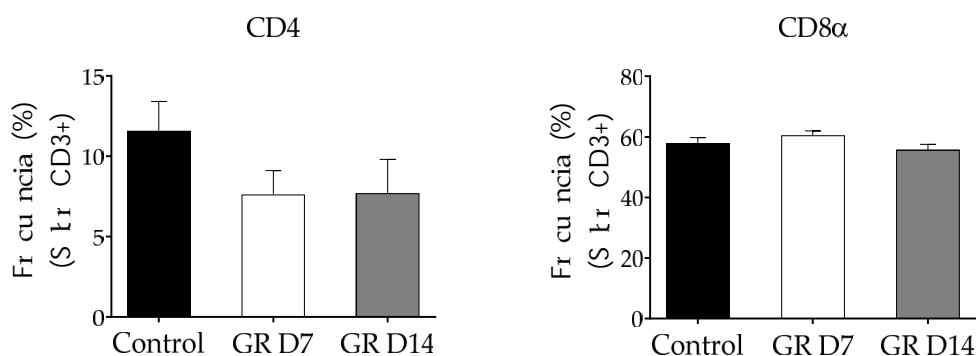
Haciendo referencia a los linfocitos T, la cantidad de CD4 disminuyó con el tiempo a favor de un aumento de los linfocitos T CD8 (figura 30A y B). Sin embargo, pese a la disminución del porcentaje de los CD4 se observó un aumento de la proporción de T reguladoras dentro de estos (figura 30C).



**Figura 30. Citometría de bazo (III).** Análisis por citometría de flujo de linfocitos (A) CD4+, (B) CD8+ y (C) CD4+Foxp3+ en el bazo de ratones WT y GR a los 7 (D7) y 14 (D14) días del inicio de la administración de tamoxifeno. El análisis se realizó desde un gate sobre células CD45+ y CD3. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media ± error estándar. + P<0,05 vs. WT.

### 2.2.8 Estudio de la composición de linfocitos intraepiteliales.

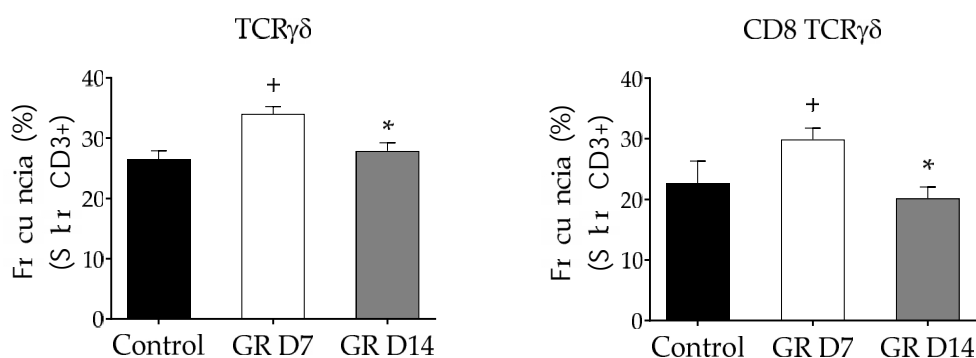
Los linfocitos intraepiteliales (IELs) se encuentran situados entre las criptas del epitelio intestinal y tienen una gran relevancia en la inmunología de la mucosa, debido a su estrecho contacto con las IECs y a su acceso directo a los antígenos luminales.



**Figura 31. Citometría de linfocitos intraepiteliales (I).** Análisis por citometría de flujo de células (A) CD4+ y (B) CD8α+ del epitelio de ratones WT y GR a los 7 (D7) y 14 (D14) días del inicio de la administración de tamoxifeno. El análisis se realizó con referencia (*gate*) a las células CD3+. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media ± error estándar. + P<0,05 vs. WT.

Se observó un descenso en la proporción de linfocitos CD4<sup>+</sup>, sin alcanzar la significación estadística (figura 31A). Por el contrario, la proporción de células CD8 $\alpha$  permaneció constante, lo que sugiere que dicho descenso se produce a favor de los linfocitos CD8 $\alpha$ <sup>-/-</sup> (figura 31B).

Sí se encontraron diferencias al analizar la proporción de linfocitos TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>, la cual se vio incrementada a los 7 días del experimento y posteriormente se normalizó (figura 32A). La proporción de células con doble marcaje TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> fue similar (figura 32B).

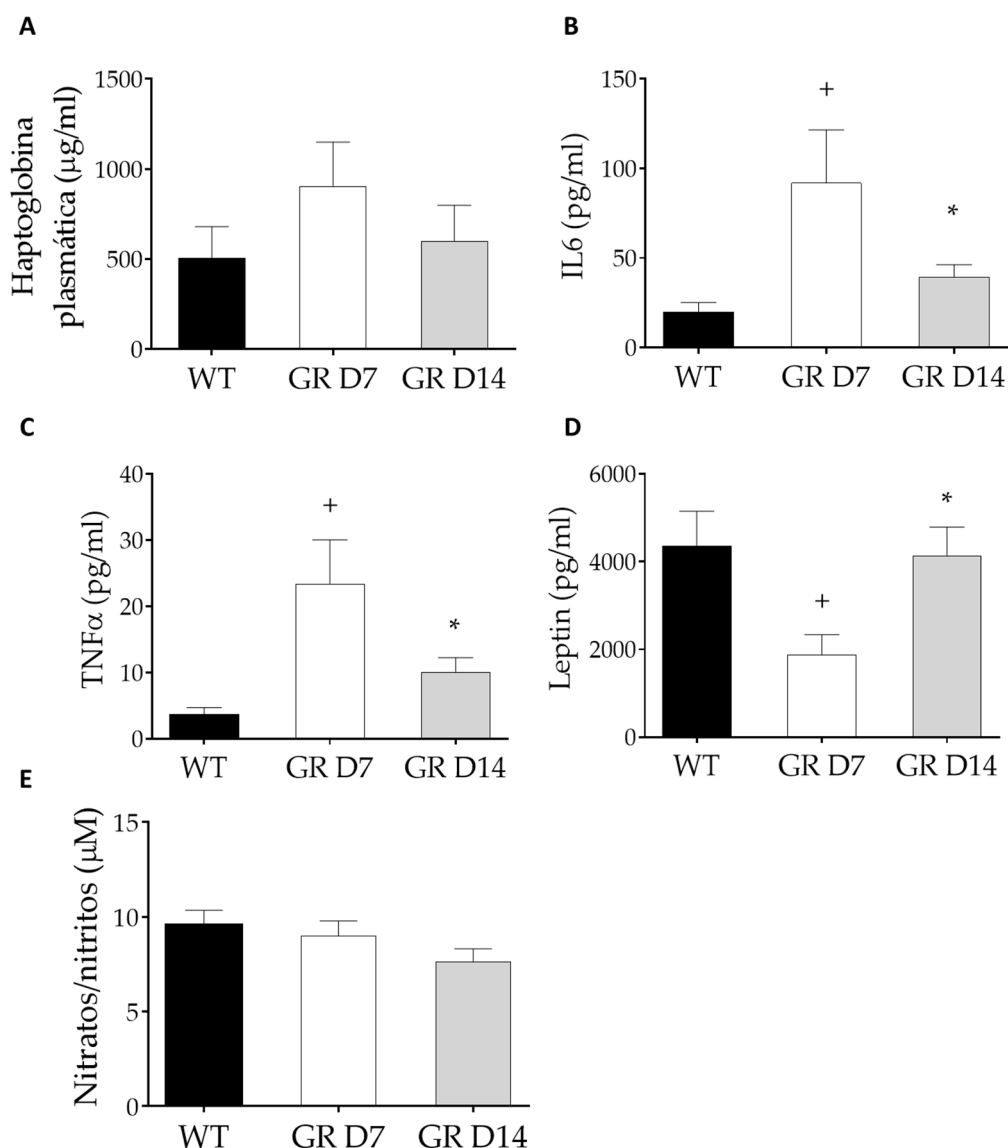


**Figura 32. Citometría de linfocitos intraepiteliales (II).** Análisis por citometría de flujo de células (A) TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> y (B) CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> del epitelio de ratones WT y GR a los 7 (D7) y 14 (D14) días del inicio de la administración de tamoxifeno. El análisis se realizó desde un *gate* sobre células CD3<sup>+</sup>. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar. + P<0,05 vs. WT.

### 2.2.9 Estudio de parámetros plasmáticos.

Los resultados mostrados hasta ahora indican que al menos a los 7 días de iniciar el tratamiento con tamoxifeno la delección del GR en las IECs induce inflamación intestinal. Con el fin de caracterizar el efecto sobre parámetros inflamatorios a nivel sistémico determinamos haptoglobina, IL6 y TNF $\alpha$  en plasma.

El perfil de niveles plasmáticos de haptoglobina, IL6 y TNF $\alpha$  fue muy similar, con un aumento a los 7 días y normalización a los 14 días, aunque los cambios fueron significativos únicamente en el caso de IL6 y TNF $\alpha$  (figura 33). Por último se midió la leptina, recientemente relacionada con fenómenos inflamatorios, observándose un perfil exactamente contrario, es decir, disminución a la semana y normalización a las dos semanas. Estos datos indican que los ratones experimentan una respuesta inflamatoria a nivel sistémico como consecuencia a la delección de GR en las IECs.



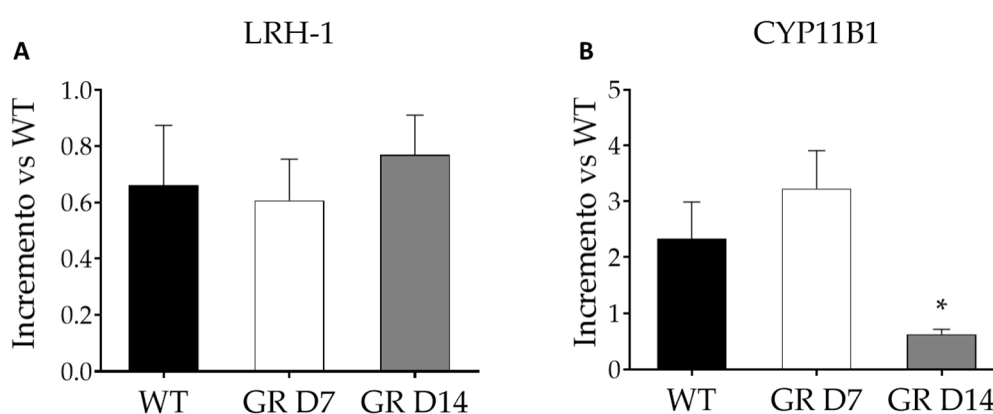
**Figura 33. Medida de parámetros inflamatorios plasmáticos.** Medida de (A) haptoglobina, (B) IL6, (C) TNF $\alpha$ , (D) leptina y (E) nitratos en plasma de ratones WT y GR a los 7 (D7) y 14 (D14) días del inicio de la administración de tamoxifeno. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar. + P<0,05 vs. WT; \* P<0,05 vs. GR D7.

### 2.2.10 Estudio de parámetros relacionados con los GCs endógenos.

El papel de los GCs endógenos en el mantenimiento de la homeostasis es bien conocido, así como su síntesis y regulación por el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal. La fisiología de los GCs en el intestino adquiere características específicas, sin embargo, en la medida en que, según se ha descrito recientemente, su producción en el intestino no depende del eje HPA, sino de la presencia de LRH-1 (como se explica en el punto 1.7.2 de la introducción). Además, se ha descrito que los GCs locales pueden no solo ejercer papeles inmunomoduladores clásicos, sino también ayudar a la activación de linfocitos T.

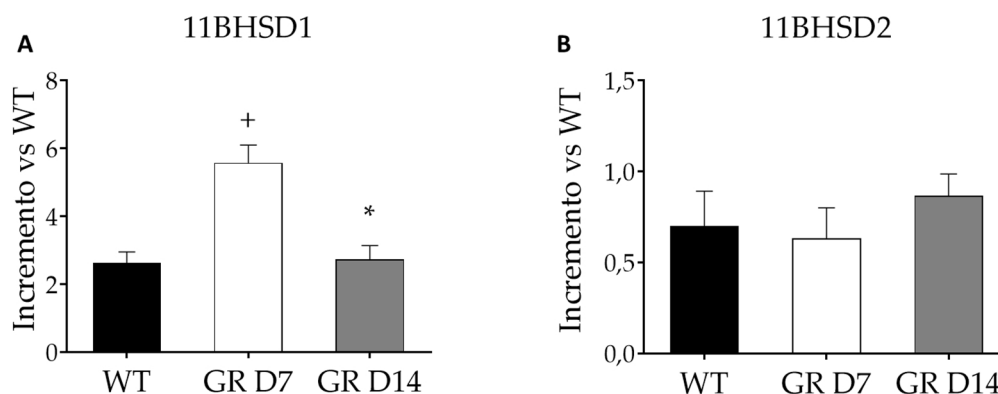
La síntesis de GCs en el epitelio intestinal es, por tanto, de gran importancia para nuestro estudio. Por otra parte, la ausencia de señalización a nivel del GR epitelial podría influir en la regulación sistémica de la síntesis de GCs. Por todo ello estudiamos la expresión de LRH-1, responsable de inducir la síntesis intestinal de GC, de CYP11B1, enzima implicada en la propia síntesis de GC, y de las enzimas 11 $\beta$ -HSD1 y 11 $\beta$ -HSD2, responsables de la interconversión entre corticosterona y 11-dehidrocorticosterona (esquema 1).

No hubo cambios destacables en la expresión génica de LRH-1 en ninguno de los dos tiempos (figura 34A), lo que podría indicar pocos cambios en la síntesis de LRH-1 intestinal. Sin embargo, se observó una disminución de la expresión de la enzima CYP11B1 entre el día 14 y el día 7 (no llegó a disminuir significativamente con respecto a WT,  $P = 0,319$ ), sin cambios aparentes a los 7 días, más allá de una cierta tendencia a aumentar (figura 34B).



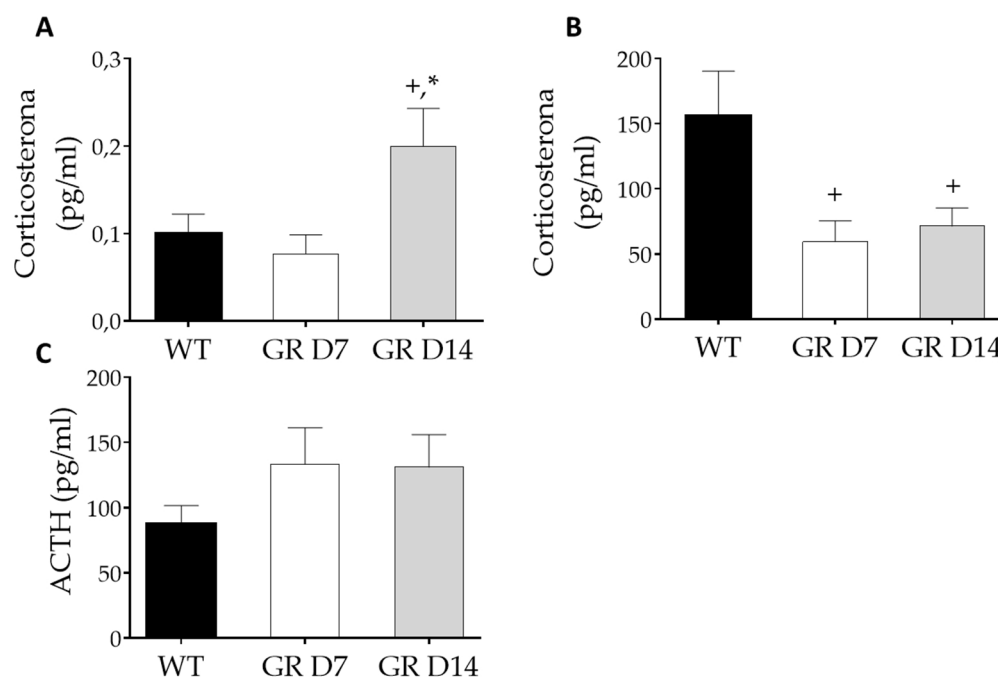
**Figura 34. Estudio de la expresión génica de LRH-1 y CYP11B1.** Expresión génica por qRT-PCR en tejido colónico completo de ratones WT y GR a los 7 (D7) y 14 (D14) días del inicio de la administración de tamoxifeno. (A) LRH-1 y (B) CYP11B1. Datos representativos de experimento de  $n=8$ . Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar. \*  $P<0,05$  vs. GR D7

Pudo observarse además un aumento en el primer tiempo experimental de la expresión génica de 11 $\beta$ -HSD1 (figura 35A), efecto que se vio revertido a día 14. La otra isoforma, 11 $\beta$ -HSD2 no mostró cambios en su expresión génica (figura 35B).



**Figura 35. Estudio de la expresión génica de 11β-HSD1 y 11β-HSD2.** Expresión génica por qRT-PCR en tejido colónico completo de ratones WT y GR a los 7 (D7) y 14 (D14) días del inicio de la administración de tamoxifeno. (A) 11β-HSD1 y (B) 11β-HSD2. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media ± error estándar. + P<0,05 vs. WT; \* P<0,05 vs. GR D7.

La producción de corticosterona se evaluó tanto a nivel sistémico (concentración en plasma) como local (explantes colónicos). Los explantes colónicos a día 14 produjeron más corticosterona que los ratones WT y los GR D7 (figura 36A).



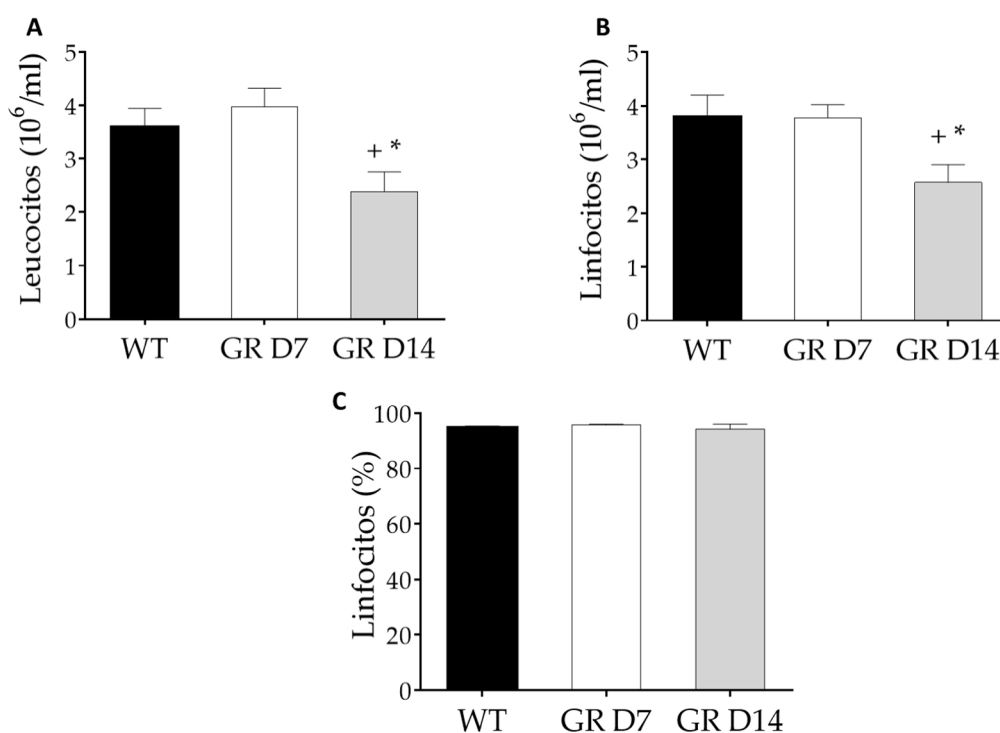
**Figura 36. Medida de corticosterona y ACTH.** Medida de (A) corticosterona en explantes de colon o (B) plasma y (C) ACTH plasmática de ratones WT y GR a los 7 (D7) y 14 (D14) días del inicio de la administración de tamoxifeno. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media ± error estándar. + P<0,05 vs. WT; \* P<0,05 vs. GR D7.

Por el contrario, los niveles plasmáticos de corticosterona fueron inferiores en los animales GR en los dos tiempos experimentales (figura 36B). Por su parte, la ACTH

plasmática aumentó ligeramente en los grupos GR frente al WT, aunque sin llegar al umbral de significación estadística (figura 36C)

### 2.2.11 Estudio hematológico.

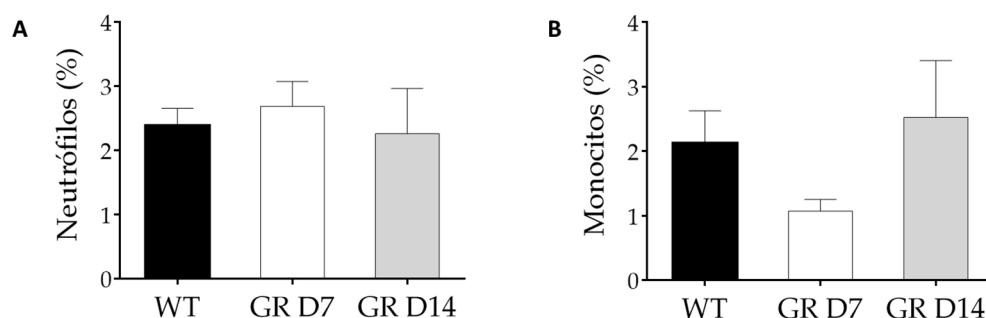
El análisis del hemograma mostró un ligero aumento de leucocitos a los 7 días, seguido a los 14 días por un marcado descenso, llegando a niveles inferiores a los de los ratones WT, aunque sin ser significativos (figura 37A). El recuento de linfocitos bajó en paralelo al de leucocitos totales, sin variar su porcentaje (figura 37B y C).



**Figura 37. Leucocitos y linfocitos sanguíneos.** (A) Número total de leucocitos y linfocitos (B) en sangre de ratones WT y GR a los 7 (D7) y 14 (D14) días del inicio de la administración de tamoxifeno. (C) Cantidad relativa (%) de linfocitos en sangre periférica. Datos representativos de experimento de  $n=8$ . Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar. +  $P<0,05$  vs. WT; \*  $P<0,05$  vs. GR D7.

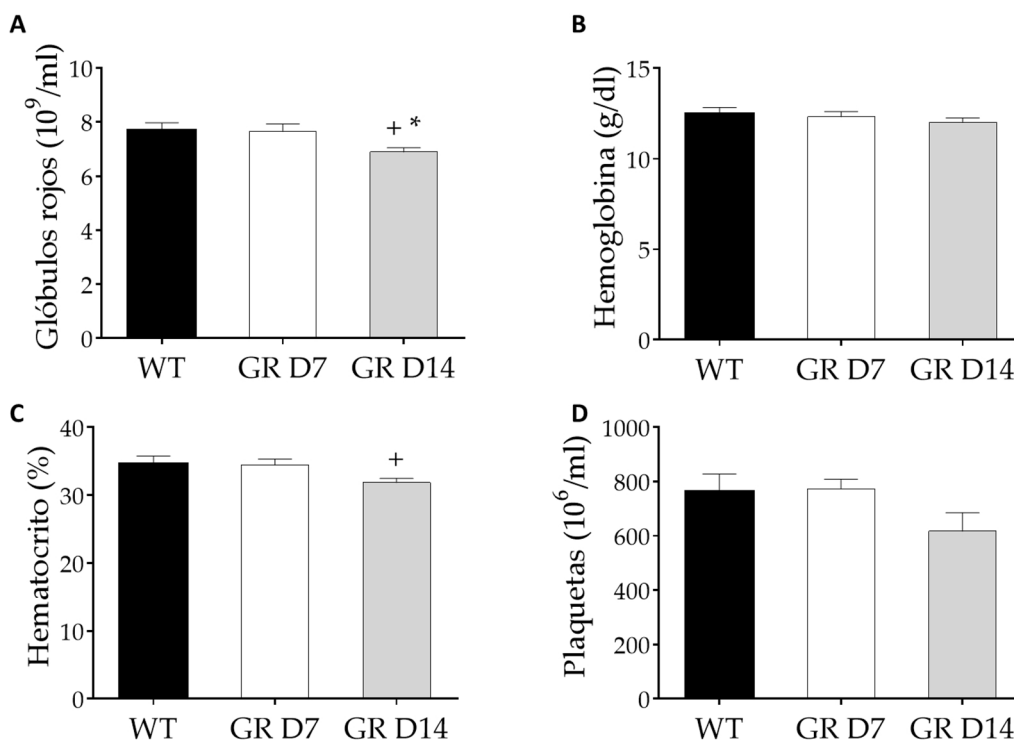
Con respecto a los neutrófilos (figura 38A) y los monocitos (figura 38B), no se encontraron diferencias significativas en cuanto al porcentaje de leucocitos, aunque este valor fue sensiblemente menor a los 7 días.





**Figura 38. Neutrófilos y monocitos sanguíneos.** (A) Cantidad relativa (%) de neutrófilos y (B) monocitos en sangre de ratones WT y GR a los 7 (D7) y 14 (D14) días del inicio de la administración de tamoxifeno. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar.

El recuento de eritrocitos puso de manifiesto una disminución del 10% a los 14 días, acompañado de un descenso en paralelo del hematocrito y de la hemoglobina (no significativo para ésta última, figura 38). Estos datos sugieren la existencia de hemorragia en los ratones con delección de GR epitelial. El número de plaquetas mostró la misma tendencia, que no llega a ser significativa debido a la gran variabilidad que muestra la medida.



**Figura 39. Parámetros sanguíneos.** (A) Cantidad de eritrocitos, (B) hemoglobina, (C) hematocrito y (D) plaquetas en sangre de ratones WT y GR a los 7 (D7) y 14 (D14) días del inicio de la administración de tamoxifeno. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar. + P<0,05 vs. WT; \* P<0,05 vs. GR D7.

### **3 Papel del GR en el epitelio intestinal de animales al inicio de la colitis inducida por DSS.**

En el artículo incluido en esta tesis doctoral confirmamos que la budesonida administrada por vía oral tiene efectos beneficiosos de carácter antiinflamatorio en la colitis experimental por DSS en ratones. Sin embargo, al mismo tiempo se observaba un empeoramiento en el estado general del animal, de forma que los ratones tratados perdían más peso y llegaban incluso en algunos casos a la muerte, en tanto que la mortalidad era prácticamente nula en el grupo control. Este efecto perjudicial fue achacado a un debilitamiento de la función de barrera intestinal, incluyendo efectos nocivos sobre el epitelio. Por tanto, una vez caracterizado el fenotipo de los ratones GR<sup>ΔIEC</sup>, procedimos a estudiar el impacto de la delección del GR epitelial en la inflamación colónica experimental inducida por DSS. Debido al carácter variable del fenotipo en función del tiempo, se llevaron a cabo distintos protocolos experimentales, induciendo la inflamación a diferentes tiempos a partir de la administración de tamoxifeno, y por tanto de la delección génica. Aunque la mayor parte de los resultados experimentales obtenidos corresponden a animales sacrificados a los 7 días de la inducción de colitis (procedimiento estándar en este modelo), para mayor claridad expondremos en primer lugar los datos derivados de un experimento en el que los animales fueron sacrificados el primer día de administración de DSS. Dicho experimento se planteó tras constatar cambios sustanciales en la respuesta temprana (1 día) y tardía (7 días). En concreto, en tres experimentos independientes se observó la presencia de sangre en heces en los animales con silenciamiento genético del GR, lo que sugería una lesión inflamatoria temprana.

#### **3.1 Estudio macroscópico y microscópico de la respuesta temprana a la inducción de colitis por DSS.**

Como se indica en material y métodos, en este experimento se inició la administración de DSS 7 días después de la primera dosis de tamoxifeno, y los animales fueron sacrificados un día después. Esto significa que el estado de los animales GR es directamente comparable con el de los del grupo de 7 días post-tamoxifeno de la sección anterior (teniendo en cuenta la inducción de colitis, por supuesto). El diseño experimental incluye un diseño 2x2 con un total de 4 grupos, debido a la adición de la variable del tratamiento con el corticoide budesonida (BD), a la dosis de 6 µg por ratón y día. La elección de la budesonida como glucocorticoide exógeno se debió a su baja distribución sistémica, menor a un 10%, asegurándonos así que el efecto observado iba a ser sobre las células presentes en el epitelio

intestinal y sus proximidades. Además, fue el corticoide utilizado en experimentos anteriores de nuestro grupo dentro de esta línea de investigación.

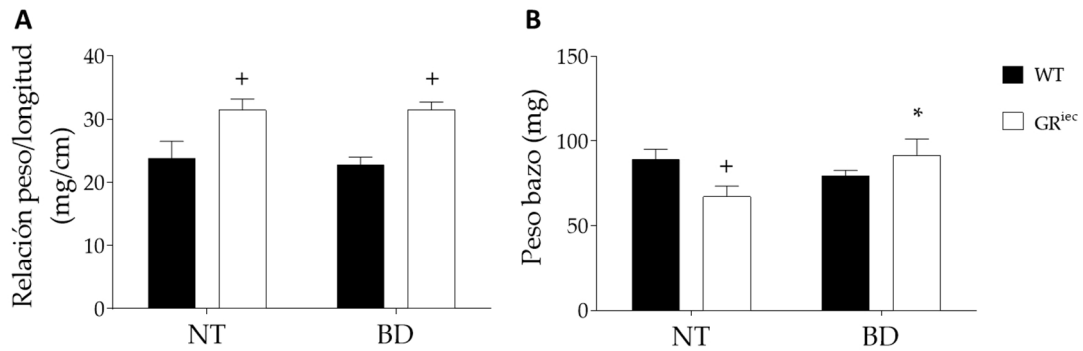
El aspecto general del colon era prácticamente normal en los ratones WT, recibieran o no budesonida, observándose quizás las heces con algo menos de consistencia que en los ratones controles. Por el contrario, se apreciaron cambios muy marcados en los animales  $GR^{AIEC}$ , en cuanto a las heces, con evidente sangrado y aspecto algo blandas, y en cuanto al colon, que experimentó un cierto acortamiento y una consistencia más frágil, así como un ciego algo más vacío. El aspecto general mejoró en al menos algunos de los ratones cuando fueron tratados con BD (figura 40).



**Figura 40. Aspecto macroscópico del colon en la fase temprana de la colitis por DSS.**

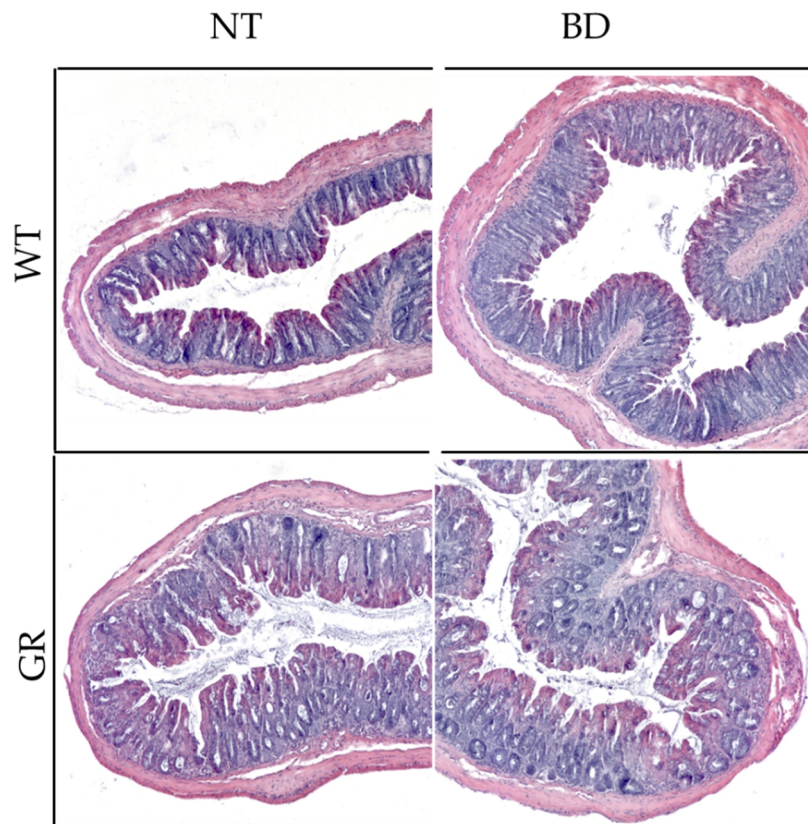
Fotografías representativas de colon tras 1 día de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a  $6 \mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$ . Fotografías representativas de un experimento de  $n=8$ .

Estos cambios macroscópicos se correspondieron con una alteración en la relación entre peso y longitud del colon, que fue significativamente mayor en los grupos GR que los grupos WT (figura 41A). El peso del bazo mostró una disminución significativa en el grupo  $GR^{AIEC}$  no tratado con respecto a su control WT, mientras que, por el contrario, el peso aumentó en el grupo  $GR^{AIEC}$  tratado con BD con respecto al control WT (figura 41B).



**Figura 41. Relación peso longitud de colon y peso del bazo en la fase temprana de la colitis por DSS.** (A) Relación peso (mg) / longitud (cm) de colon y (B) peso del bazo (mg) tras 1 día de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6  $\mu$ g/ratón/día. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar. + P<0,05 vs. WT; \* P<0,05 vs. NT.

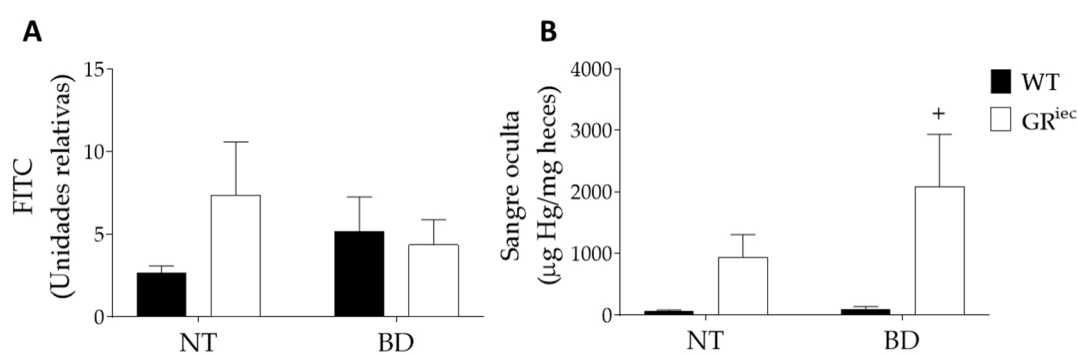
Los cortes histológicos del colon de los ratones WT, tanto no tratados como tratados con BD, mostraron un aspecto muy similar al de un colon normal, sin evidencias patentes de daño o inflamación achacables al DSS. En cambio, los ratones GR presentaron una mayor infiltración leucocitaria, malformación en las criptas, y un aspecto general claramente diferente al normal (Figura 41).



**Figura 42. Histología de colon en la fase temprana de la colitis por DSS.** Fotografías representativas de hematoxilina/eosina de colon de ratones tras 1 día de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6  $\mu$ g/ratón/día. Fotografías representativas de dos experimentos de n=8.

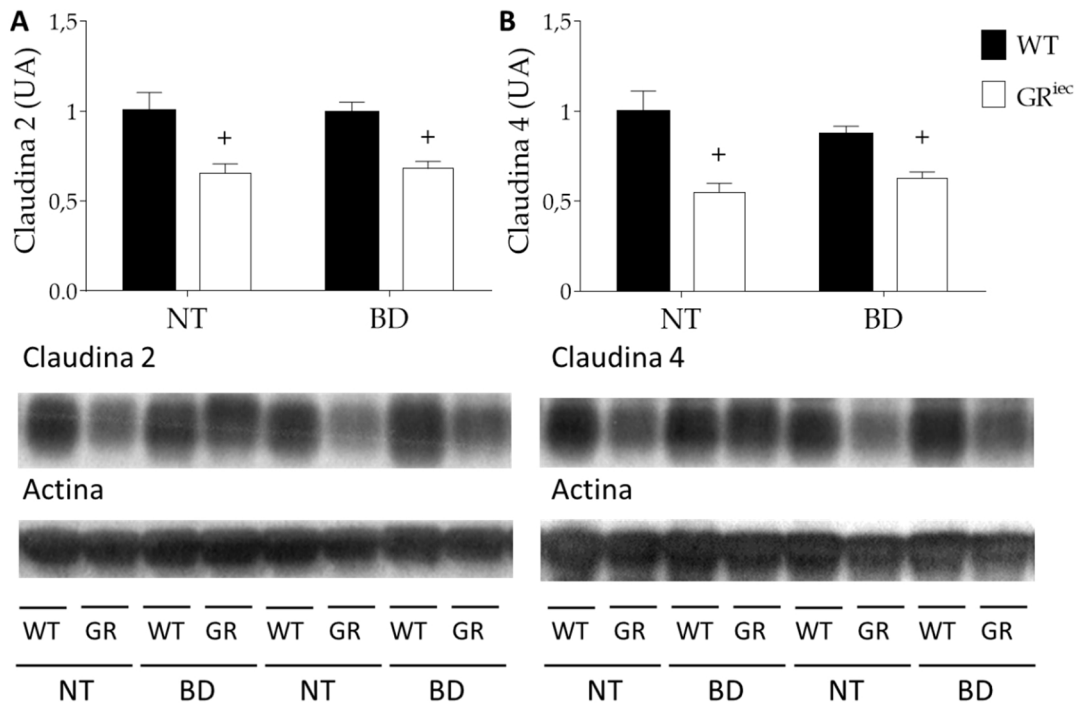
### 3.2 Estudio de la funcionalidad epitelial intestinal en la respuesta temprana a la inducción de colitis por DSS.

Estudiamos la permeabilidad intestinal mediante la administración oral de FITC dextrano 4 kDa 4 horas antes del sacrificio de los animales y posterior determinación mediante fluorimetría. Pese a la tendencia a aumentar en los ratones GR NT frente a los WT, los resultados no alcanzan la significación estadística debido a la disparidad de valores entre los animales (figura 43A). En todo caso los valores fueron menores con el tratamiento con BD. La sangre oculta en heces fue mínima en los grupos WT y aumentó considerablemente en los ratones GR<sup>ΔIEC</sup>, particularmente en los tratados con budesonida (figura 43B).



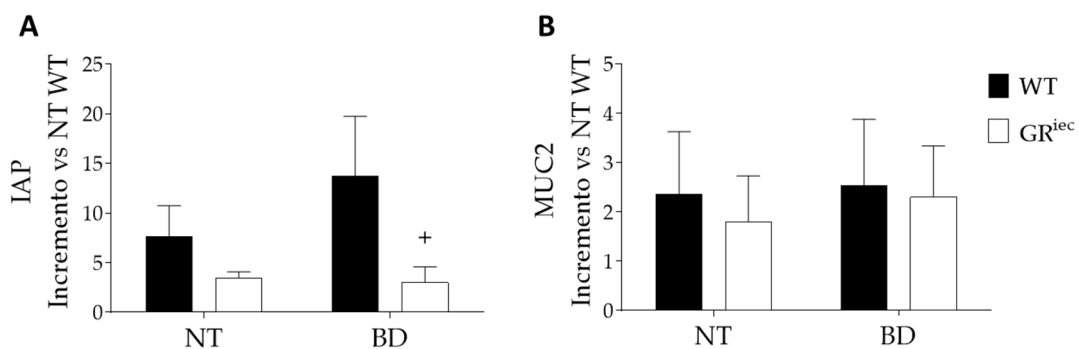
**Figura 43. Determinación de FITC dextrano 4 kDa en plasma y sangre oculta en heces en la fase temprana de la colitis por DSS.** Medida de (A) FITC dextrano 4 kDa en plasma y (B) sangre oculta en heces tras 1 día de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6 µg/ratón/día. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media ± error estándar.

Se analizó la expresión proteica de claudina 2 y 4 como componentes relevantes de las uniones estrechas. Tanto la claudina 2 como la 4 mostraron una disminución significativa en ambos grupos GR frente al WT, sin efecto aparente de la budesonida (figura 44).



**Figura 44. Expresión proteica de claudina 2 y 4 en la fase temprana de la colitis por DSS.** La expresión de la proteína (A) claudina 2 y (B) claudina 4 se evaluó mediante *Western blot* de extractos proteicos totales. Los niveles de actina se usaron como control de carga. (C-D) Membrana representativa de los resultados obtenidos tras 1 día de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6 µg/ratón/día. Los datos se expresan como media ± error estándar. + P<0,05 vs. WT.

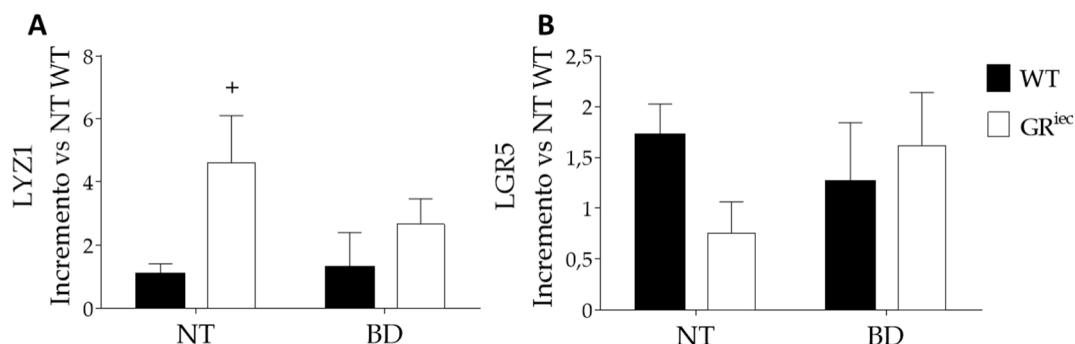
La expresión génica de IAP mostraba una menor expresión en ambos grupos GR con respecto a sus grupos WT (figura 45A), siendo significativo solo en el grupo GR BD. Por otro lado, no se observaron cambios en la expresión de MUC2 (figura 45B).



**Figura 45. Estudio de la expresión génica de IAP Y MUC2 en la fase temprana de la colitis por DSS.** Expresión génica por qRT-PCR en tejido colónico completo de (A) IAP y (B) MUC2 tras 1 día de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6 µg/ratón/día. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media ± error estándar. + P<0,05 vs. WT.

La expresión génica del marcador de células de Paneth LYZ1 aumentó de manera significativa en los ratones GR no tratados, pero no en los tratados con budesonida

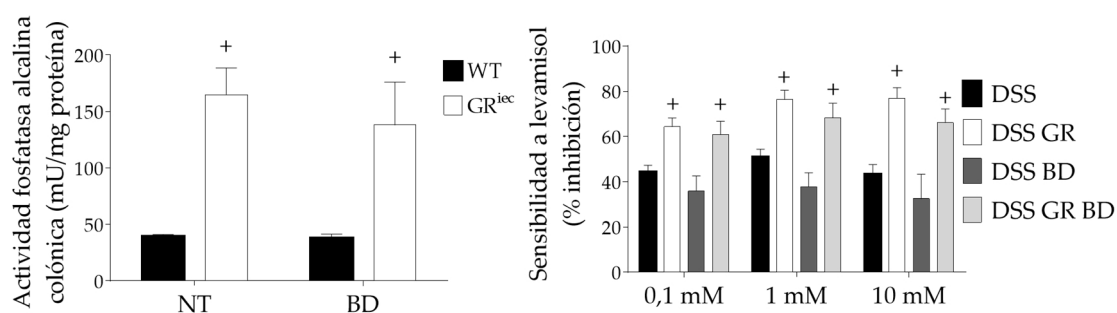
(figura 46A). No hubo diferencias significativas en la medida de la expresión génica de LGR5 (figura 46B).



**Figura 46. Estudio de la expresión génica de LYZ1 y LGR5 en la fase temprana de la colitis por DSS.** Expresión génica por qRT-PCR en tejido colónico completo de (A) LYZ1 y (B) LGR5 tras 1 día de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6 µg/ratón/día. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media ± error estándar. + P<0,05 vs. WT.

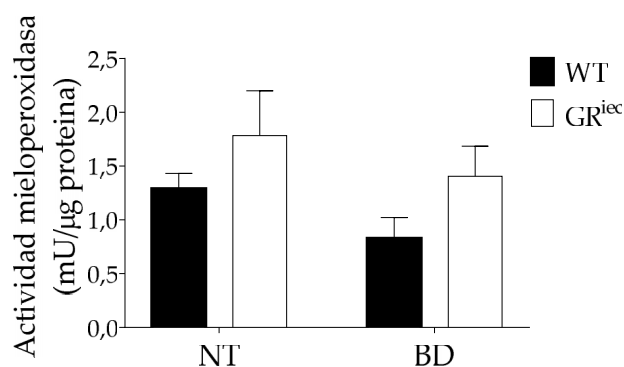
### 3.3 Estudio de parámetros de inflamación en la respuesta temprana a la inducción de colitis por DSS.

Se analizaron varios parámetros inflamatorios, al igual que en los ratones sin inflamación de la sección anterior. La actividad fosfatasa alcalina se vio sustancialmente aumentada en ambos grupos GR con respecto a los WT, independiente del tratamiento con BD. Del mismo modo, la sensibilidad a levamisol in vitro aumentó en los grupos deficientes de GR (figura 47).



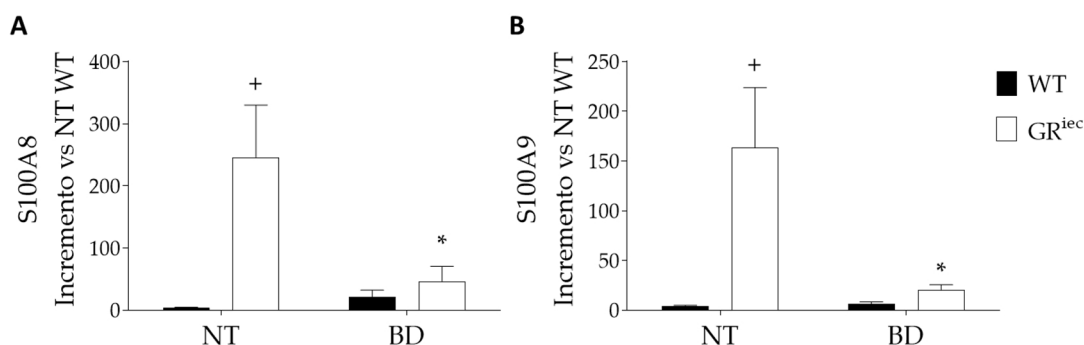
**Figura 47. Determinación de actividad fosfatasa alcalina en tejido colónico en la fase temprana de la colitis por DSS.** (A) AP (mU/mg proteína); (B) Sensibilidad de AP a distintas concentraciones de levamisol, expresado como porcentaje de inhibición de la actividad AP tras 1 día de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6 µg/ratón/día. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media ± error estándar. + P<0,05 vs. WT.

A diferencia de la fosfatasa alcalina, la actividad mieloperoxidasa no mostró grandes diferencias, aunque los valores fueron generalmente más elevados en los grupos GR (figura 48). Los valores de MPO de ambos grupos fueron similares al de ratones no tratados con DSS como los observados en la figura 12.



**Figura 48. Determinación de actividad mieloperoxidasa en tejido colónico en la fase temprana de la colitis por DSS.** (A) MPO (mU/mg tejido) en tejido colónico completo tras 1 día de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6 μg/ratón/día. Los datos se expresan como media ± error estándar.

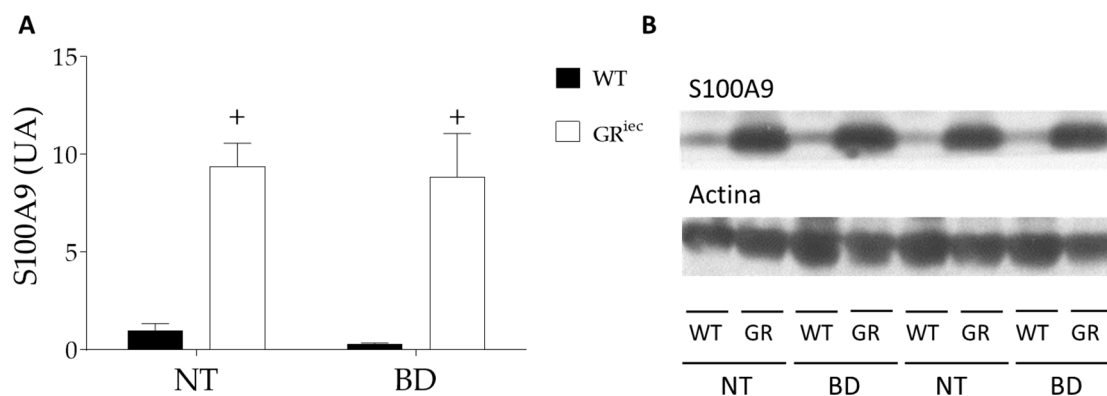
A continuación se realizó la determinación de la expresión de S100A8 y S100A9 por qRT-PCR, así como de este último por *western blot*. En ambos casos se detectó un aumento de los niveles de ARNm en los grupos GR, que fue considerable en los animales no tratados y mínimo (aunque significativo) en los tratados con budesonida (figura 49).



**Figura 49. Estudio de la expresión génica de S100A8 y S100A9 en la fase temprana de la colitis por DSS.** Expresión génica por qRT-PCR en tejido colónico completo de (A) S100A8 y (B) S100A9 tras 1 día de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6 μg/ratón/día. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media ± error estándar. + P<0,05 vs. WT; \* P<0,05 vs. NT.

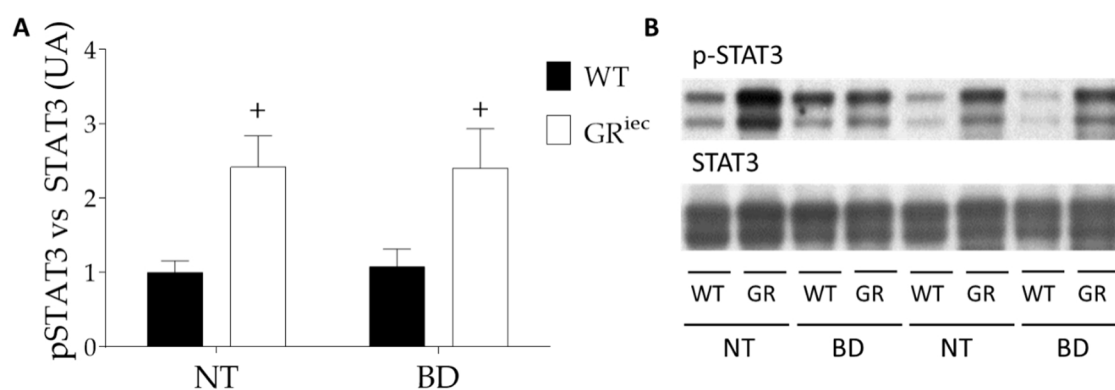
Como cabría esperar, el incremento de los niveles de ARNm de S100A9 se vio acompañado de un aumento de casi 10 veces en la cantidad de proteína (Figura 51). Un aspecto a destacar es que los niveles fueron similares en ratones GR no tratados y tratados con budesonida, a diferencia de lo que ocurre con los niveles de ARNm (comparar con Figura 50).





**Figura 50. Expresión proteica de S100A9 en la fase temprana de la colitis por DSS.** (A) La expresión de la proteína S100A9 se evaluó mediante *Western blot* de extractos proteicos totales y el uso de anticuerpo específico. Los niveles de actina se usaron como control de carga. (B) Membrana representativa de los resultados obtenidos tras 1 día de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6 µg/ratón/día. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media ± error estándar. + P<0,05 vs. WT.

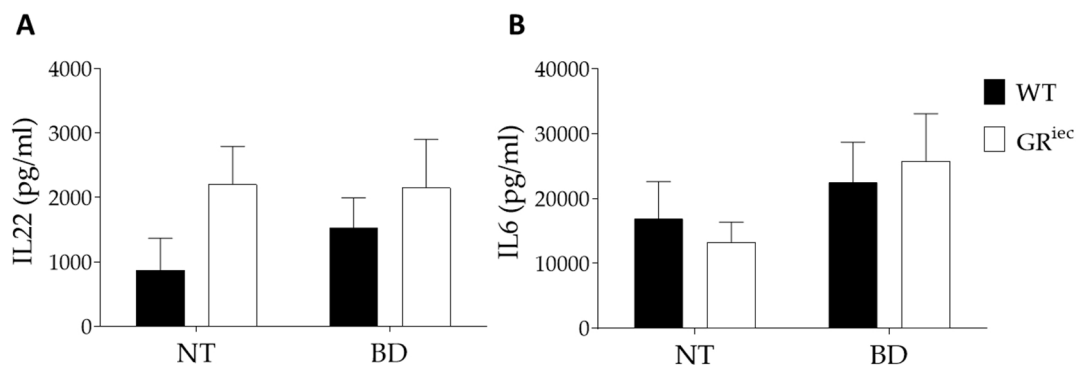
Estos resultados indican una cierta inflamación/infiltración leucocitaria, ya que aunque como ya se comentó en el punto 2.2.3 la expresión proteica de S100A9 puede venir únicamente de las IECs, no es el caso de S100A8. En consecuencia, se estudió la fosforilación de STAT3. De modo similar a la expresión de S100A9, y como se observó en la figura 15, la fosforilación de STAT3 aumentó en los grupos GR con respecto al grupo WT, sin verse modificada por la budesonida (figura 51).



**Figura 51. Expresión proteica de STAT3 en la fase temprana de la colitis por DSS.** (A) La expresión de la proteína p-STAT3 se evaluó mediante *Western blot* de extractos proteicos totales. Los niveles de STAT3 se usaron como control de carga. (B) Membrana representativa de los resultados obtenidos tras 1 día de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6 µg/ratón/día. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media ± error estándar. + P<0,05 vs. WT.

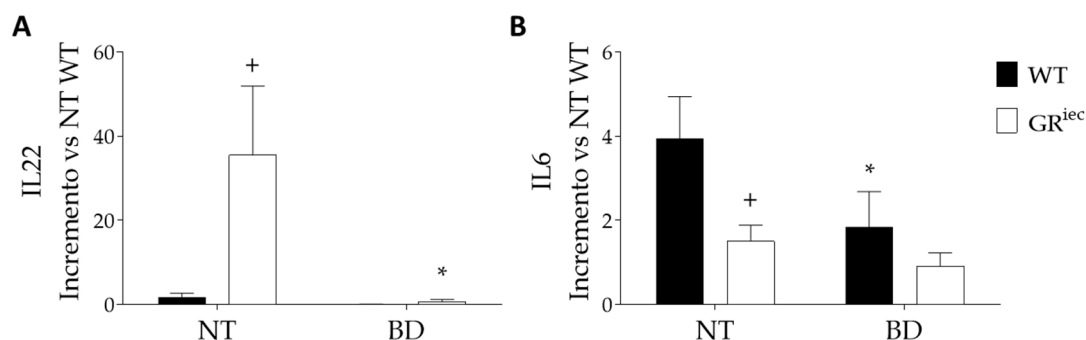
En los ratones no colíticos el aumento de pSTAT3 podía deberse al efecto sinérgico de IL6 e IL22 sobre las IECs. Para comprobar si podía existir este tipo de modulación se procedió a medir la secreción de citoquinas en explantes colónicos. La IL22 mostró una tendencia a aumentar en los grupos GR, aunque sin alcanzar la

significación estadística (figura 52A). No hubo cambios de expresión aparentes por el contrario en la IL6 (figura 52B).



**Figura 52. Producción de IL22 e IL6 en explantes colónicos en la fase temprana de la colitis por DSS.** Se evaluó la producción mediante multiplex de (A) IL22 e (B) IL6 en explantes de colon cultivados durante 24 horas en medio carente de GC tras 1 día de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6 µg/ratón/día. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media ± error estándar.

El análisis de la expresión génica (ARNm) de ambas citoquinas arrojó resultados muy diferentes, con un aumento espectacular de los niveles de IL22 en ratones GR no tratados con budesonida respecto a su control WT (figura 53A).



**Figura 53. Estudio de la expresión génica de IL22 e IL6 en la fase temprana de la colitis por DSS.** Expresión génica por qRT-PCR en tejido colónico completo de (A) IL22 e (B) IL6 tras 1 día de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6 µg/ratón/día. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media ± error estándar. + P<0,05 vs. WT; \* P<0,05 vs. NT.

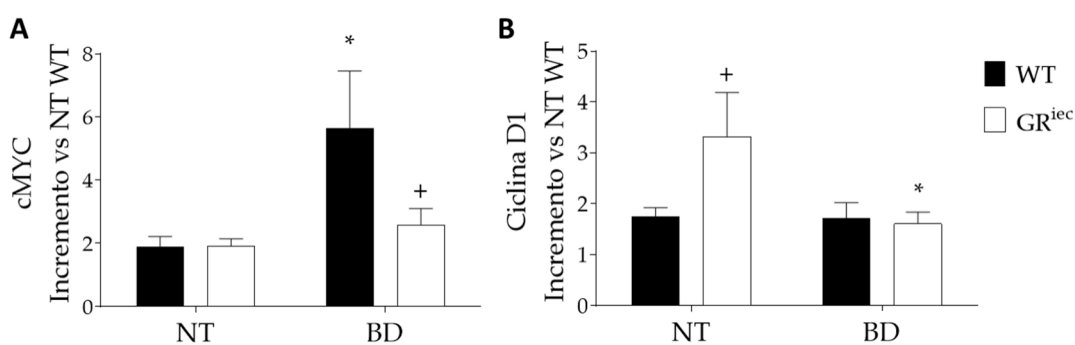
Este efecto desapareció completamente en animales tratados con el corticoide. En el caso de la IL6 se observó una disminución del 50-65% de los niveles de ARNm en animales GR tanto tratados como no tratados con respecto a su control WT respectivo (significativo solo para los no tratados); paradójicamente, el tratamiento con budesonida tuvo un efecto similar, es decir, los niveles de ARNm de IL6 disminuyeron aproximadamente a la mitad respecto al control no tratado, tanto en ratones WT como GR. Así, en ratones GR tratados con budesonida el nivel de

ARNm de IL6 fue aproximadamente el 25% del correspondiente a ratones WT no tratados con el corticoide (figura 53B).

### 3.4 Estudio de parámetros relacionados con la proliferación epitelial en la respuesta temprana a la inducción de colitis por DSS.

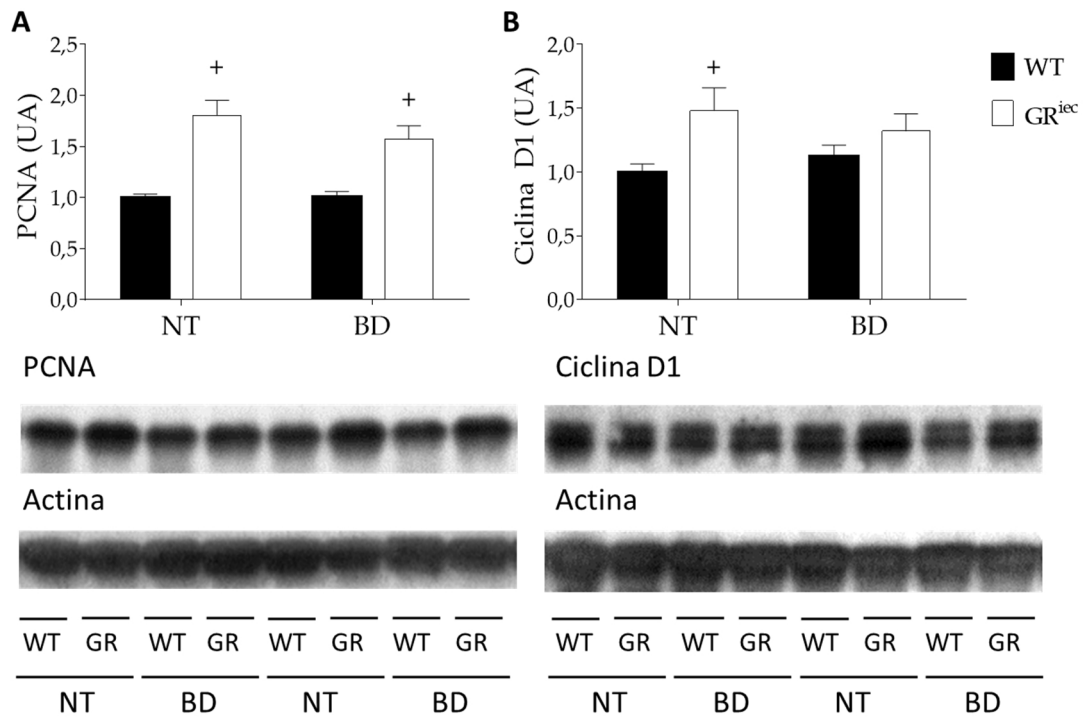
En el modelo de colitis inducida por DSS es muy importante la señalización en el epitelio intestinal para una correcta proliferación, y son muchos los modelos descritos que indican que los fallos en esta señalización conducen a fenotipos más susceptibles a la colitis.

Se analizó por qRT-PCR la expresión génica en colon de cMYC y ciclina D1 (figura 54A y B). En el caso de cMYC solo se observaron diferencias entre el grupo WT y GR tratados con BD, pero no en condiciones normales. Sin embargo la expresión de ciclina D1 se vio aumentada en los ratones GR con respecto a los controles WT, efecto que fue revertido curiosamente por la budesonida.



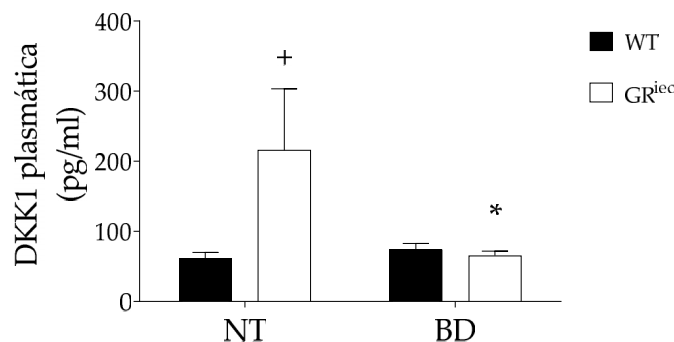
**Figura 54. Estudio de la expresión génica de cMYC y Ciclina D1 en la fase temprana de la colitis por DSS.** Expresión génica por qRT-PCR en tejido colónico completo de (A) cMYC y (B) ciclina D1 tras 1 día de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6 µg/ratón/día. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media ± error estándar. + P<0,05 vs. WT; \* P<0,05 vs. NT.

Además, se analizó por *western blot* la expresión proteica de PCNA y de la ya mencionada ciclina D1 (figura 55A y B). En este caso sí pudimos observar un aumento claro, tanto de PCNA como de ciclina D1, en los grupos GR frente a los grupos WT, que no llegó a ser significativa en el caso de la ciclina D1 en animales tratados con corticoide.



**Figura 55. Estudio de la expresión proteica de PCNA y ciclina D1 en la fase temprana de la colitis por DSS.** Expresión proteica medida por *western blot* en tejido colónico completo de (A) PCNA y (B) ciclina D1 tras 1 día de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6 µg/ratón/día. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media ± error estándar. + P<0,05 vs. WT.

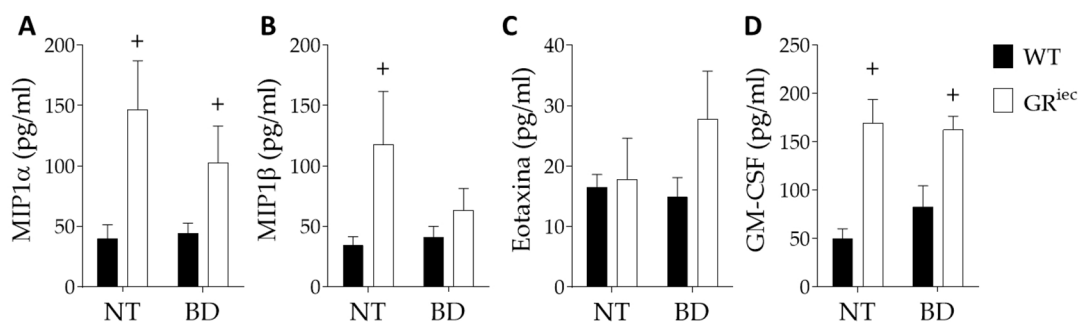
Por último, se midió DKK1 en plasma (figura 56). En consonancia con el aumento de algunas citoquinas en el grupo GR, como se verá en el siguiente apartado, DKK1 aumentó en el grupo GR NT frente al WT.



**Figura 56. Estudio de DKK1 plasmática en la fase temprana de la colitis por DSS.** Medida de DKK1 en plasma tras 1 día de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6 µg/ratón/día. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media ± error estándar. + P<0,05 vs. WT NT; \* P<0,05 vs. NT.

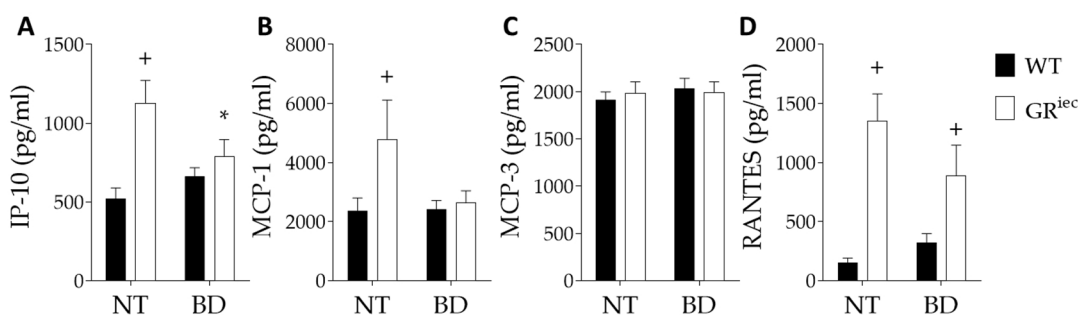
### 3.5 Estudio de la producción de citoquinas en colon en la respuesta temprana a la inducción de colitis por DSS.

Se observó un aumento de MIP1 $\alpha$  y MIP1 $\beta$  en los grupos GR frente a los WT que fue significativo excepto en el caso de MIP1 $\beta$  en ratones expuestos al corticoide (figura 57A y B). Los niveles de GM-CSF siguieron el mismo patrón (figura 57D). No se observaron cambios en la eotaxina (figura 57C).



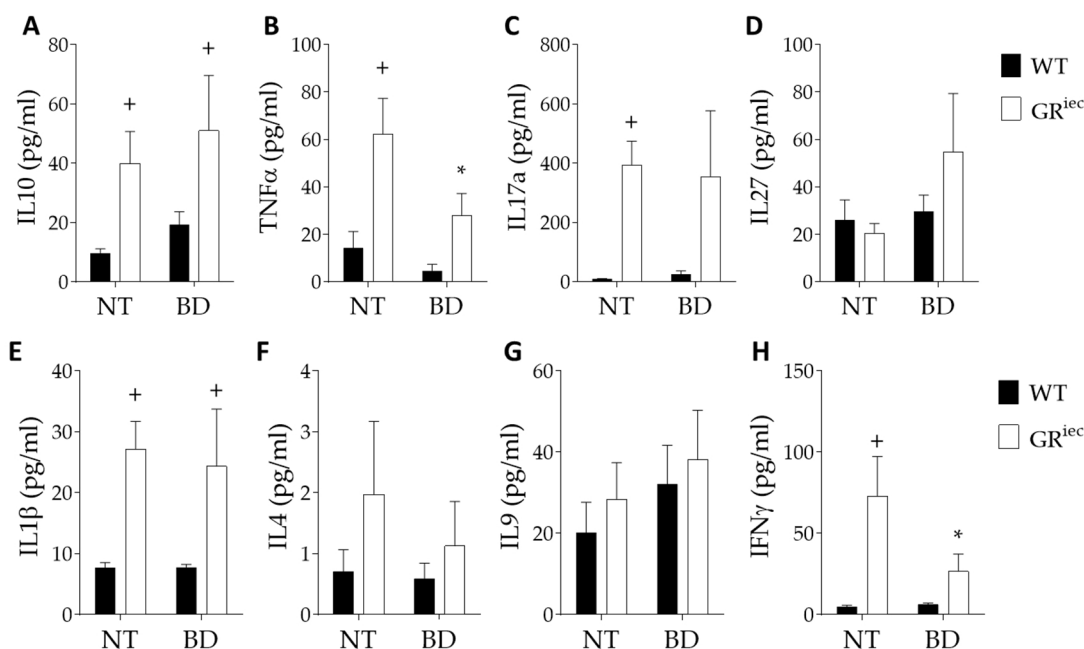
**Figura 57. Producción de MIP1 $\alpha$ , MIP1 $\beta$ , Eotaxina y GM-CSF en explantes colónicos en la fase temprana de la colitis por DSS.** Se evaluó la producción mediante multiplex de (A) MIP1 $\alpha$ , (B) MIP1 $\beta$ , (C) Eotaxina y (D) GM-CSF en explantes de colon cultivados durante 24 horas en medio carente de GC tras 1 día de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6  $\mu$ g/ratón/día. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar. + P<0,05 vs. WT NT.

Tanto IP-10 como MCP-1 aumentaron en el grupo GR NT con respecto al WT, mientras que no se observó una diferencia sustancial en los tratados con BD (figura 58A y B). RANTES presentó un perfil nuevamente comparable, aunque con un impacto mucho menor de la budesonida (figura 58D). No hubo cambio alguno en los niveles de MCP-3 (figura 58C).



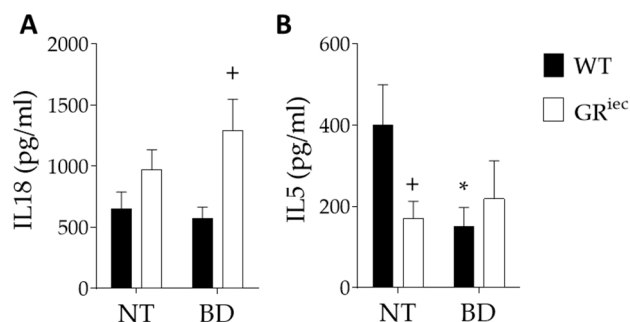
**Figura 58. Producción de IP-10, MCP-1, MCP-3 y RANTES en explantes colónicos en la fase temprana de la colitis por DSS.** Se evaluó la producción mediante multiplex de (A) IP-10, (B) MCP-1, (C) MCP-3 y (D) RANTES en explantes de colon cultivados durante 24 horas en medio carente de GC tras 1 día de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6  $\mu$ g/ratón/día. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar. + P<0,05 vs. WT; \* P<0,05 vs. NT.

Los ratones GR presentaron niveles aumentados de IL10, TNF $\alpha$ , IL17A, IL1 $\beta$  e IFN $\gamma$ , significativamente casi en todos los casos (figura 59A, B, C, E y H). La budesonida no tuvo ningún efecto aparente, excepto una inhibición del 50% de la producción de TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ . No se observó ningún cambio significativo en el caso de la IL27, IL4 e IL9 (figura 59D, F y G).



**Figura 59. Producción de IL10, TNF $\alpha$ , IL17a, IL27, IL1 $\beta$ , IL4, IL9 e IFN $\gamma$  en explantes colónicos en la fase temprana de la colitis por DSS.** Se evaluó la producción mediante multiplex de (A) IL10, (B) TNF $\alpha$ , (C) IL17a, (D) IL27, (E) IL1 $\beta$ , (F) IL4, (G) IL9 e (H) IFN $\gamma$  en explantes de colon cultivados durante 24 horas en medio carente de GC tras 1 día de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6  $\mu$ g/ratón/día. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar. + P<0,05 vs. WT; \* P<0,05 vs. NT.

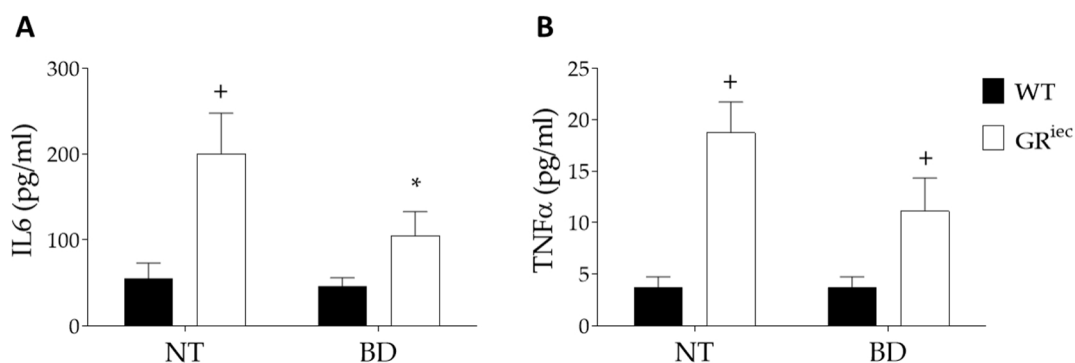
Por último, en este apartado mencionaremos el efecto observado en la IL18 e IL5 (figura 60A y B). Como otras citoquinas, la IL18 aumentó en los grupos GR frente a los WT, pero en este caso el efecto se acentuó por el tratamiento con budesonida, de forma que fue significativo solo en los grupos BD (figura 60A). En el caso de la IL5 lo que se observó fue una disminución marcada tanto por tratamiento con corticoide como por delección del GR en las células epiteliales (figura 60B).



**Figura 60. Producción de IL18 e IL5 en explantes colónicos en la fase temprana de la colitis por DSS.** Se evaluó la producción mediante multiplex de (A) IL5 e (B) IL8 en explantes de colon cultivados durante 24 horas en medio carente de GC tras 1 día de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6  $\mu$ g/ratón/día. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar. + P<0,05 vs. WT; \* P<0,05 vs. NT.

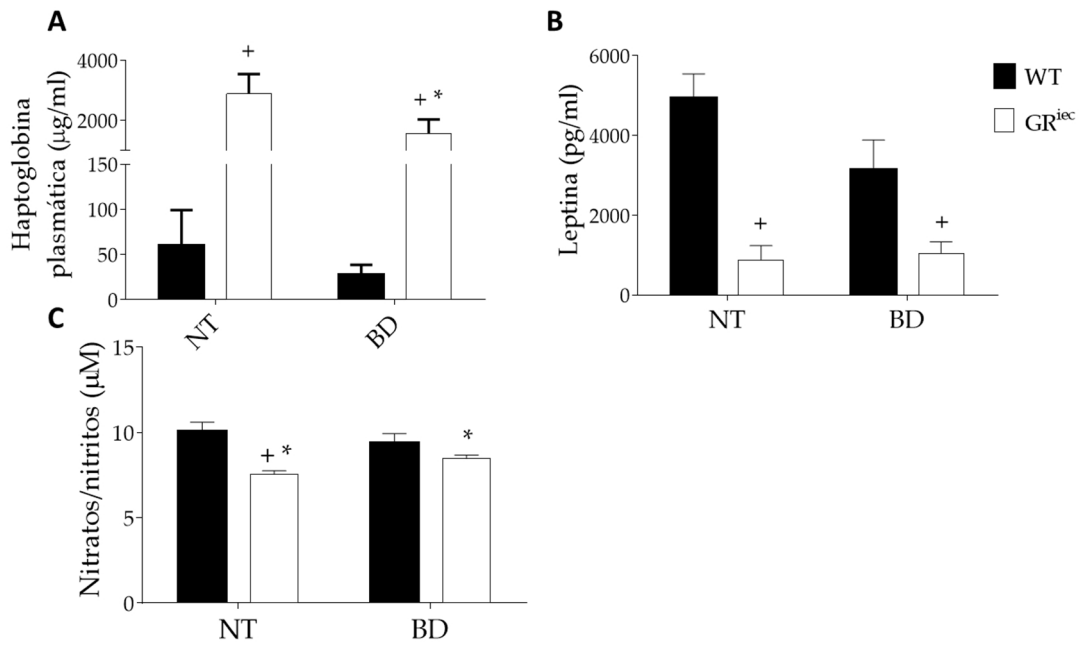
### 3.6 Estudio de parámetros plasmáticos en la respuesta temprana a la inducción de colitis por DSS.

Además de los parámetros hematológicos, que se comentarán en el apartado 3.8, quisimos medir la respuesta sistémica de citoquinas presentes en plasma. De forma similar al efecto observado en los ratones “día 7” en el apartado 2.2.9, tanto la IL6 como el TNF $\alpha$  aumentaron en los grupos GR frente a sus controles WT (figura 61A y B). Este efecto se vio moderado por la BD (no significativo en el caso del TNF $\alpha$ ).



**Figura 61. Medida de parámetros inflamatorios plasmáticos en la fase temprana de la colitis por DSS (I).** Medida de (A) IL6 y (B) TNF $\alpha$  en plasma mediante multiplex tras 1 día de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6  $\mu$ g/ratón/día. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar. + P<0,05 vs. WT; \* P<0,05 vs. NT.

En concordancia con los datos de IL6 y TNF $\alpha$ , se observó un aumento de más de 10 veces en la haptoglobina plasmática en los ratones GR, dato que apunta de nuevo al estado inflamatorio inicial de estos animales. Este efecto fue reducido por la budesonida. Por su parte, se produjo una disminución notable de la leptina plasmática, característica asimismo de episodios inflamatorios (figura 62).

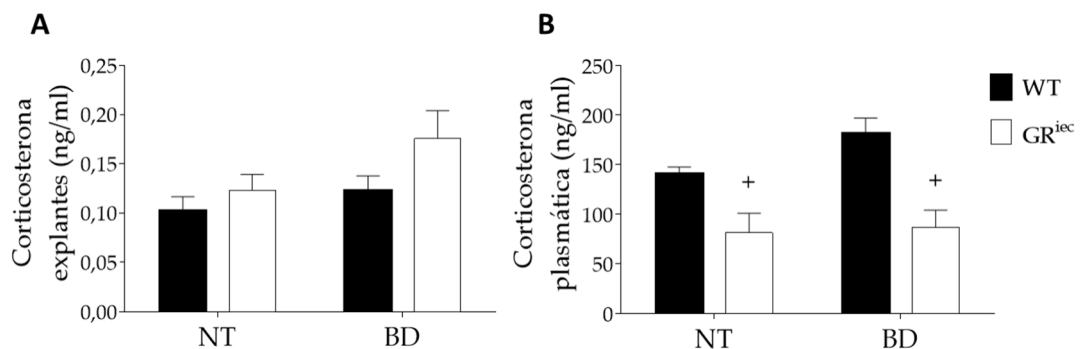


**Figura 62. Medida de parámetros inflamatorios plasmáticos en la fase temprana de la colitis por DSS (II).** Medida de (A) haptoglobina, (B) leptina y (C) nitratos en plasma tras 1 día de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6 µg/ratón/día. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media ± error estándar. + P<0,05 vs. WT; \* P<0,05 vs. NT.

### 3.7 Estudio de parámetros relacionados con los GCs endógenos en la respuesta temprana a la inducción de colitis por DSS.

Como ya se estudió en el apartado 2.2.10, es de gran importancia conocer si existe una respuesta alterada en los GCs endógenos, así como algunas de las enzimas de su síntesis o conversión.

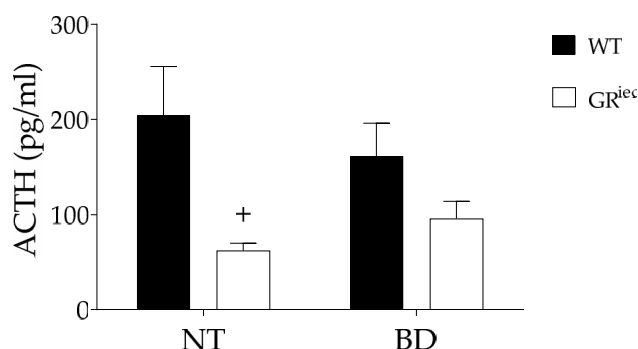
En primer lugar, la corticosterona producida por los explantes colónicos no sufrió cambios significativos, aunque sí que se aprecia una ligera tendencia a su aumento en los grupos GR, sobre todo en los ratones tratados con BD (figura 63A). Sorprendentemente, se observaron diferencias en la corticosterona plasmática, disminuyendo en ambos grupos GR con respecto a los grupos WT (figura 63B).





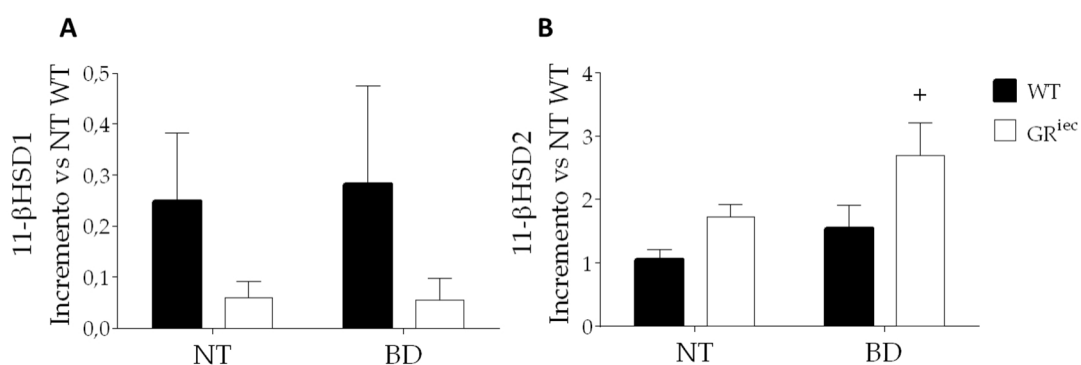
**Figura 63. Medida de corticosterona en la fase temprana de la colitis por DSS.** Corticosterona en (A) explantes o (B) plasma tras 1 día de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6 µg/ratón/día. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media ± error estándar. + P<0,05 vs. WT.

Esta disminución de la corticosterona plasmática se vio acompañada de una disminución paralela de la ACTH circulante (figura 64). Esta bajada no fue significativa en el grupo GR BD debido a que el propio grupo WT BD mostraba una ligera disminución frente a su grupo NT.



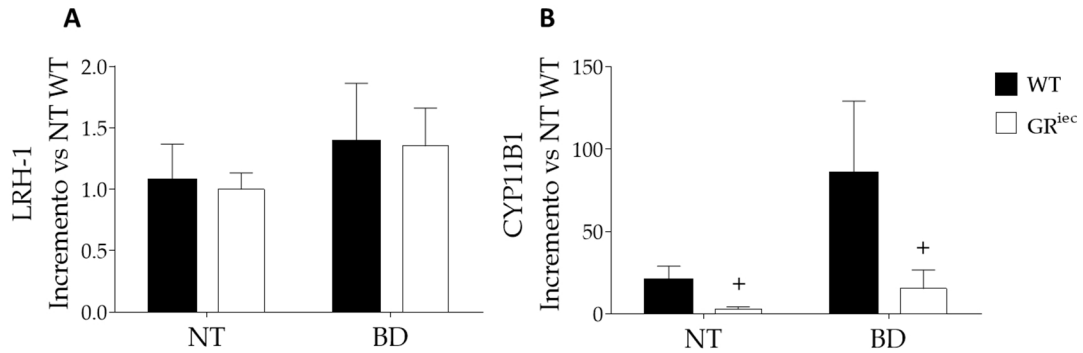
**Figura 64. Medida de ACTH en la fase temprana de la colitis por DSS.** ACTH en plasma tras 1 día de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6 µg/ratón/día. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media ± error estándar. + P<0,05 vs. WT.

No se observaron diferencias significativas en la expresión de la enzima 11β-HSD1, aunque los niveles fueron generalmente más altos en los ratones WT (figura 65A), resultado que no concuerda con la tendencia de la corticosterona en explantes. La expresión de 11β-HSD2 por el contrario se vio aumentada en los grupos GR (significativo para los ratones tratados con corticoide solo, figura 65B).



**Figura 65. Estudio de la expresión génica de 11β-HSD1 y 11β-HSD2 en la fase temprana de la colitis por DSS.** Expresión génica por qRT-PCR en tejido colónico completo de (A) 11β-HSD1 y (B) 11β-HSD2 tras 1 día de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6 µg/ratón/día. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media ± error estándar. + P<0,05 vs. WT.

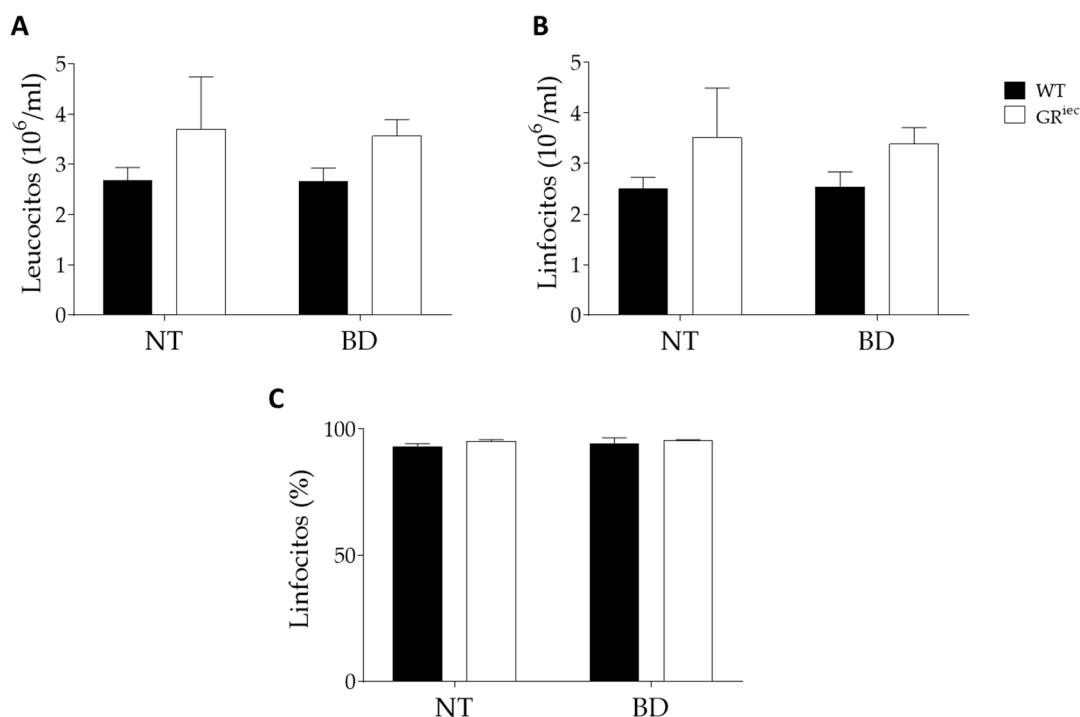
No se consiguió medir la expresión génica de la enzima CYP11A1 en colon completo con ninguna de las parejas de cebadores utilizadas. Sí que se pudo medir sin embargo la CYP11B1, observándose un descenso de los niveles de ARNm en los ratones GR y una tendencia a aumentar con budesonida (figura 66).



**Figura 66. Estudio de la expresión génica de LRH-1 y CYP11B1 en la fase temprana de la colitis por DSS.** Expresión génica por qRT-PCR en tejido colónico completo de (A) LRH-1 y (B) CYP11B1 tras 1 día de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6  $\mu$ g/ratón/día. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar. + P<0,05 vs. WT.

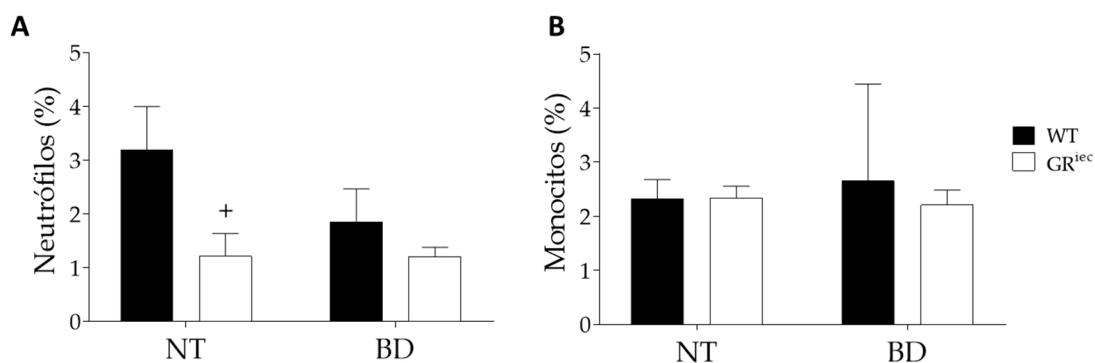
### 3.8 Estudio hematológico en la respuesta temprana a la inducción de colitis por DSS.

El análisis de la sangre mediante hemocitómetro puso de manifiesto una tendencia al alza del número de leucocitos totales y de linfocitos (que representan más del 90% de los leucocitos circulantes en ratones) en los grupos GR. Las diferencias observadas no alcanzan la significación estadística en ningún caso (Figura 67).



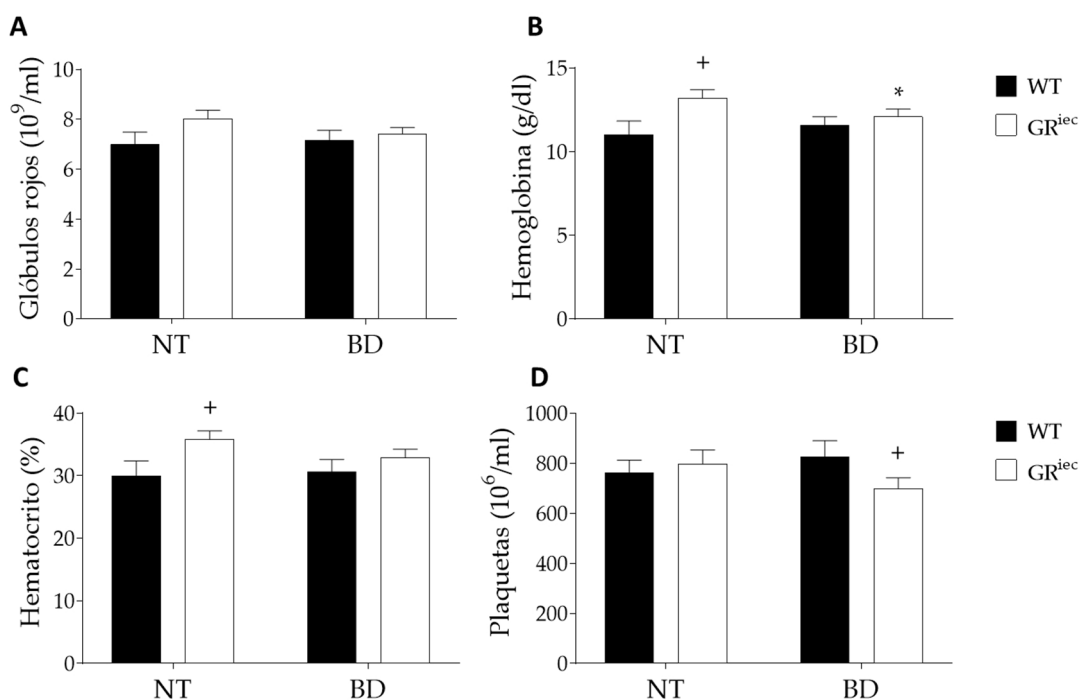
**Figura 67. Leucocitos y linfocitos sanguíneos en la fase temprana de la colitis por DSS.** (A) Número total de leucocitos, (B) linfocitos o (C) su porcentaje en sangre en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6 µg/ratón/día. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media ± error estándar. + P<0,05 vs. WT.

Tampoco se observaron diferencias significativas en el porcentaje de monocitos (figura 68B), pero sí en el de neutrófilos (figura 68A), detectándose una disminución en los ratones GR frente a WT (significativa solo en ausencia de tratamiento con el corticoide).



**Figura 68. Neutrófilos y monocitos sanguíneos en la fase temprana de la colitis por DSS.** (A) Cantidad relativa (%) de neutrófilos y (B) monocitos en sangre tras 1 día de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6 µg/ratón/día. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media ± error estándar. + P<0,05 vs. WT.

Debido al sangrado presente en las heces de los ratones GR tras el primer día de DSS los parámetros de eritrocitos, hemoglobina y el hematocrito resultan de gran interés.



**Figura 69. Parámetros sanguíneos en la fase temprana de la colitis por DSS.** (A) Cantidad de eritrocitos, (B) hemoglobina y (C) plaquetas en sangre y (D) hematocrito tras 1 día de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6  $\mu$ g/ratón/día. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar. + P<0,05 vs. WT. + P<0,05 vs. WT; \* P<0,05 vs. NT.

No hubo diferencias significativas en la cantidad de glóbulos rojos entre ninguno de los grupos mientras que sí en el caso de la hemoglobina y el hematocrito (figura 69A, B y C). La tendencia no obstante fue a aumentar, no a disminuir. Así, la hemoglobina y el hematocrito se incrementaron en ambos grupos GR, siendo significativo únicamente en el no tratado, debido al efecto inhibitor de la budesonida en estos ratones. No se observaron diferencias en el número de plaquetas entre los grupos NT pero sí entre el grupo GR BD y su WT correspondiente, con descenso significativo en los ratones GR tratados con el corticoide (figura 69D).

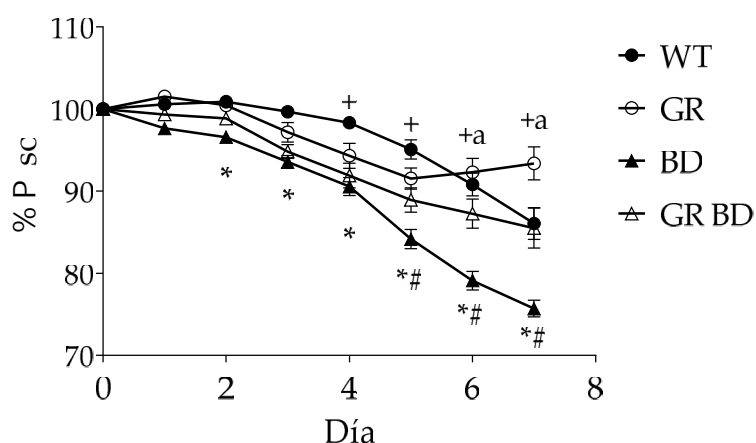
#### 4 Efecto de la colitis por DSS en ratones deficientes en GR en el epitelio intestinal.

En este apartado se presentan los datos correspondientes a la inducción de colitis por DSS en ratones GR y WT, con un seguimiento en este caso de 7 días, según el procedimiento estándar en este modelo. Nuevamente se siguió un diseño 2x2 con la inclusión del tratamiento con budesonida o vehículo.

#### 4.1 Evolución del estado general de ratones carentes de GR en el epitelio intestinal en la colitis inducida por DSS.

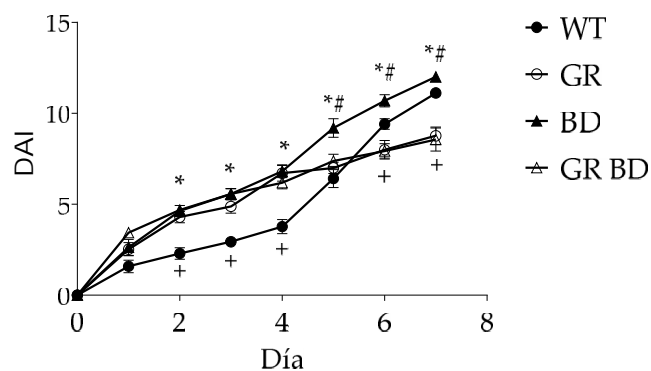
En la evolución de pesos los animales WT mostraron la evolución normal de una colitis por DSS, disminuyendo el peso ligeramente en los primeros días y posteriormente de forma más pronunciada, a partir del cuarto o quinto día, generalmente con acompañamiento de sangrado y diarrea (figura 70). Los ratones GR presentaron una evolución similar, siguiendo en algunos casos en los primeros 1-2 días una pérdida de peso algo mayor que los WT, que como hemos visto se asocia al sangrado y estado inflamatorio descrito a lo largo de la sección 3. Esta tendencia se invirtió sorprendentemente los dos últimos días, en los que los animales comenzaron a recuperar peso y a mostrar un aspecto general mejor, frente a una pérdida continuada y deterioro visible en el grupo WT.

En cuanto al efecto de la budesonida, los ratones WT presentaron un perfil de pérdida de peso mayor que los WT, significativo desde el día 2, equiparable a los resultados obtenidos en experimentos anteriores por nuestro grupo. Este efecto fue mucho más marcado que el que se observa inicialmente en ratones GR no tratados con corticoide. Es muy destacable el hecho de que los ratones GR tratados con budesonida presentaran una evolución mucho más favorable; de hecho, en este grupo el corticoide no produjo pérdida de peso adicional alguna, y su único efecto fue en los días 6 y 7, en los que no se produjo la recuperación que sí se daba en el grupo GR no tratado con corticoide.



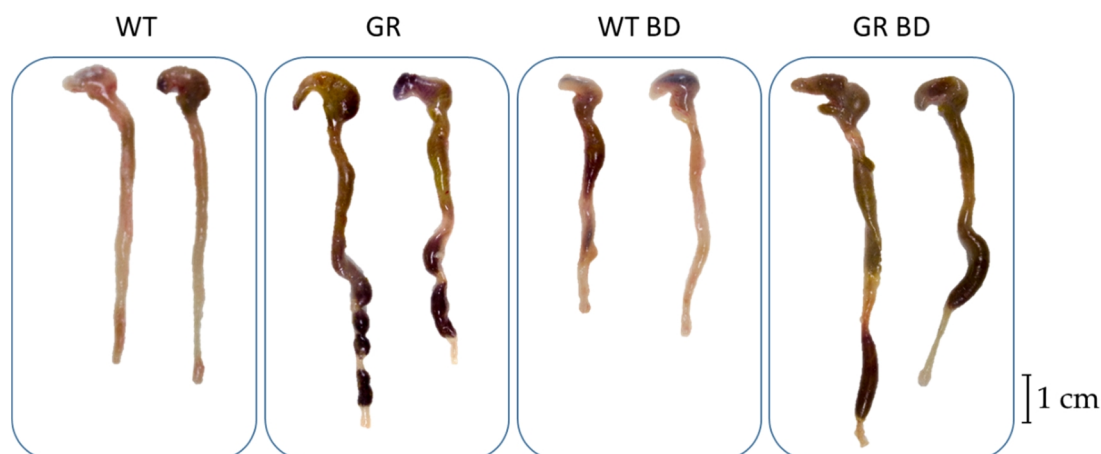
**Figura 70. Evolución de pesos en la colitis inducida por DSS.** Evolución del peso de los animales durante el transcurso de la colitis inducida por DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6 µg/ratón/día. Los resultados son expresados como % de peso, tomando como referencia el día de comienzo del experimento. Datos representativos de 2 experimentos independientes de n=8 cada uno. Los datos se expresan como media ± error estándar. + P<0,05 GR vs. WT; \* P<0,05 BD vs. WT; # P<0,05 BD vs. GR BD; a P<0,05 GR vs. GR BD.

El índice de daño macroscópico (DAI) siguió un patrón muy similar al de los pesos (hay que tener en cuenta que un tercio del DAI depende de los cambios en el peso corporal) (figura 71). Sin embargo, existe una diferencia fundamental, en la medida en que los ratones GR mostraban siempre sangre en heces antes que los ratones WT, provocando un DAI inicial mayor que su grupo control WT. Esta diferencia temporal en la respuesta motivó el experimento documentado en el apartado 2. Cabe destacar que, aunque el sangrado persistía durante los 7 días, este parecía menos intenso en los últimos días del experimento, incluso en los ratones GR tratados con budesonida, pese a que ésta aumentó el DAI en los ratones WT durante los primeros días.



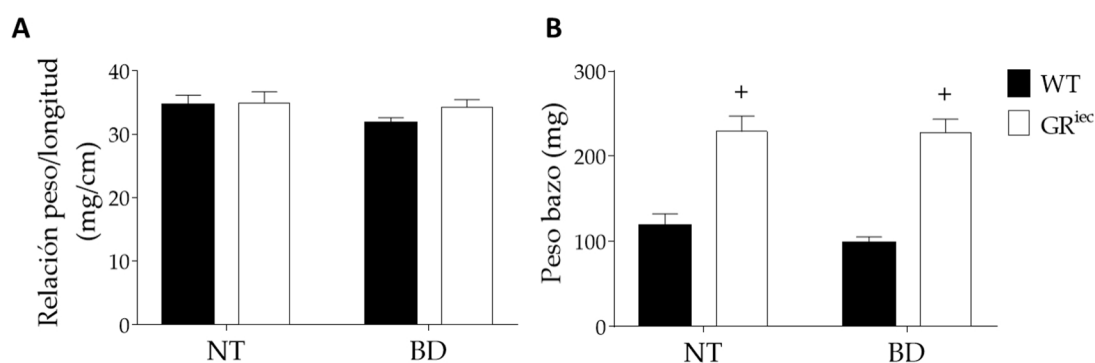
**Figura 71. Índice de daño macroscópico en la colitis inducida por DSS.** Evolución del índice de daño macroscópico de los animales durante el transcurso de la colitis inducida por DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6 µg/ratón/día. Se valoró la pérdida de peso (1-4), sangre en heces (1-4) y consistencia de las heces (1-4). Datos representativos de 2 experimentos independientes de n=8 cada uno. Los datos se expresan como media ± error estándar. + P<0,05 GR vs. WT; \* P<0,05 BD vs. WT; # P<0,05 BD vs. GR BD.

El aspecto externo del colon fue el normal para una colitis con DSS a los 7 días de inducción en el grupo WT. El grupo WT BD presentó características macroscópicas del colon similares, pero algo más acusadas. Por el contrario, se apreció una cierta mejoría en el grupo GR respecto a su control WT. El grupo GR BD presentó un aspecto similar al grupo GR NT pero con claras diferencias con su homólogo WT, presentando una longitud mayor y un menor vaciado del contenido fecal, así como menor presencia de sangre patente en heces (figura 72).



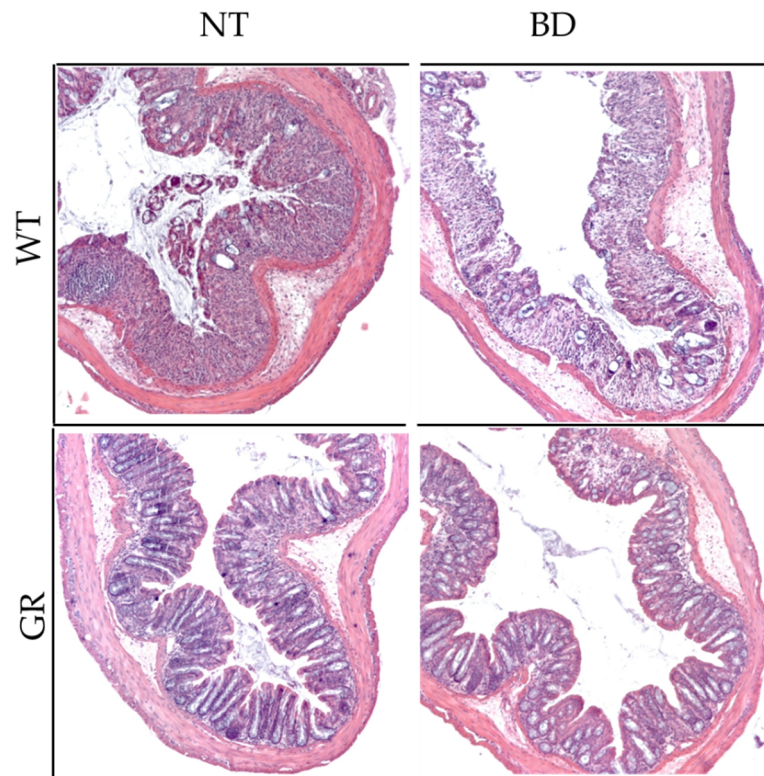
**Figura 72. Aspecto macroscópico del colon en la colitis inducida por DSS.** Fotografías representativas de colon tras 7 días de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6 µg/ratón/día.

No se observaron grandes diferencias en la ratio peso:longitud del colon ni tampoco en la longitud (figura 73A). Sí encontramos diferencias significativas en el peso de bazo entre los grupos GR y los WT, independientemente del tratamiento con BD (figura 73B).



**Figura 73. Relación peso longitud de colon y peso del bazo en la colitis inducida por DSS.** (A) Relación peso (mg) / longitud (cm) de colon y (B) peso del bazo (mg) tras 7 días de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6 µg/ratón/día. Datos representativos de 2 experimentos de n=8. Los datos se expresan como media ± error estándar. + P<0,05 vs. WT.

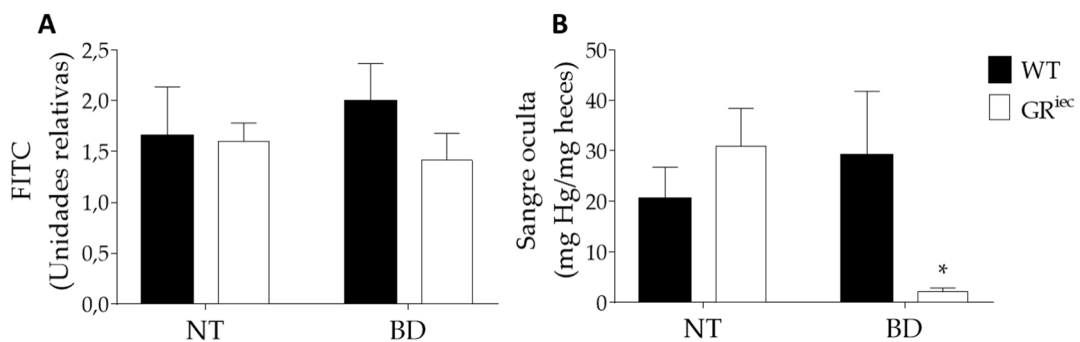
Al observar la tinción con hematoxilina/eosina de la histología colónica se observaron claras diferencias en la estructura de las criptas, mucho más dañadas en los ratones WT que en los GR (Figura 74). Se apreció el efecto protector de la budesonida en los ratones WT, mientras que en los GR el aspecto de los cortes fue muy similar. Como ya habíamos comprobado en el artículo que se encuentra recogido en la tesis el tratamiento con BD no empeoró la evaluación histológica.



**Figura 74. Histología de colon en la colitis inducida por DSS.** Fotografías representativas de hematoxilina eosina de colon de ratones tras 7 días de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6 µg/ratón/día. Fotografías representativas de dos experimentos de n=8.

#### 4.2 Estudio de la funcionalidad epitelial intestinal en ratones carentes de GR en el epitelio intestinal en la colitis inducida por DSS.

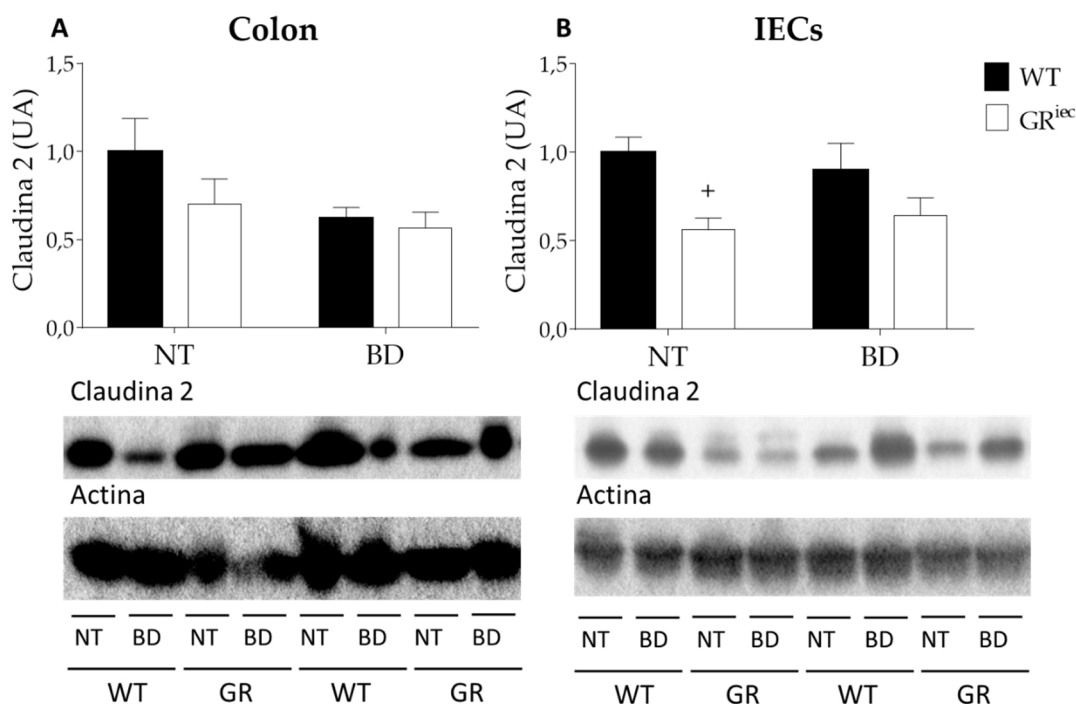
Para el estudio de la funcionalidad epitelial, al igual que en el apartado 2.2, se comenzó analizando el paso de FITC-dextrano 4 kDa oral a sangre y la presencia de sangre en heces.



**Figura 75. Determinación de FITC dextrano en plasma y sangre oculta en heces en la colitis inducida por DSS.** Medida de (A) FITC dextrano en plasma y (B) sangre oculta en heces tras 7 días de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6 µg/ratón/día. Dato representativo de experimento de n=8. Los datos se expresan como media ± error estándar.



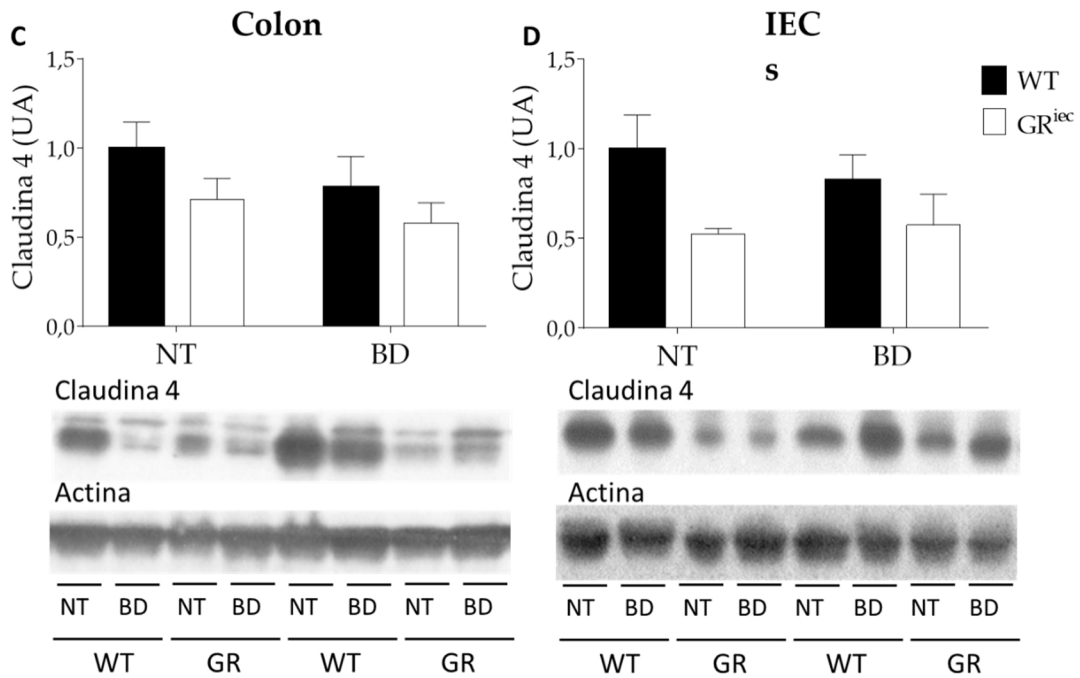
No se observaron diferencias significativas en el primer caso (figura 75A). Por su parte, la sangre oculta en heces fue similar entre los grupos, con la importante excepción de los ratones GR BD, en los que los niveles de sangre disminuyeron drásticamente hasta aproximarse al cero, lo que indica que la budesonida tuvo un efecto protector a este nivel pero únicamente en los animales que no expresaban el GR a nivel epitelial (figura 75B).



**Figura 76. Expresión proteica de claudina 2 en la colitis inducida por DSS.** La expresión de la proteína claudina 2 (A) colon o (B) células epiteliales intestinales se evaluó mediante *western blot* de extractos proteicos totales y el uso de anticuerpo específico. Los niveles de actina se usaron como control de carga. Membrana representativa de los resultados obtenidos bajo la gráfica tras 7 días de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6 µg/ratón/día. Datos representativos de 2 experimentos de n=8. Los datos se expresan como media ± error estándar.

No se observaron cambios significativos en los niveles proteicos de claudina 2 ni de claudina 4 al observar el colon total (figura 77A y C), aunque se aprecia una tendencia a disminuir en los grupos GR respecto a los WT.

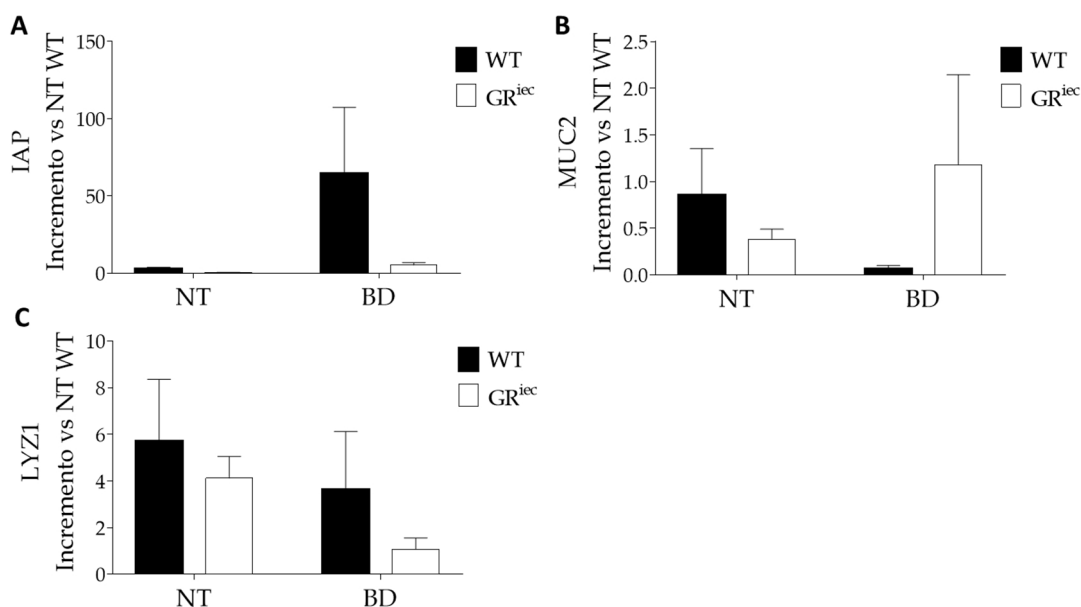
Al analizar del mismo modo las IECs aisladas observamos resultados similares, aunque llegó a alcanzarse en la claudina 2 la significación entre el grupo GR y WT sin BD (figura 77A y C). Así pues, los resultados sugieren una disminución de la expresión de ambas claudinas en los animales GR<sup>AIEC</sup>.



**Figura 77. Expresión proteica de claudina 4 en la colitis inducida por DSS.** La expresión de la proteína claudina 4 en (A) colon o (B) células epiteliales intestinales se evaluó mediante *western blot* de extractos proteicos totales y el uso de anticuerpo específico. Los niveles de actina se usaron como control de carga. Membrana representativa de los resultados obtenidos bajo la gráfica tras 7 días de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6 µg/ratón/día. Datos representativos de 2 experimentos de n=8. Los datos se expresan como media ± error estándar. \* P<0,05 vs. WT.

La expresión génica de los marcadores de los tipos celulares intestinales no alcanzó la significación estadística en ningún caso aunque sí puede extraerse de los datos una mayor presencia de células epiteliales en los ratones WT BD a costa de una menor presencia de células de Paneth (figura 78).

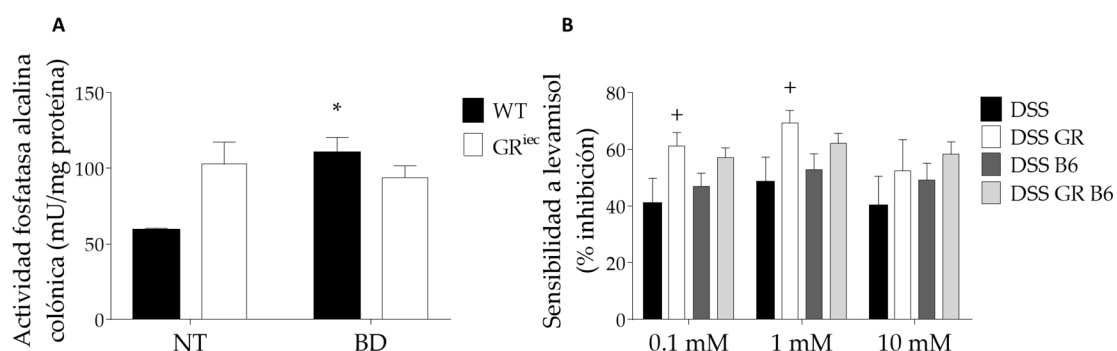
Estas células estaban aumentadas en los ratones GR<sup>ieC</sup> en comparación con los marcadores IAP, LYZ1 y LGR5 que no se muestra en forma de gráfica ya que sólo se vio su expresión en los ratones GR<sup>ieC</sup> NT que, por tanto, poseían una expresión mayor del marcador de IESCs que el resto de grupos. Esto puede indicar que debido al importante daño epitelial que se observa en las fotografías de la histología de los ratones WT la erosión y la pérdida del patrón epitelial sea tan importante que existan muy pocas células IESCs.



**Figura 78. Estudio de la expresión génica de IAP, MUC2 y LYZ1 en la colitis por DSS.** Expresión génica por qRT-PCR en tejido colónico completo de (A) IAP, (B) MUC2 y (C) LYZ1 tras 7 días de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6 µg/ratón/día. Datos representativos de 2 experimentos de n=8. Los datos se expresan como media ± error estándar.

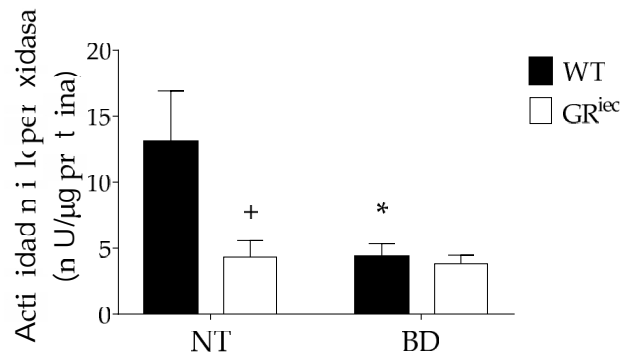
### 4.3 Estudio de los parámetros inflamatorios en la colitis inducida por DSS en ratones carentes de GR en el epitelio intestinal.

Para evaluar el estado inflamatorio de los ratones tras 7 días de inducción de la colitis se evaluó primeramente la actividad fosfatasa alcalina en el tejido colónico.



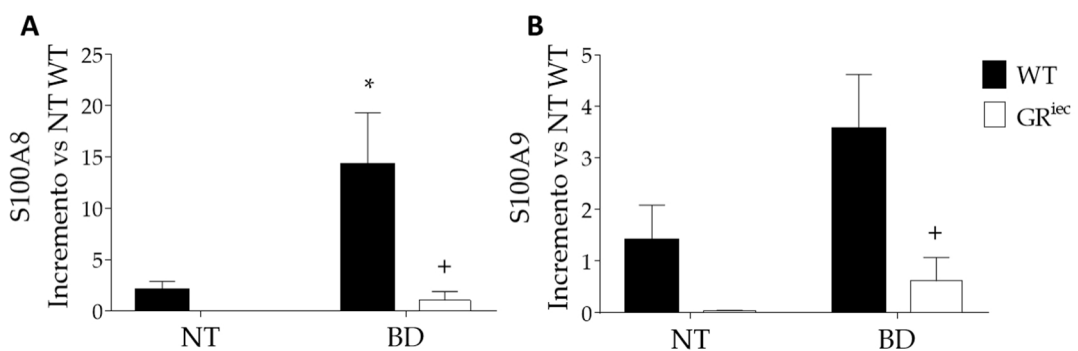
**Figura 79. Determinación de actividad fosfatasa alcalina en tejido colónico en la colitis inducida por DSS.** (A) Actividad fosfatasa alcalina (mU/mg proteína); (B) Sensibilidad de la actividad fosfatasa alcalina a distintas concentraciones de levamisol, expresado como porcentaje de inhibición de la actividad AP tras 1 día de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6 µg/ratón/día. Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media ± error estándar. + P<0,05 vs. WT.

Globalmente, la actividad enzimática fue menor en los ratones WT no tratados que en el resto de grupos. Esta diferencia fue significativa en el caso del grupo WT BD, y marginalmente significativa ( $p=0,06$ ) para el grupo GR NT (figura 79A). A pesar de ello, no se registraron cambios en la isoforma entre los ratones WT tratados o no con budesonida, a juzgar por la sensibilidad a levamisol in vitro (figura 79B). Sí se observaron cambios de sensibilidad a la inhibición en los grupos GR, los cuales fueron significativos solo en ausencia del corticoide.



**Figura 80. Determinación de actividad mieloperoxidasa en tejido colónico en la colitis inducida por DSS.** Actividad mieloperoxidasa (mU/mg tejido) en tejido colónico completo tras 7 días de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6 μg/ratón/día. Datos representativos de 2 experimentos de n=8. Los datos se expresan como media ± error estándar. + P<0,05 vs. WT; \* P<0,05 vs. NT.

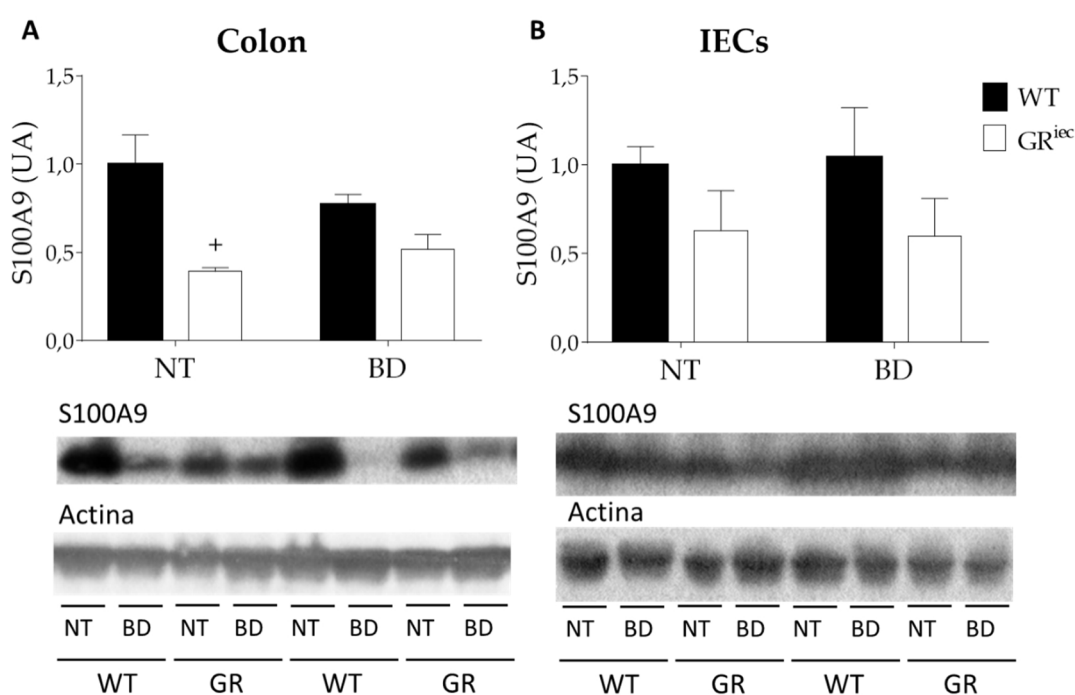
Por el contrario, la actividad mieloperoxidasa fue máxima en el grupo WT NT, y disminuyó en un 75% aproximadamente en el resto de grupos (figura 80). No hubo diferencias entre los grupos tratados con budesonida, lo que sugiere que el receptor epitelial es prescindible para conseguir este efecto antiinflamatorio.



**Figura 81. Estudio de la expresión génica de S100A8 y S100A9 en la colitis inducida por DSS.** Expresión génica por qRT-PCR en tejido colónico completo de (A) S100A8 y (B) S100A9 tras 7 días de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6 μg/ratón/día. Datos representativos de 2 experimentos de n=8. Los datos se expresan como media ± error estándar. + P<0,05 vs. WT; \* P<0,05 vs. NT.

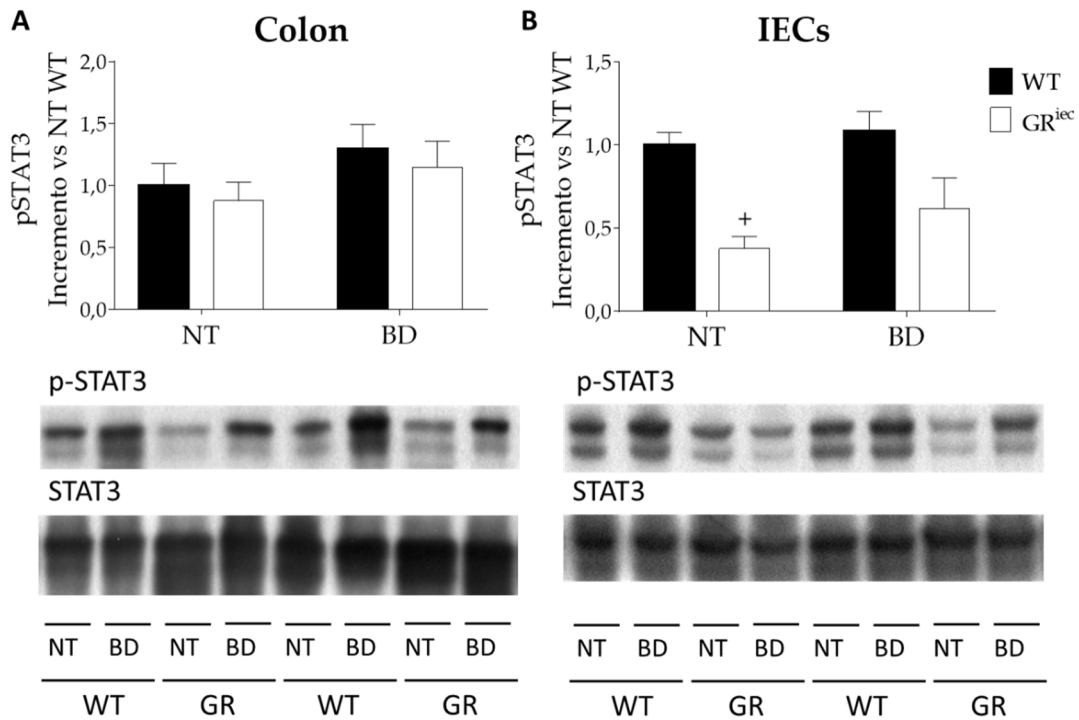
A pesar de lo anterior, la expresión de S100A8 y S100A9 en el tejido colónico presentó un perfil totalmente distinto, en el que los niveles máximos se alcanzaron en el grupo WT BD, y en el que se aprecia una tendencia a la disminución en los grupos GR (figura 81A y B). Estos valores contrastan con los observados en la fase temprana de respuesta a DSS.

A diferencia de los datos de ARNm, la expresión proteica de S100A9 siguió un patrón similar al encontrado en la actividad MPO de colon, aunque sin llegar a detectarse el efecto inhibitor de la budesonida en ratones WT (figura 82A). Se obtuvo esencialmente el mismo perfil en la medida de S100A9 en IECs aisladas de colon (figura 82B).



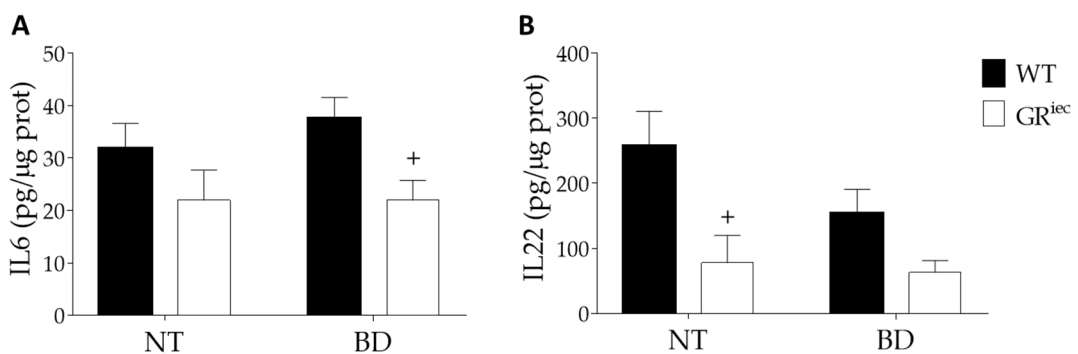
**Figura 82. Expresión proteica de S100A9 en la colitis inducida por DSS.** La expresión de la proteína S100A9 en (A) colon o (B) células epiteliales intestinales se evaluó mediante *western blot* de extractos proteicos totales. Los niveles de actina se usaron como control de carga. Membrana representativa de los resultados obtenidos bajo la gráfica tras 7 días de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6 µg/ratón/día. Datos representativos de 2 experimentos de n=8. Los datos se expresan como media ± error estándar. + P<0,05 vs. WT.

En este experimento no encontramos grandes diferencias en la fosforilación de STAT3 en colon completo (figura 83A); sin embargo, cuando analizamos las células epiteliales por separado encontramos una clara disminución de p-STAT3 en el grupo GR con respecto al WT, que fue significativa en los NT y marginalmente significativa en los grupos tratados con budesonida (p=0,09) (figura 83B).



**Figura 83. Expresión proteica de p-STAT3 en la colitis inducida por DSS.** La expresión de la proteína p-STAT3 en (A) colon o (B) células epiteliales intestinales se evaluó mediante *western blot* de extractos proteicos totales y el uso de anticuerpo específico. Los niveles de actina se usaron como control de carga. Membrana representativa de los resultados obtenidos bajo la gráfica tras 7 días de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6 µg/ratón/día. Datos representativos de 2 experimentos de n=8. Los datos se expresan como media ± error estándar. + P<0,05 vs. WT.

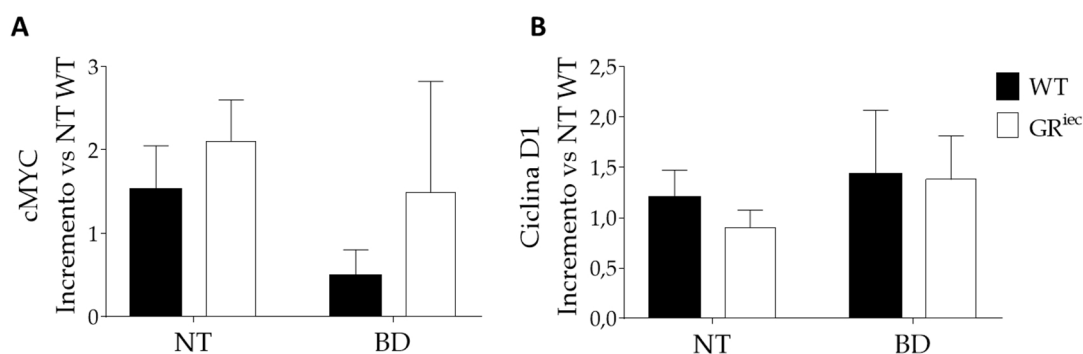
La sospecha de que este efecto observado en las IECs pudiese verse de nuevo debido a la actuación de IL6 e IL22 quedó una vez más confirmada al medirse en explantes colónicos la secreción de ambas citoquinas (figura 84A y B). Se observó una disminución en los dos casos en los grupos GR con respecto a los WT, aunque solo en algunos casos alcanzaron la significación estadística.



**Figura 84. Producción de IL22 e IL6 en explantes colónicos en la colitis inducida por DSS.** Se evaluó la producción mediante multiplex de (A) IL22 e (B) IL6 en explantes de colon cultivados durante 24 horas en medio carente de GC tras 7 días de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6 µg/ratón/día. Datos representativos de 2 experimentos de n=8. Los datos se expresan como media ± error estándar. + P<0,05 vs. WT.

#### 4.4 Estudio de parámetros relacionados con la proliferación intestinal en la colitis inducida por DSS en ratones carentes de GR en el epitelio intestinal.

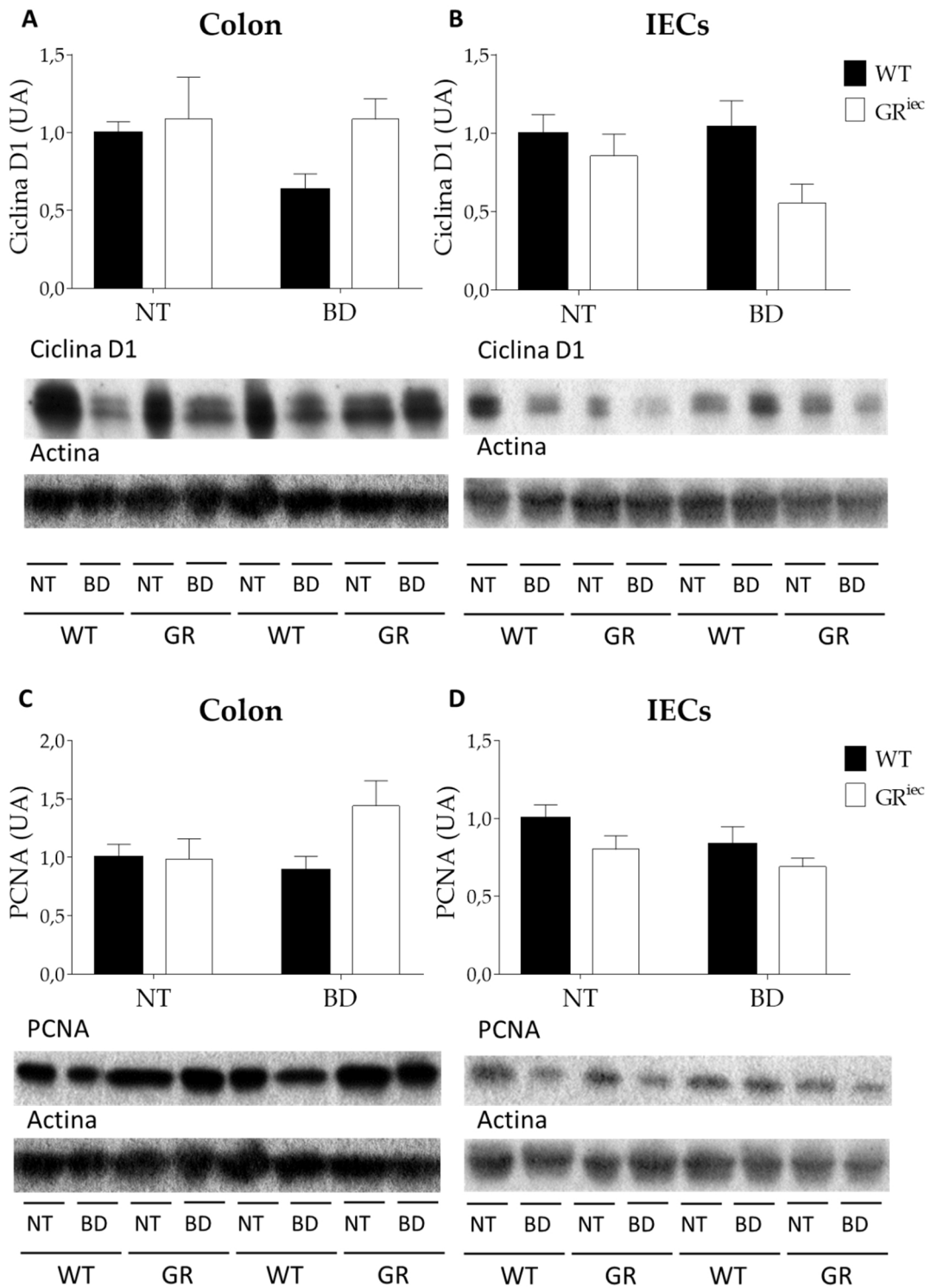
Con objeto de comprobar si la deficiencia en GR produce diferencias en la proliferación intestinal se midió por qRT-PCR cMyc y ciclina D1 (figura 85A y B). No se observaron diferencias significativas en ninguno de los grupos, aunque sí una cierta tendencia a disminuir la expresión de cMYC por efecto de la budesonida.



**Figura 85. Estudio de la expresión génica de cMYC y Ciclina D1 la colitis inducida por DSS.**

Expresión génica por qRT-PCR en tejido colónico completo de (A) cMYC y (B) ciclina D1 tras 7 días de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6 µg/ratón/día. Datos representativos de 2 experimentos n=8. Los datos se expresan como media ± error estándar.

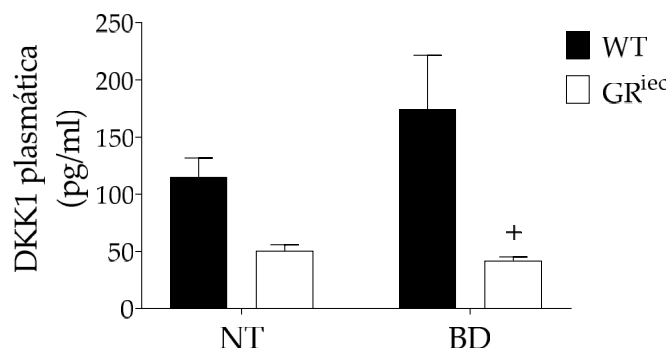
A continuación se midió la expresión proteica de ciclina D1 y de PCNA tanto en colon completo como en las IECs colónicas aisladas (figura 86). Globalmente no se aprecian cambios destacables.



**Figura 86. Estudio de la expresión proteica de PCNA y Ciclina D1 en la colitis inducida por DSS.** Expresión proteica medida por *western blot* en (A-C) tejido colónico completo o (B-D) IECs aisladas de (A-B) ciclina D1 o (C-D) PCNA tras 7 días de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6 µg/ratón/día. Datos representativos de experimento n=8. Los datos se expresan como media ± error estándar.



Los niveles plasmáticos de DKK1 fueron menores generalmente en los ratones GR que en los correspondientes controles WT, alcanzó la significación estadística en los grupos BD (figura 87).

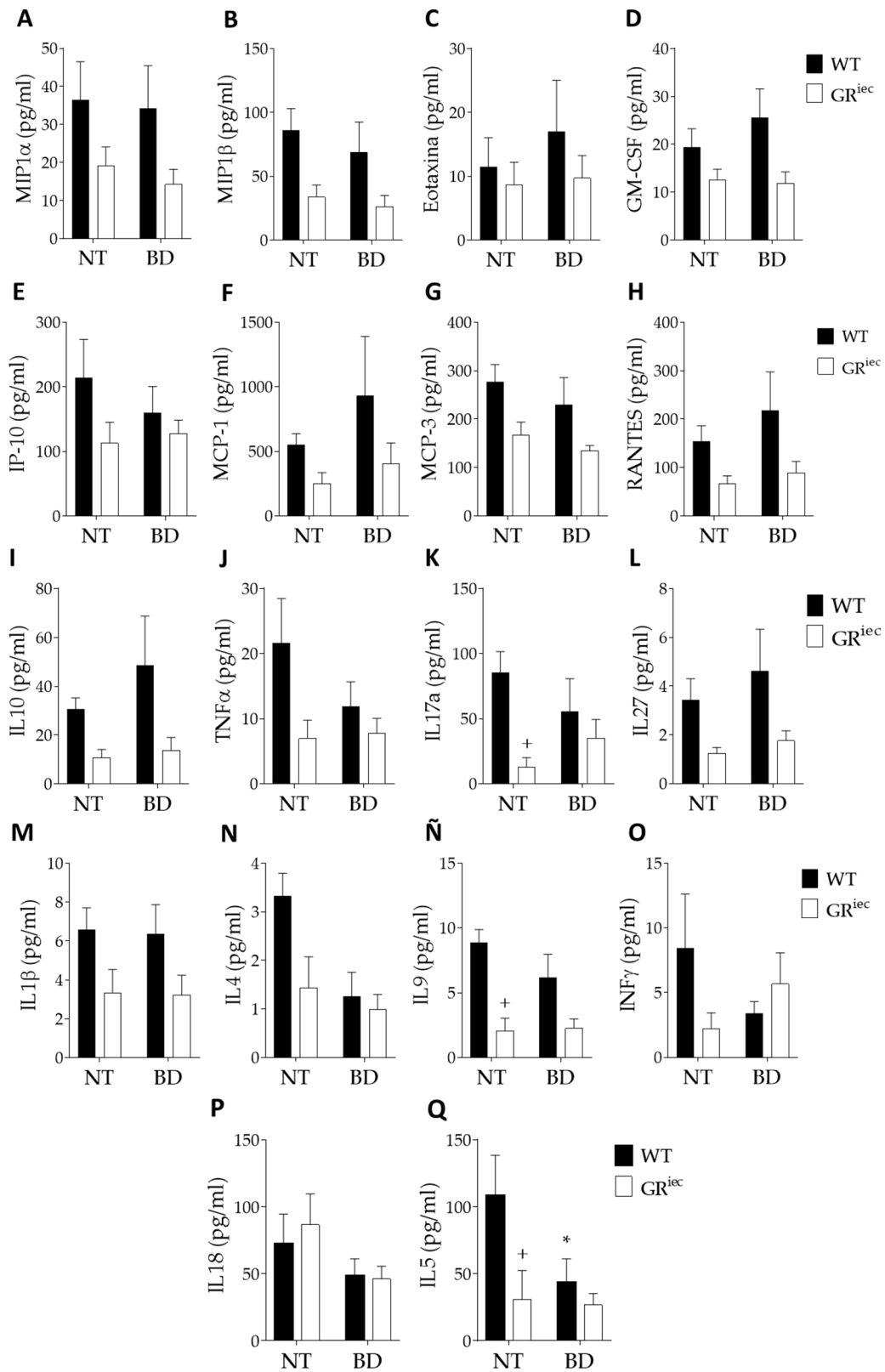


**Figura 87. Estudio de DKK1 plasmática en la colitis inducida por DSS.** Medida de DKK1 en plasma tras 7 días de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6 µg/ratón/día. Datos representativos de 2 experimentos n=8. Los datos se expresan como media ± error estándar. + P<0,05 vs. WT.

#### 4.5 Estudio de la producción de citoquinas en colon en la colitis inducida por DSS en ratones carentes de GR en el epitelio intestinal.

En el análisis mediante multiplex se observó una tendencia generalizada a una disminución de los niveles de citoquinas en los grupos GR con respecto a los controles WT, aunque solo fue significativa en algunos casos, como IL17A, IL9 o IL5 (figura 88K, Ñ y Q).

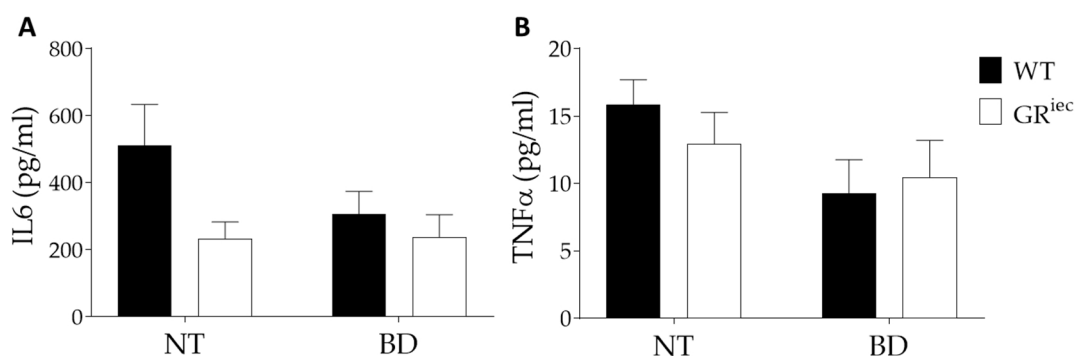
Nuevamente estos datos varían considerablemente con respecto a los obtenidos en la fase temprana de la respuesta a DSS (figura 88). El IFN $\gamma$  y la IL18 fueron excepciones a la tendencia general. En el primer caso se observó una disminución de los niveles en los ratones GR no tratados con budesonida (siempre sin llegar al umbral de significación estadística), pero ambos grupos BD mostraron niveles similares (figura 88O). En el caso de la IL18 los niveles fueron muy similares en los distintos grupos (figura 88P).



**Figura 88. Producción de citoquinas en explantes colónicos en la colitis inducida por DSS.** Se evaluó la producción mediante multiplex de (A) MIP1 $\alpha$ , (B) MIP1 $\beta$ , (C) Eotaxina, (D) GM-CSF, (E) IP-10, (F) MCP-1, (G) MCP-3, (H) RANTES, (I) IL10, (J) TNF $\alpha$ , (K) IL17a, (L) IL27, (M) IL1 $\beta$ , (N) IL4, (Ñ) IL9, (O) IFN $\gamma$ , (P) IL18 e (Q) IL5 en explantes de colon cultivados durante 24 horas en medio carente de GC tras 7 días de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6  $\mu$ g/ratón/día. Datos representativos de experimento n=8. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar.

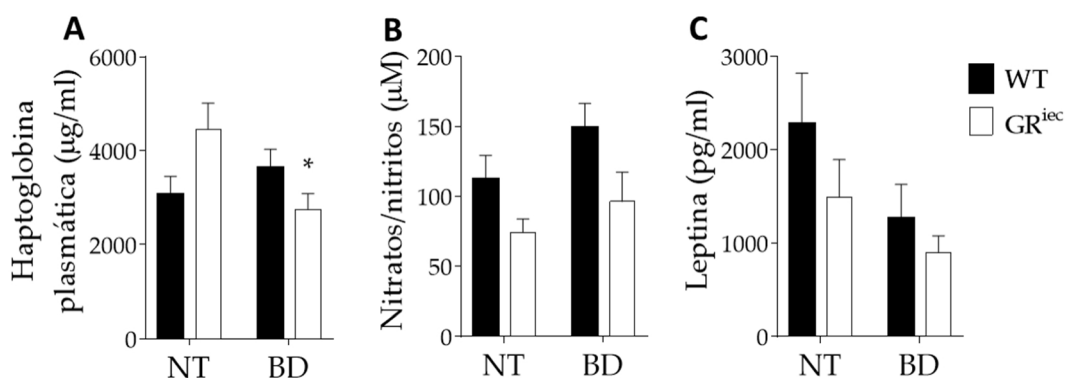
#### 4.6 Estudio de parámetros plasmáticos en la colitis inducida por DSS en ratones carentes de GR en el epitelio intestinal.

No se apreciaron diferencias significativas en los niveles plasmáticos de IL6 y TNF , aunque los valores de IL6 fueron generalmente mayores en el grupo WT (figura 89). Cabe destacar que en la fase temprana de la respuesta a DSS ambas citoquinas estaban aumentadas en el plasma de los ratones GR.



**Figura 89. Medida de parámetros inflamatorios plasmáticos en la colitis inducida por DSS (I).** Medida de (A) IL6 y (B) TNF $\alpha$  en plasma mediante multiplex tras 7 días de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6  $\mu$ g/ratón/día. Datos representativos de experimento n=8. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar.

La determinación de haptoglobina, nitratos o leptina en plasma tampoco llegó a mostrar diferencias significativas, debido probablemente al diseño experimental 2x2 y a la penalización que conlleva desde el punto de vista estadístico. Con todo, los niveles de haptoglobina fueron un ~80% superiores en el grupo GR NT con respecto al grupo WT (figura 90A).



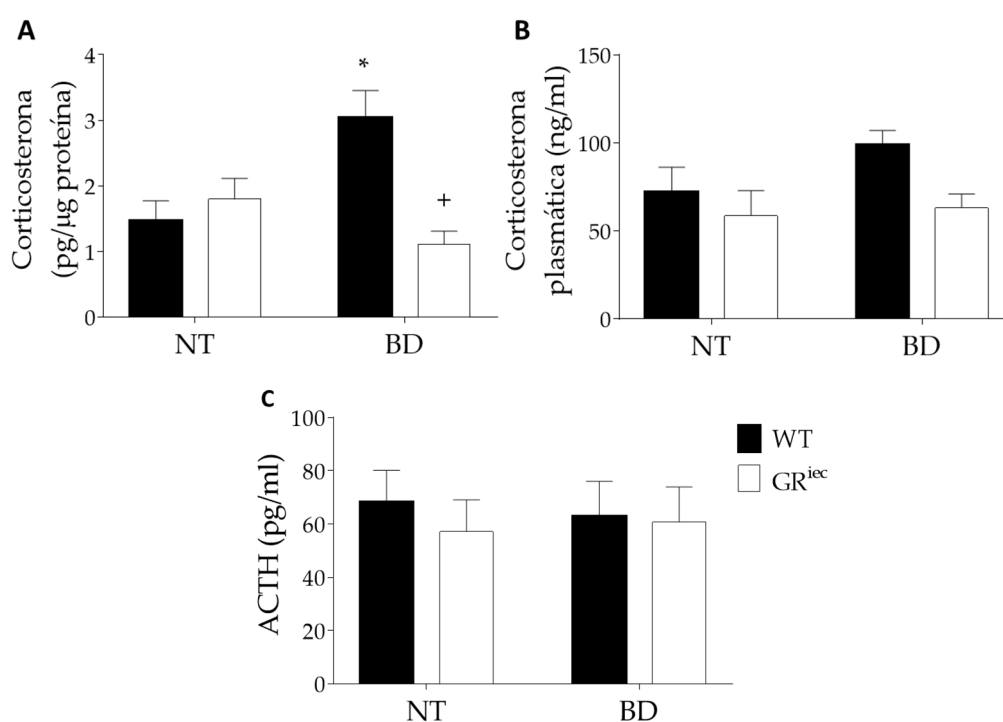
**Figura 90. Medida de parámetros inflamatorios plasmáticos en la colitis inducida por DSS (II).** Medida de (A) haptoglobina, (B) nitratos Y (C) leptina en plasma tras 7 días de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6  $\mu$ g/ratón/día. Datos representativos de experimento n=8. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar.

La tendencia en nitratos/nitritos fue la misma que en la mayoría de citoquinas, es decir, niveles mayores en los grupos WT que en los GR (figura 90B), mientras que

en el caso de la leptina se advierte una tendencia a disminuir tanto con la delección génica del GR como con el tratamiento con budesonida (figura 90C).

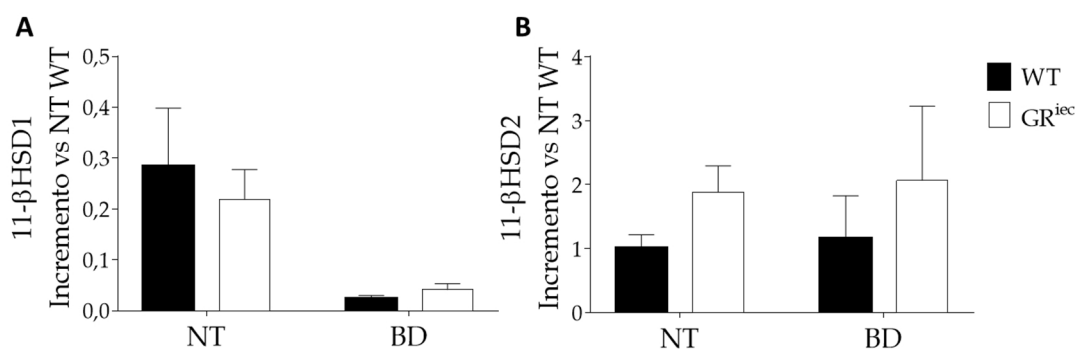
#### 4.7 Estudios de parámetros relacionados con los GCs endógenos en la colitis inducida por DSS en ratones carentes de GR en el epitelio intestinal.

La producción de corticosterona en explantes colónicos no sufrió cambios importantes en los grupos NT; sin embargo, el grupo WT BD tenía una producción de corticosterona mayor que su control no tratado (figura 91A). Este aumento no se observó en el grupo GR BD. Por el contrario, no hubo cambios en los niveles plasmáticos de corticosterona o ACTH, a diferencia nuevamente de lo observado en la fase temprana de respuesta a DSS (figura 91B y C).



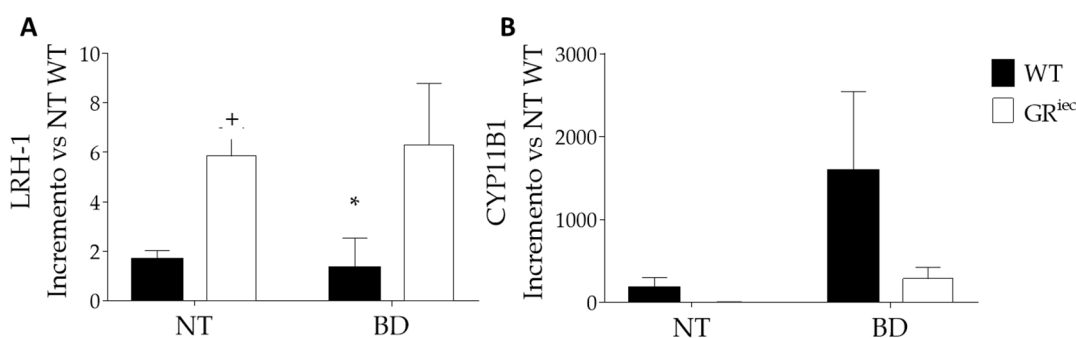
**Figura 91. Medida de corticosterona y ACTH en la colitis inducida por DSS.** Corticosterona en (A) explantes o (B) plasma y (C) ACTH plasmática tras 7 días de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6 μg/ratón/día. Datos representativos de experimento n=8. Los datos se expresan como media ± error estándar. + P<0,05 vs. WT; \* P<0,05 vs. NT.

La expresión de la enzima 11β-HSD1 fue sustancialmente menor (~90%) en los ratones tratados con budesonida, aunque la dispersión de datos en los grupos NT impidió alcanzar la significación estadística (figura 92A). Los niveles de ARNm de 11β-HSD2 fueron globalmente superiores en los grupos GR que en los WT, pero con una variabilidad marcada, especialmente en los animales tratados con budesonida (figura 92B).



**Figura 92. Estudio de la expresión génica de 11β-HSD1 y 11β-HSD2 en la colitis inducida por DSS.** Expresión génica por qRT-PCR en tejido colónico completo de (A) 11β-HSD1 y (B) 11β-HSD2 tras 7 días de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6 μg/ratón/día. Datos representativos de experimento n=8. Los datos se expresan como media ± error estándar.

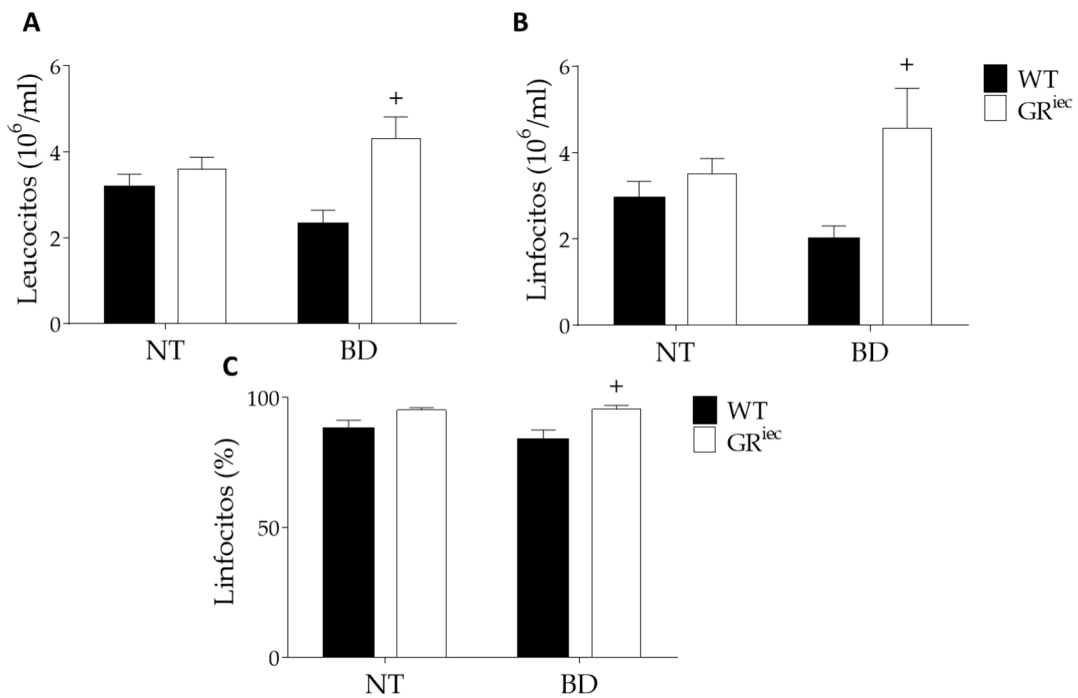
La expresión génica de LRH-1 que aumentó en ambos grupos GR sin alcanzar la significancia pero con un p=0.16 y p=0.11 con respecto a WT y WT BD respectivamente (figura 93A). La expresión de CYP11B1 no mostró cambios debido a la gran variabilidad de los datos experimentales (figura 93B).



**Figura 93. Estudio de la expresión génica de LRH-1 y CYP11B1 en la colitis inducida por DSS.** Expresión génica por qRT-PCR en tejido colónico completo de (A) LRH-1 y (B) CYP11B1 tras 7 días de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6 μg/ratón/día. Datos representativos de experimento n=8. Los datos se expresan como media ± error estándar. + P<0,05 vs. WT; \* P<0,05 vs. NT.

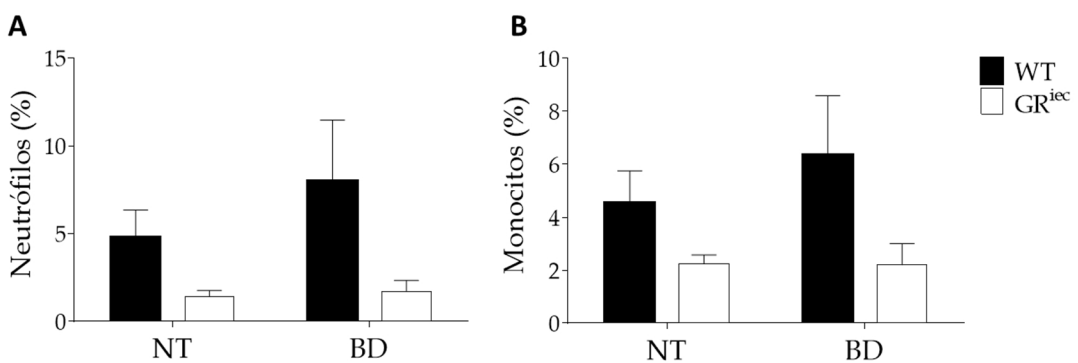
#### 4.8 Estudio hematológico en la colitis inducida por DSS en ratones carentes de GR en el epitelio intestinal.

El número total de leucocitos circulantes en sangre no se vio modificado por la ausencia del GR en los grupos NT (figura 94A), pero el tratamiento con budesonida se tradujo en un número menor de leucocitos y linfocitos en los ratones WT (p=0,09), mientras que en los ratones GR el número prácticamente se dobló (figura 94B y C). El porcentaje de linfocitos fue asimismo mayor en los grupos GR.



**Figura 94. Leucocitos y linfocitos sanguíneos en la colitis inducida por DSS.** (A) Número total de leucocitos, (B) linfocitos o (C) su porcentaje en sangre en ratones tras 1 día de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6 µg/ratón/día.

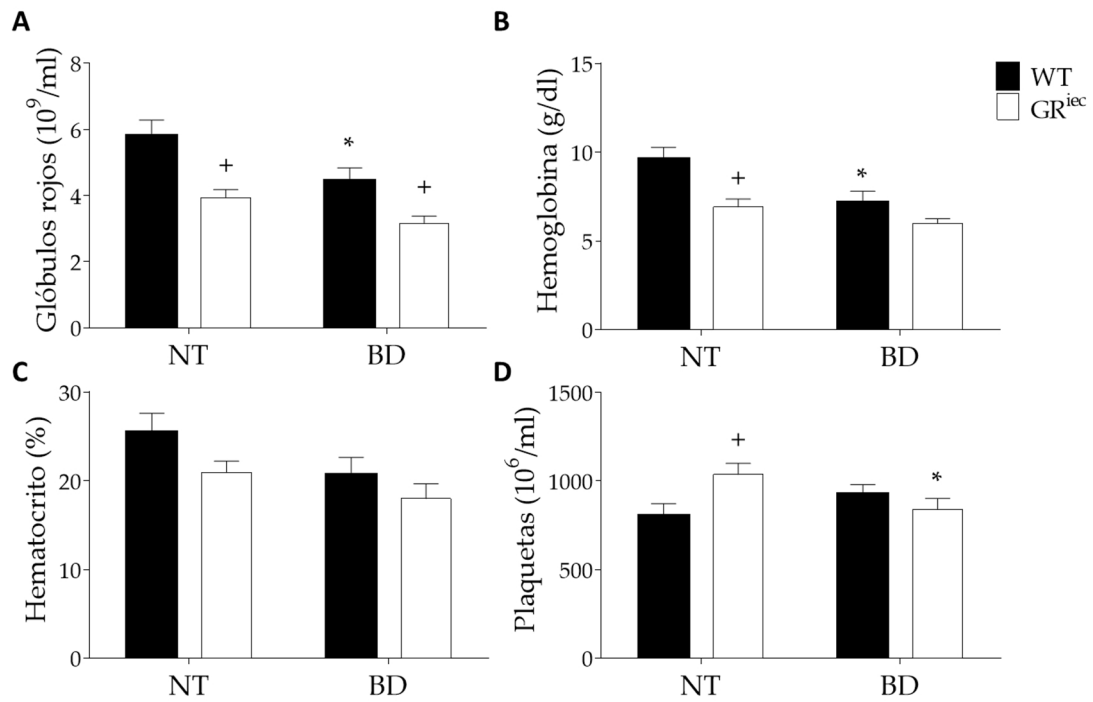
El porcentaje de neutrófilos y monocitos fue sustancialmente menor en los grupos GR, aunque sin llegar a ser significativa en ningún caso (figura 95).



**Figura 95. Neutrófilos y monocitos sanguíneos en la colitis inducida por DSS.** (A) Cantidad relativa (%) de neutrófilos y (B) monocitos en sangre tras 7 día de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6 µg/ratón/día. Los datos se expresan como media ± error estándar.

El tratamiento con budesonida en el grupo WT provocó una disminución significativa tanto de los glóbulos rojos como de la hemoglobina (figura 96A y B), efecto que se vio incrementado en los ratones GR. Esto puede deberse a que, como se ve en los ratones NT, el déficit de GR contribuye al descenso de glóbulos rojos y hemoglobina. Los datos de hematocrito fueron similares, pero en este caso sin llegar a alcanzarse diferencias significativas (figura 96C). Las plaquetas, por el contrario,

aumentaron en el grupo GR NT con respecto a los animales WT, efecto que desapareció al tratar con budesonida (figura 96D).



**Figura 96. Parámetros sanguíneos en la colitis inducida por DSS.** (A) Cantidad de eritrocitos, (B) hemoglobina y (C) plaquetas en sangre y (D) hematocrito tras 1 día de DSS en ratones WT y GR, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) a 6 µg/ratón/día. Los datos se expresan como media ± error estándar. + P<0,05 vs. WT; \* P<0,05 vs. NT.

# DISCUSIÓN





Nuestra tesis doctoral supone la continuación de una línea de investigación iniciada hace algunos años en nuestro grupo, centrada en la caracterización de los efectos perjudiciales de los corticoides en la inflamación intestinal, actualmente financiada por un proyecto de investigación del plan nacional (BFU2014-57736-P). Dicha línea de investigación surgió a partir de la observación de los resultados obtenidos en modelos de colitis experimental en nuestro laboratorio, en los que se utilizaban corticoides como tratamiento de referencia o control positivo. Así, mientras que la sulfasalazina presentaba una respuesta antiinflamatoria moderada y un tanto inconsistente, los corticoides utilizados, principalmente budesonida pero también prednisolona, producían una mejoría más pronunciada y reproducible de la inflamación intestinal. Sin embargo, al mismo tiempo, el tratamiento con el corticoide daba lugar a un deterioro del estado general del animal, particularmente pérdida de peso, y la mortalidad tendía a estar aumentada. Desde nuestro punto de vista, resultaba muy llamativo el hecho de que los efectos terapéuticos y nocivos se dieran simultáneamente, lo que sugería que eran consecuencia de las mismas acciones farmacológicas. Además, esta respuesta se producía en varios modelos experimentales de EII, y habían sido observados por otros autores. Un aliciente adicional era la forma de actuación de los corticoides en la EII: eficaces para el control de los brotes, pero no para su prevención, y pérdida frecuente del control de los mismos a medio plazo, características que parecían guardar cierta relación con nuestras observaciones en los modelos animales.

Una vez constatado el carácter perfectamente reproducible de estos efectos, nos propusimos caracterizarlos y hallar el porqué, con el objetivo último de dilucidar si este tipo de respuesta podría contribuir a los problemas conocidos de los corticoides en el manejo clínico de la EII y, en caso positivo, si éstos podían evitarse. Experimentos anteriores de nuestro grupo de investigación pusieron de manifiesto que ambas respuestas, antiinflamatoria y perjudicial, son esencialmente indisociables en el modelo de colitis por DSS en ratones, dado que se producen a las mismas dosis, las cuales corresponden además a las utilizadas clínicamente haciendo ajuste por superficie corporal o incluso por peso de colon. En concreto, la dosis de 6 µg da lugar a una mejoría significativa de la colitis, con disminución de la actividad mieloperoxidasa y la producción de IL6, pero al mismo tiempo produce pérdida de peso, llegando a forzar el adelanto del sacrificio de los animales por motivos éticos. A esta dosis no se producen efectos sistémicos, a juzgar por la ausencia de supresión del eje HAA (corticosterona plasmática). A esta dosis la budesonida produce efectos antiproliferativos en la mucosa colónica y un aumento de la sangre en heces, sin llegar a producir anemia, así como un incremento de

nitratos/nitritos en plasma. Globalmente, estos datos sugieren que la budesonida produce un debilitamiento de la función barrera intestinal, lo que se traduce en un aumento de la translocación bacteriana y/o de componentes bacterianos, y en una mayor pérdida de sangre al lumen intestinal. El estado de sepsis resultante podría justificar el deterioro del estado de los animales, aun a pesar de la mejoría de la inflamación colónica. El incremento de la dosis aumenta tanto los efectos antiinflamatorios como de deterioro del estado de los animales, particularmente con la dosis de 60 µg (cita).

El debilitamiento de la barrera intestinal puede ocurrir a distintos niveles, pero uno de los elementos fundamentales es probablemente el epitelio intestinal. Esta hipótesis se basa en el efecto antiproliferativo observado tanto *in vivo* como *in vitro* con la budesonida (y otros corticoides), en la modulación de citoquinas moduladoras de la proliferación epitelial, en el aumento de la translocación y en la pérdida de sangre al lumen intestinal. Con el fin de estudiar el papel de las acciones de los corticoides sobre el epitelio intestinal de forma específica desarrollamos un modelo de ratón con delección genética inducible en enterocitos, gracias a la disponibilidad de ratones Villina-Cre-ER<sup>T2</sup>. Aunque técnicamente supone ciertos obstáculos, la utilización de un modelo inducible tiene dos ventajas considerables. Una, que permite desarrollar el modelo aun cuando la delección resulte incompatible con el desarrollo embrionario (no es el caso, puesto que existen ratones GR<sup>ΔIEC</sup> con delección constitutiva, no inducible, que se desarrollan normalmente [112]). Otra, que permite el seguimiento de los efectos agudos de la delección génica, sin dar ocasión a que entren en juego mecanismos compensatorios, los cuales pueden llegar a dificultar enormemente, e incluso imposibilitar, la interpretación de los datos obtenidos. Nuestros resultados indican precisamente que existen diferencias temporales en el fenotipo de los ratones, tanto en condiciones basales como en presencia de inflamación experimental por DSS, lo que avala la idoneidad de nuestra estrategia. La delección genética en sí es eficiente y estable, dado que ha sido documentada hasta 14 días post-inducción, y es algo más pronunciada en el intestino delgado que en el colon, de acuerdo con resultados obtenidos en otros modelos murinos de este tipo, posiblemente relacionados con el nivel de expresión de la villina [415].

Considerando el efecto de los corticoides a nivel epitelial, cabría esperar que los ratones GR<sup>ΔIEC</sup> presentasen diferencias en la capacidad de proliferación/regeneración, particularmente en condiciones de inflamación, y, potencialmente, defectos en la función barrera, como aumento de translocación, mayor permeabilidad a macromoléculas o incremento de sangre en heces. En

general se considera que el proceso de delección genética dependiente de Cre recombinasa tarda algunos días en alcanzar su efecto máximo (por ejemplo, en algunos casos de delección de genes vitales, la muerte de los ratones sobreviene a los 5-7 días de la inducción), razón por la cual examinamos el estado de los animales inicialmente 7 días después de la primera dosis de tamoxifeno como primer punto temporal en el que pudieran observarse las consecuencias de la intervención. El segundo punto temporal, 14 días, fue seleccionado con el fin de constatar la estabilidad de la delección y la permanencia o no de los efectos observados. El intestino grueso de los ratones mostró signos de inflamación a los 7 días, pero no a los 14 días. La respuesta inflamatoria fue de intensidad moderada-baja y a simple vista un tanto inconsistente, es decir, se observaba en unos ratones pero no en otros, aunque fue mucho más reproducible a nivel bioquímico. Los cambios histológicos fueron mínimos y relacionados fundamentalmente con la capa epitelial, no hubo engrosamiento, y el grado de infiltración de la mucosa aumentó sólo de forma marginal, según el análisis histológico y la medida de la actividad mieloperoxidasa. Por el contrario, se produjo un aumento marcado de la expresión de S100A8/S100A9 en el colon. El dímero S100A8/S100A9, más conocido como calprotectina, se expresa fundamentalmente en neutrófilos pero también en otras células, y es uno de los marcadores inflamatorios más utilizados en clínica. Ambas subunidades pueden expresarse de forma independiente, pero el dímero presenta una mayor estabilidad bioquímica. La mieloperoxidasa es asimismo un constituyente de neutrófilos, así como de macrófagos, pero en este caso sus niveles, aunque más elevados que en ratones control, no presentaron diferencias significativas. Teniendo en cuenta que el análisis histológico mostraba un cierto aumento de la infiltración leucocitaria, nuestros resultados apuntan globalmente a una respuesta proinflamatoria de magnitud reducida en ratones GR<sup>AI/EC</sup>. Las diferencias observadas entre S100A8/9 y mieloperoxidasa podrían ser debidas a la técnica utilizada (ARNm frente a actividad enzimática) o a que la expresión se vea afectada de forma distinta por la activación celular (esto es, que S100A8/9 tenga una mayor expresión que la mieloperoxidasa en neutrófilos relativamente poco activados, de forma que el primero actúe más como marcador celular en este caso).

Otros datos que indican una respuesta inflamatoria incluyen: el incremento de fosforilación de STAT3; el aumento de la sensibilidad de la actividad fosfatasa alcalina al levamisol, lo que puede deberse tanto a la infiltración antes mencionada como a cambios de expresión de la isoforma de la enzima expresada por células epiteliales bajo estrés [419, 428]; la leucocitosis a los 7 días; y el incremento generalizado de citoquinas, incluyendo GM-CSF, lo que puede explicar el

reclutamiento de neutrófilos. Por lo general, el perfil de expresión fue de normalización a los 14 días, con excepción de IL27 e IL9, que presentaron niveles esencialmente inalterados a 7 días y significativamente disminuidos a los 14 días. La IL27 es una citoquina dimérica producida por células presentadoras de antígenos que modula la actividad de linfocitos B y T, mientras que la IL9 es producida por linfocitos y entre sus funciones se encuentra la regulación de la hematopoyesis. Los efectos llegaron a adquirir carácter sistémico, con aumento de los niveles plasmáticos de algunas citoquinas, como TNF $\alpha$  o IL6, y disminución de la leptina circulante.

Dado que la mayor parte de los genes mencionados se expresan en células no epiteliales en el intestino, la modulación de sus niveles sólo puede ser indirecta, es decir, producida a partir de la ausencia del receptor GR en el epitelio. Estos resultados se explican probablemente por la ausencia de la inhibición por *tethering* de STAT3 y de NF  $\kappa$ B y otras vías en las células epiteliales, mecanismos que tienden asimismo a promover un aumento de la proliferación celular y una menor tendencia a la apoptosis (ver más adelante). El hecho de que una de las consecuencias de la intervención sea la modulación de las poblaciones celulares en los ganglios mesentéricos, con alteraciones en las proporciones de linfocitos T y Treg, monocitos y células dendríticas, es notable. Además de estos cambios, se produjeron otros efectos en el bazo, generalmente no coincidentes con los anteriores. Los ratones GR<sup>AIIEC</sup> presentaron asimismo un aumento de los linfocitos CD8<sup>+</sup> TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> en el compartimento intraepitelial, nuevamente con carácter temporal, dado que las proporciones se normalizaron completamente a los 14 días.

Los ratones GR<sup>AIIEC</sup> presentaron asimismo alteraciones sustanciales en el propio epitelio. En primer lugar, un ritmo de proliferación epitelial aumentado, según los niveles proteicos de PCNA y ciclina D1, incrementados en IECs (no significativo en el caso del PCNA), y los niveles de ARNm tanto de ciclina D1 como de cMyc, que estaban asimismo aumentados en colon total. La medición directa de la proliferación se abordó mediante marcaje con BrdU, pero hasta el momento no hemos conseguido detectar el marcador en estas muestras, por razones desconocidas (la técnica ha funcionado correctamente en otros experimentos). In vitro los corticoides retrasan la reepitelización tanto en células IEC18 como Caco2, aun en presencia de IL22 o IL27, citoquinas que promueven la proliferación de IECs. En consonancia con lo anterior, la budesonida reduce la expresión (ARNm) de cMyc y ciclina D1 en ratones con colitis por DSS in vivo. Estos datos indican en su conjunto que el efecto de los corticoides es directo, es decir, ejercido sobre las IECs sin mediación de intermediarios. Uno de los mecanismos posibles, en principio, es la

modulación de la expresión de DKK1, un inhibidor endógeno de la vía WNT de gran importancia en el intestino. DKK1 posee efectos antiproliferativos y antiapoptóticos, y los ratones *doubleridge*, que presentan una expresión reducida de esta proteína, están protegidos frente a la colitis por DSS [429]. Los corticoides aumentan la expresión de DKK1 y, en nuestro estudio, los ratones GR<sup>ΔIEC</sup> presentaron una reducción de un ~40% de los niveles plasmáticos de DKK1, lo que sugiere una conexión mecánica entre la ausencia de señalización a través del GR y la disminución del inhibidor, ya que éste se expresa en parte en IECs. Sin embargo, nosotros no hemos conseguido detectar DKK1 en el colon normal o inflamado en ningún caso, pese a que la expresión parece estar aumentada en condiciones de inflamación, según otros autores [429]. Por otra parte, aunque la señalización por DKK1 es importante tanto en intestino delgado como en el grueso, la fuente celular parece ser diferente, en la medida en que las IECs sólo contribuyen significativamente en el primero, mientras que el origen es enteramente extraepitelial en el colon [430]. Según esto DKK1 no puede estar implicado por tanto en el efecto directo de GR en el epitelio en el colon, contrariamente a nuestra hipótesis de partida. Por otra parte, los niveles de expresión de DKK1 en IECs son relativamente bajos en cualquier caso, es decir, no podemos descartar categóricamente la expresión de DKK1 en el colon de los ratones GR<sup>ΔIEC</sup>. Por tanto, es difícil interpretar el descenso de los niveles plasmáticos, pero en todo caso podrían contribuir en alguna medida a la menor proliferación epitelial, tal vez de forma más acusada en el intestino delgado, aunque este extremo no ha sido investigado aún por nuestro grupo y queda pendiente para un futuro próximo (disponemos de las muestras derivadas de los experimentos contenidos en la tesis).

El análisis de los marcadores de los distintos linajes epiteliales no arrojó resultados significativos, pero apunta a posibles alteraciones en el ritmo de proliferación de los mismos, que se normalizarían en todo caso a los 14 días, y que incluirían una menor capacidad proliferativa de los enterocitos frente al resto de células epiteliales. En el intestino delgado disminuyó el grosor de la capa intestinal, lo que en principio es coherente con un menor ritmo de proliferación epitelial, pero hay que tener en cuenta que el efecto global, al menos en el colon, es de aumento de la proliferación como consecuencia de la delección del GR. También en este caso el efecto se pierde a los 14 días. A pesar de lo anterior, tanto MUC3 como TFF3, producidos por células caliciformes, presentaron una expresión reducida en el colon a 14 días, poniendo de manifiesto que la normalización no es total.

Un segundo aspecto de gran importancia en la homeostasis del epitelio intestinal es la regulación de las uniones intercelulares, sobre las cuales los corticoides tienen

efectos bien conocidos, y que pueden resumirse en un reforzamiento de las uniones estrechas. Con el fin de caracterizar el fenotipo de los ratones GR<sup>ΔIEC</sup> se realizó un estudio de transporte iónico en colon distal montado en cámaras de Ussing, así como un ensayo de permeabilidad a FITC-dextrano 4 kD in vivo. Los resultados no indican una alteración sustancial de la permeabilidad o de la conductancia. El transporte iónico electrogénico basal (fundamentalmente secreción de Cl) permaneció asimismo inalterado. Sin embargo, la respuesta al secretagogo carbacol se vio significativamente disminuida a los 14 d de la deleción, lo que supone una inhibición sustancial (en torno al 40%) de la secreción inducida por receptores colinérgicos. Los corticoides tienen efectos harto conocidos sobre el transporte iónico, consistentes en inhibición de la secreción y estimulación de la absorción de NaCl y agua. El resultado final es una mayor captación de agua y electrolitos, lo que contribuye a la retención de fluido en pacientes tratados con corticoides, coherente desde el punto de vista fisiológico con los efectos a nivel del riñón. Esta respuesta es predominantemente epitelial, y por tanto mediada por el receptor GR en IECs. Los efectos de la deleción del receptor han sido estudiados por Reichardt y colaboradores [112, 113], quienes establecieron que el receptor está implicado directamente en la respuesta de incremento de absorción de sodio y glucosa a la dexametasona así como en la inducción de gastroparesia.

Es importante recordar que la medición de la corriente de cortocircuito I<sub>sc</sub> en cámaras de Ussing únicamente es capaz de detectar el transporte electrogénico, y por tanto a través de este parámetro es posible determinar la secreción de Cl<sup>-</sup> y HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, pero no la absorción de NaCl, que es electroneutra. En función de las acciones conocidas de los corticoides, el resultado esperable era una potenciación de la respuesta secretora, o bien una ausencia de cambios en el transporte (I<sub>sc</sub> aumentada o bien similar a la de los ratones WT). Por tanto, este dato carece de explicación, especialmente si consideramos que no se registraron cambios a los 7 días, es decir, la inhibición de la respuesta secretora se produce de forma tardía. Dado que la inflamación crónica reduce la respuesta a secretagogos [431], una posible explicación es que la inflamación reducida que se produce a consecuencia de la deleción del GR en el epitelio sea responsable de este fenómeno. Dado que la inflamación aguda no inhibe la secreción iónica en el intestino, la ausencia de cambios en la I<sub>sc</sub> en respuesta a carbacol a 7 días puede deberse a que la inflamación es aún reciente en este momento.

En tercer lugar, nuestros datos muestran un aumento de los niveles proteicos de S100A9 en el epitelio de los ratones GR<sup>ΔIEC</sup>. Otros autores han aportado pruebas de la expresión de S100A9 (pero no S100A8) en líneas celulares de epitelio intestinal

[432]. Es interesante recordar que la expresión de S100A9 en células aisladas de colon de ratón está aumentada por la IL6 (y en la línea celular Caco-2), lo que sugiere una respuesta de tipo inflamatorio, y de hecho existe una buena correlación entre ambos parámetros en nuestro estudio. La función de S100A9 en el epitelio es desconocida aunque puede ejercer una función inmunoreguladora importante ejerciendo como regulador de la subunidad S100A8 o activando algún receptor *per se* [433].

A pesar del aspecto ligeramente hiperémico, de los segmentos intestinales de los ratones GR<sup>ΔIEC</sup>, y de la anemia asociada, no se detectó sangre en las heces utilizando dos técnicas distintas (que sí fueron positivas en los experimentos con DSS). En consecuencia, la anemia podría ser secundaria a la extravasación de sangre en la mucosa intestinal, pero sin alcanzar el lumen, es decir, una hemorragia intramucosal. Actualmente estamos explorando esta posibilidad en el laboratorio. Según nuestra experiencia, en cualquier caso, los ratones C57BL/6 son relativamente resistentes a la anemia, ya que los niveles de eritrocitos, hemoglobina y hematocrito suelen quedar inalterados en la colitis por DSS, en la que la hemorragia es intensa. La budesonida de hecho potencia la hemorragia en este modelo, lo que hemos achacado a sus acciones antiangiogénicas, que presumiblemente pueden dificultar la reparación vascular en un contexto inflamatorio, y a alteraciones en la función de barrera, facilitadoras del paso de eritrocitos al lumen una vez producida la extravasación. Dada la ausencia de sangre en heces, parece claro que la ausencia del receptor GR no aumenta la filtración de sangre de la lámina propia al lumen (ver más adelante).

Por tanto, la delección del GR en células del epitelio intestinal da lugar a una respuesta inflamatoria limitada, protagonizada aparentemente por la hemorragia intramucosal y de carácter autolimitante, con incremento de la proliferación celular y con consecuencias sistémicas. Debido a la naturaleza dinámica, cambiante en el tiempo, de los efectos de la delección del GR, los efectos en un contexto inflamatorio deben variar en función de la correspondencia temporal de los tiempos de inducción (es decir, no es lo mismo inducir colitis a los 7 días que a los 14 días de la delección génica). En principio, decidimos iniciar la administración de DSS a los 7 días de la primera dosis de tamoxifeno, de forma que coincide el momento de máximo efecto de la delección del GR con el comienzo del daño epitelial que constituye la base del modelo de colitis. Nuestros resultados pusieron de manifiesto prontamente que los ratones GR<sup>ΔIEC</sup> presentan dos respuestas claramente diferenciadas: los animales están protegidos en la fase semicrónica (7 días) de la colitis, mientras que la respuesta inicial (1 día) está potenciada. La constatación de



este hecho nos llevó a realizar experimentos separados, al objeto de caracterizar el fenotipo de los animales en ambos casos.

Normalmente la respuesta inflamatoria al DSS tarda varios días en manifestarse clínicamente, de forma que el primer día los ratones son muy similares a los animales sin inflamación alguna, y efectivamente los ratones del grupo WT NT tuvieron un aspecto normal y marcadores de inflamación negativos, incluyendo citoquinas plasmáticas y citoquinas producidas por explantes colónicos. En contraste con los ratones WT, las características generales de los animales GR<sup>ΔIEC</sup> tratados con DSS durante un día indican un estado inflamatorio considerable, agravado con respecto al de los ratones GR<sup>ΔIEC</sup> no colíticos (es decir, no expuestos a DSS) 7 días post-tamoxifeno, con engrosamiento, infiltración y lesión epitelial visibles en el análisis histológico, aumento de la actividad fosfatasa alcalina (y sensibilidad de la misma al levamisol), e incremento de varias citoquinas en explantes colónicos (MIP1 $\alpha$ , MIP1 $\beta$ , GM-CSF, IP-10, MCP-1, RANTES, TNF $\alpha$ , etc.). En algunos casos los niveles de citoquinas que estaban aumentados con respecto a los ratones WT fueron similares a los medidos en ratones GR no colíticos (IL10, IP10), pero en general se observó un incremento adicional como consecuencia de la exposición a DSS. El aumento de la actividad de la fosfatasa alcalina y su mayor capacidad de inhibición por levamisol in vitro son características de la inflamación intestinal, y se deben a la infiltración leucocitaria, por un lado, y a un cambio de isoforma en enterocitos [419, 428], de forma que globalmente aumenta la presencia de la isoforma renal u ósea de fosfatasa alcalina no específica de tejido en el colon. La infiltración leucocitaria, patente en el análisis histológico y netamente aumentada con respecto a los ratones GR<sup>ΔIEC</sup> no colíticos, se correlacionó con niveles muy elevados de S100A8/9; por el contrario, los niveles de actividad mieloperoxidasa colónica no estaban elevados significativamente, aun cuando los valores de los grupos GR<sup>ΔIEC</sup> fueron generalmente mayores. Esta situación es análoga a la de los ratones no expuestos a DSS, y se debe presumiblemente a las mismas razones. Del mismo modo, los valores plasmáticos de IL6, TNF $\alpha$ , haptoglobina y leptina fueron comparables a los de los ratones GR<sup>ΔIEC</sup> +7 días del experimento anterior, es decir, no hay efecto del DSS en esta primera fase en cuanto a respuesta sistémica. Dado que la IL6 no estaba aumentada en los explantes colónicos, y que tampoco lo estaba significativamente en los ratones GR<sup>ΔIEC</sup> no expuestos a DSS, cabe suponer que el origen de la IL6 circulante sea mayoritariamente extraintestinal (hepático, probablemente). Además de la leucocitosis observada, lo más destacable posiblemente sea la disminución de la proporción de neutrófilos en sangre en los ratones GR<sup>ΔIEC</sup> tratados con DSS con

respecto a los WT. Este efecto se observa igualmente en la fase tardía de la colitis por DSS, pero en ese caso el peso del bazo se incrementa notablemente en los ratones GR<sup>ΔIEC</sup>, mientras que en la fase temprana dicho peso es menor que en los WT (ver más adelante).

A nivel epitelial, el tratamiento con DSS modificó el equilibrio relativo de los distintos linajes, ya que se observó un incremento de la señal de LYZ1 y una disminución de IAP y LGR5 (no siempre significativa), lo que sugiere un menor número de enterocitos y células pluripotenciales y un incremento de células de Paneth, a pesar de que éstas últimas presentan normalmente una persistencia mayor que el resto. Actualmente intentamos caracterizar estos cambios en organoides generados a partir de los ratones GR tratados *in vitro* con tamoxifeno. Estas alteraciones están asociadas nuevamente a una mayor proliferación, según se deduce de la mayor expresión de ciclina D1 y PCNA. Por el contrario, cMYC presentó valores muy similares a los de los ratones WT NT. Desconocemos sin embargo si el ritmo se incrementa con respecto a los ratones no tratados con DSS, al no disponer de ensayos comparativos, y a la espera de obtener datos directos de proliferación (BrdU). En todo caso, los ratones expuestos a DSS presentaron valores plasmáticos muy reducidos de DKK1 (4-15 veces), algo menos en los ratones GR<sup>ΔIEC</sup> que en los WT, lo que probablemente contribuye a la respuesta proliferativa globalmente, pero no al aumento de dicha respuesta en los ratones con delección del GR. Aunque los niveles de DKK1 bajan normalmente en condiciones de inflamación como respuesta adaptativa, es importante recordar que los ratones WT no presentan inflamación en este punto temporal, es decir, DKK1 parece responder más al daño epitelial directo producido por el DSS que a la respuesta inflamatoria subsiguiente. El incremento de los niveles de IL22 (~5X) está probablemente implicado en cambio en la regulación de la proliferación epitelial de forma específica en los ratones GR<sup>ΔIEC</sup>, ya que se induce intensamente en este grupo. Los niveles reducidos de claudina 2 y 4 sugieren un debilitamiento de las uniones estrechas; sin embargo, no se registraron cambios significativos en la permeabilidad a FITC-dextrano 4 kD *in vivo*, a pesar de que los niveles fueron globalmente más elevados en los ratones GR<sup>ΔIEC</sup>, lo que sugiere que la permeabilidad a macromoléculas no se vio sustancialmente afectada. Es relevante para nuestra discusión considerar el estudio de Reis de Souza y colaboradores [434], en el que observó que los animales adrenalectomizados presentaban una mayor afectación sistémica en la colitis por DSS, pero paradójicamente un daño histológico menor, lo que los autores atribuyen a la inducción de células dendríticas tolerogénicas y a la potenciación de la función de barrera por medios inmunológicos dependientes de IFN $\gamma$ . Se han publicado

resultados similares en ratones carentes de CRH [435], pero también otros contrarios en animales adrenalectomizados [436].

Por tanto, los ratones GR<sup>ΔIEC</sup> son más sensibles al daño inicial por DSS, el cual potencia la respuesta inflamatoria que la delección del gen provoca a nivel de la mucosa colónica, al tiempo que la dinámica epitelial se altera en mayor medida. Por el contrario, los ratones GR<sup>ΔIEC</sup> están protegidos frente a la inflamación en fases posteriores (es decir, a los 7 días de la administración de DSS), según se deduce en primer lugar de la evolución positiva del peso corporal y del DAI en los últimos 2 días, y posteriormente por múltiples parámetros inflamatorios obtenidos una vez realizado el sacrificio de los animales, entre los que destaca una mejoría histológica muy marcada y una disminución asimismo intensa de la actividad mieloperoxidasa y de los niveles de S100A8/9. La mieloperoxidasa sólo se vio aumentada precisamente a los 7 días de la inducción de colitis en los animales WT, y sólo en este punto se verificó una correlación con S100A8/9, lo que apoya en principio nuestra hipótesis de una regulación dispar de ambos marcadores en función de la activación del neutrófilo. Los niveles de citoquinas producidas por explantes colónicos ex vivo fue globalmente menor en los ratones GR<sup>ΔIEC</sup>, pero esta diferencia sólo alcanzó el umbral de la significación estadística en algunos casos (IL17A, IL9, IL5). Esta mejoría no se vio reflejada en los niveles plasmáticos de los marcadores inflamatorios, lo que se debe a que IL6, TNF y haptoglobina presentan niveles aumentados (y niveles disminuidos en el caso de la leptina) en los animales WT, mientras que dichos niveles se mantienen en los ratones GR<sup>ΔIEC</sup>. En el caso de la IL6, los niveles no sólo se igualan a los del grupo GR, sino que llegan a doblarse respecto a los mismos ( $p=0,056$  en la comparación particular entre ambos grupos por t de Student). Del mismo modo, no hubo diferencias en el engrosamiento colónico ni en la longitud. Un hallazgo particularmente notable fue el incremento del peso del bazo en los animales GR<sup>ΔIEC</sup>, con o sin tratamiento con budesonida. La esplenomegalia suele obedecer a una respuesta inmunológica sistémica, y de hecho puede darse como parte de los signos de la colitis por DSS [437], aunque no es el caso en el presente experimento. Nuestros datos no nos permiten aventurar por el momento una explicación de este fenómeno, pero el mecanismo puede estar relacionado con la modulación del tráfico leucocitario puesto de manifiesto en los ratones no colíticos. Actualmente estamos caracterizando las poblaciones leucocitarias presentes en el bazo mediante la medida de marcadores celulares por RT-qPCR.

A nivel del epitelio, los ratones GR<sup>ΔIEC</sup> no mostraron cambio alguno a los 7 días de colitis por DSS en la permeabilidad a FITC-dextrano 4 kD, ni en la expresión

reducida de claudina 2 y claudina 4, y la S100A9 epitelial no se modificó significativamente con respecto al grupo WT, aunque los niveles fueron globalmente menores. Además, la fosfatasa alcalina siguió estando elevada en los ratones GR<sup>ΔIEC</sup> lo que, considerando el efecto marcado en cuanto a infiltración leucocitaria, probablemente refleja mayoritariamente el estrés epitelial en estos animales [438]. Tampoco se registraron cambios en la capacidad proliferativa con respecto al grupo WT. Sin embargo, la fosforilación de STAT3 sí se vio reducida en las IECs del grupo GR NT, aunque no en colon total. Este dato contrasta fuertemente con el incremento de la fosforilación de STAT3 observado en ratones GR<sup>ΔIEC</sup> no colíticos, y refleja probablemente la mejoría general de la inflamación.

Por tanto, el fenotipo de los ratones GR<sup>ΔIEC</sup> es particularmente complejo, ya que los animales presentan una colitis de gravedad atenuada, con menor tendencia a la sepsis, pero al mismo tiempo con una anemia más pronunciada. Además, la proliferación epitelial ya no está aumentada respecto al grupo WT a los 7 días de la colitis. ¿Qué cambia entonces con respecto al agravamiento observado en el primer día de administración de DSS? Para poder responder esta pregunta debemos considerar previamente dos aspectos fundamentales de nuestro estudio, concretamente la asociación entre anemia y hemorragia, en primer lugar, y la regulación de la producción intestinal de corticoides, en segundo lugar.

Uno de los resultados más llamativos de nuestro estudio es la respuesta variable de hemorragia y anemia en los distintos experimentos. Si en ratones no expuestos a DSS la delección del GR en el epitelio producía hemorragia sin llegar a producir pérdidas hacia el lumen, y anemia, la adición de DSS se tradujo en sangrado prominente exclusivamente en estos ratones, pero paradójicamente fueron los ratones WT los que experimentaron un descenso del número de glóbulos rojos, hemoglobina y hematocrito. Este nivel de sangrado masivo no se produjo sin embargo en la fase tardía de la colitis por DSS en ninguno de los grupos, que presentaron un nivel más reducido, pero constante (la sangre oculta en heces se mide todos los días), reflejando una pérdida continuada de sangre al lumen, que tuvo su correlato en una anemia intensificada con el tiempo (compárense, en este sentido, los valores correspondientes a 1 y 7 días post-DSS, figuras X e Y). Dicha anemia fue más acusada en el grupo GR<sup>ΔIEC</sup> a los 7 días de la colitis, en fuerte contraste con lo observado el primer día. Nuestros resultados sugieren por tanto que el daño epitelial producido por el DSS da lugar a un grado reducido, pero continuado, de hemorragia intestinal, que se ve inicialmente potenciado en el caso de los ratones GR<sup>ΔIEC</sup>, presumiblemente porque en ellos la delección del GR ya producía hemorragia intramucosal. El hecho de que la pérdida luminal de sangre

se equilibre posteriormente entre ambos grupos apunta a que el efecto inicial sea achacable a sangre acumulada en la mucosa en los días precedentes al tratamiento con DSS, puesto que, si el defecto fuera principalmente epitelial, debería probablemente mantenerse a lo largo del tiempo. Esta explicación es coherente con el hecho de que no se produzca anemia el primer día en los ratones GR<sup>ΔIEC</sup>, ya que la pérdida de sangre presumiblemente tiene lugar durante varios días, permitiendo una respuesta hematopoyética adaptativa, mientras que en los ratones WT la hemorragia se produce en un solo día, dificultando por tanto la compensación. No está claro, sin embargo, cómo la delección del gen GR en IECs puede modificar la angiogénesis o afectar de otro modo la vascularidad de la mucosa (hipótesis que en cualquier caso requerirá demostración directa), pero probablemente se trata de un efecto dependiente de la secreción de determinados mediadores por parte de epitelio. Actualmente tratamos de identificar dichos mediadores utilizando organoides como modelo reduccionista. Es improbable que se trate de corticosterona, en la medida en que los niveles de la misma no se vieron alterados en comparación con los ratones WT en ningún momento. El impacto de la delección génica del GR en la homeostasis hormonal es precisamente otro de los resultados más sobresalientes.

La producción local de corticoides en el intestino ha sido situada en IECs de la cripta y está bajo el control del factor de transcripción LRH1 [341], sin efecto alguno de la ACTH [67]. TNF parece tener un papel sobre esta regulación, pero los datos son contradictorios [65, 66, 439]. Los niveles de corticosterona producidos por explantes colónicos se incrementaron cuantiosamente en los ratones con colitis semicrónica por DSS (7 días), pero no hubo diferencias entre los grupos WT y GR<sup>ΔIEC</sup>, y tampoco las hubo en los otros dos experimentos, en los que la producción endógena fue muy inferior. Por otra parte, la síntesis local de corticoides aumentó a los 14 días de la delección, pero no a los 7 días. Este incremento no se asocia a cambios en la expresión de LRH1, al menos a nivel de ARNm. Sin embargo, la expresión de CYP11B1, que cataliza el paso final en la biosíntesis del corticoide, está claramente disminuida en el colon de los ratones GR<sup>ΔIEC</sup> a los 14 días, es decir, coincidiendo con el aumento de la producción de corticosterona. Por tanto, es posible que la supresión de CYP11B1 sea consecuencia del incremento de los niveles de corticoide, que a su vez se explica probablemente por la inducción de otras enzimas biosintéticas, extremo que estamos explorando en la actualidad. En este sentido, se ha descrito que la etapa limitante de la síntesis está catalizada por CYP11A1, pero no hemos conseguido amplificar ARNm de muestras de colon. Es improbable que la enzima 11-HSD1 (que cataliza la regeneración de corticosterona a partir de 11-

deshidro corticosterona) esté implicada, puesto que su expresión no se modifica a los 14 días, aunque sus niveles sí están incrementados a los 7 días, lo que es coherente con la respuesta inflamatoria, que es un estímulo inductor de su expresión [65]. En los experimentos con DSS queda de manifiesto que la producción local de corticosterona se asocia con cambios marcados de la expresión (ARNm) de CYP11B1, 11 $\beta$ -HSD1 y 11 $\beta$ -HSD2, lo que sugiere que efectivamente no son enzimas limitantes en el colon. En el pulmón, la 11 $\beta$ -HSD1 es una fuente muy importante de corticosterona en condiciones de activación inmunológica, utilizando como precursor 11-deshidro corticosterona circulante (procedente de la corteza suprarrenal) [440], mientras que en el intestino la síntesis de novo regulada por LRH1 parece tener un papel más importante [341], y de hecho los niveles de LRH1 eran claramente mayores en los animales con colitis semicrónica. Sin embargo, el incremento considerablemente mayor que se observa en los ratones GR<sup>ΔIEC</sup> no se tradujo en un aumento de la producción de corticosterona. Este hecho sugiere a la vez que el receptor GR está implicado posiblemente en la regulación de la expresión de LRH1, mediante un circuito de retroalimentación negativa, y que la respuesta al aumento de expresión de este factor queda saturada en estas condiciones.

Los niveles plasmáticos de corticosterona no están normalmente modificados en los ratones con colitis por DSS a los 7 días (fase semicrónica) [343], a pesar de que la colitis es un elemento estresante evidente. Del mismo modo, en el presente estudio no se observaron diferencias sustanciales en los niveles plasmáticos de corticosterona entre los grupos, ni entre los distintos experimentos. En todo caso, los niveles eran algo menores en los animales con colitis. Los ratones con delección estable de GR en enterocitos presentan asimismo niveles normales de corticosterona circulante [112]. Sin embargo, los niveles de ACTH sí se vieron aumentados el primer día de tratamiento con DSS en los ratones WT NT, aunque no a los 7 días. Por tanto, es posible que el eje HAA se vea estimulado por la colitis por DSS, pero presumiblemente en los días 2-4 aproximadamente, de forma que no se detecta en nuestras muestras. Actualmente intentamos confirmar este extremo. Asumiendo esta hipótesis, sin embargo, hay que resaltar que el incremento de ACTH no se produce en los ratones GR<sup>ΔIEC</sup>, es decir, de alguna forma la delección genética del GR en el epitelio impide, o tal vez retrasa, la respuesta del eje HAA. Por el contrario, en los ratones no tratados con DSS lo que se observa es un descenso significativo de la corticosterona plasmática, tanto a los 7 como a los 14 días. Los niveles de ACTH en plasma no se vieron modificados significativamente, pero en ambos grupos estaban elevados con respecto al control WT, lo que podría interpretarse como compensación hipofisaria frente a una hipofunción cortical. Sin embargo, dada la

magnitud de los cambios y su carácter estable en el tiempo, los ratones GR<sup>ΔIEC</sup> deberían presentar un incremento claro (y significativo) de la ACTH, el cual no se produce. Por tanto, globalmente nuestros datos apuntan a una inhibición del eje HAA en los ratones GR<sup>ΔIEC</sup>. Estudios anteriores han puesto de manifiesto que la producción intestinal de corticoides es independiente del circuito sistémico, pero la posible influencia de la corticosterona de origen intestinal sobre el eje HAA no está bien caracterizada [67]. En todo caso, no hay ningún estudio hasta la fecha, hasta donde sabemos, que haya verificado el efecto de la delección genética del GR en IECs sobre el eje HAA. Carecemos de explicación para este fenómeno por el momento, pero dado que la producción local de corticosterona es comparable en ratones WT y GR<sup>ΔIEC</sup> en todas las condiciones experimentales, es improbable que ésta se encuentre implicada en el mecanismo. La excepción la constituyen los ratones GR<sup>ΔIEC</sup> a los 14 días de la administración de tamoxifeno, los cuales presentan una producción aumentada de corticosterona, pero los niveles plasmáticos de ACTH y corticosterona fueron idénticos a los de los ratones GR<sup>ΔIEC</sup> a los 7 días y a los WT, apoyando nuevamente la ausencia de relación entre ambos fenómenos. Actualmente intentamos medir la expresión de enzimas esteroidogénicas en la cápsula suprarrenal.

Por tanto, nuestros datos indican que en los ratones GR<sup>ΔIEC</sup> se produce una hemorragia mucosal de forma continua, con la consiguiente anemia, que está agravada por la colitis y que no mejora a los 7 días de la misma. Teniendo en cuenta el incremento de la inducción de LRH1 en los ratones GR<sup>ΔIEC</sup> en este punto temporal, cabría esperar un aumento de la síntesis local de corticoides, la cual podría explicar la mejoría de la inflamación. Sin embargo, los niveles de corticosterona fueron similares a los del grupo WT. No podemos descartar la posibilidad de que se produzcan cambios en la concentración de corticosterona en el entorno íntimo de las criptas colónicas que sean biológicamente relevantes y que no se reflejen en los valores de concentración medidos en los explantes cultivados. Por otra parte, conviene recordar que en nuestros cultivos no realizamos ensayos de sensibilidad a la inhibición de la síntesis de corticoides, ni se midió el aumento de niveles (es decir, la producción) de corticosterona en los explantes durante el cultivo, por lo que desconocemos la influencia de la corticosterona circulante. No obstante, es improbable que ésta haya alterado sustancialmente los resultados, dado que la capacidad de síntesis por parte del intestino ha sido previamente establecida, y los niveles de corticosterona circulante no se vieron modificados en ningún caso, mientras que los niveles intestinales aumentaron considerablemente en los explantes correspondientes a la colitis de 7 días. El efecto antiinflamatorio puede

achacarse en cambio a las acciones moduladoras del tráfico leucocitario, que están asociadas a un aumento espectacular del tamaño del bazo y a la disminución de los neutrófilos y monocitos circulantes. Esta hipótesis es altamente especulativa desde luego, basada en datos sólidos pero incompletos hasta el momento, y requerirá confirmación posterior. Es probable que la disminución de la sepsis redunde asimismo en la recuperación del peso en los dos últimos días de la colitis, así como en la disminución de los niveles de IL6.

Por las razones expuestas anteriormente, tenemos un gran interés en dilucidar el papel del receptor GR epitelial en los efectos de la budesonida en el intestino, por lo cual se incluyeron grupos de tratamiento con el corticoide en ambos experimentos de colitis por DSS. La dosis utilizada, 6  $\mu$ g, corresponde a un punto intermedio de la curva dosis-respuesta caracterizada anteriormente por nosotros en este modelo, y presenta simultáneamente los efectos terapéuticos (antiinflamatorios) y perjudiciales (sepsis, pérdida de peso), como se ha comentado anteriormente. En los experimentos recogidos en la presente Tesis Doctoral los dos efectos se vieron corroborados, aunque el efecto antiinflamatorio fue algo menor del esperado, pero aún así claramente establecido (peso/longitud del colon, mieloperoxidasa, S100A9, citoquinas plasmáticas). De acuerdo con lo esperado, no hubo ningún efecto de la budesonida sobre la expresión de claudina 2/4, sobre la fosfatasa alcalina o sobre el S100A9 epitelial. Por otra parte, los animales WT tratados con el corticoide experimentaron una pérdida sostenida de peso corporal (25%), acompañada de un deterioro visible en el estado general de los animales. Los niveles de nitratos/nitritos fueron marginalmente mayores que en los ratones no tratados, pero sin llegar a alcanzar la significación estadística, por lo que no está claro hasta qué punto se produce sepsis en este caso. Es importante recordar que otros marcadores de sepsis, como el descenso de temperatura, el aumento de mieloperoxidasa en pulmón, o el incremento de los niveles de LPS en hígado, son relativamente poco sensibles y no se ven afectados por esta dosis de budesonida (cita), razón por la cual no se midieron en este estudio. El efecto más notable de la ausencia de GR en IECs fue la supresión de la pérdida de peso achacable a la budesonida, de forma que la evolución de pesos fue muy similar a la de los ratones GR<sup>ΔIEC</sup> no tratados, excepto los dos últimos días, en los que se produjo la recuperación parcial de éstos últimos. Aunque los niveles de nitratos/nitritos plasmáticos fueron menores en conjunto en los ratones GR<sup>ΔIEC</sup>, la relación con una posible sepsis no está del todo clara. Del mismo modo, la permeabilidad a FITC-dextrano 4 kD fue marginalmente menor en los ratones GR<sup>ΔIEC</sup>, pero es difícil explicar un efecto protector tan contundente a partir de cambios sutiles de permeabilidad. Existe una correlación más estrecha con



los marcadores de proliferación (cMyc, ciclina D1), cuyos niveles están disminuidos en los animales WT tratados con budesonida, pero no en los GR<sup>ΔIEC</sup>.

Por otra parte, la presencia de sangre en heces fue casi totalmente suprimida por la budesonida en los ratones GR<sup>ΔIEC</sup>, pero no en los WT. Este dato no se correlaciona con los datos hematológicos, que apuntan por el contrario a una anemia aún más pronunciada en estos animales, que presentan los valores más bajos de eritrocitos, hemoglobina y hematocrito de todo el estudio. Al igual que en el caso de los ratones no colíticos, estos resultados sugieren un hemorragia contenida en la propia mucosa, presumiblemente achacable a las propiedades antiangiogénicas del corticoide. Esta hipótesis es coherente con la potenciación de la hemorragia colónica en los ratones GR<sup>ΔIEC</sup> tras sólo un día de tratamiento. El hecho de que la filtración al lumen de la sangre disminuya drásticamente a los 7 días de la colitis se explica probablemente por las acciones antiinflamatorias de la budesonida, pero los detalles deberán ser clarificados en futuros estudios.

En resumen, la supresión de la expresión del receptor de glucocorticoides en el epitelio intestinal tiene múltiples efectos biológicos, que incluyen: (1) efecto inflamatorio autolimitante en la mucosa intestinal; (2) modulación del tráfico leucocitario a nivel sistémico; (3) aumento de la proliferación epitelial; (4) hemorragia interna, presumiblemente mucosal; (5) protección frente a la colitis; e (6) inhibición el eje HAA. Los mecanismos responsables de estos efectos deberán ser identificados en futuros estudios.

# CONCLUSIONES



1. La delección del GR en las células epiteliales intestinales es estable y conduce a una respuesta inflamatoria moderada en el colon atribuible a la secreción de mediadores proinflamatorios por los enterocitos mostrando dependencia temporal.

2. La delección del GR incrementa la proliferación de células epiteliales intestinales sin afectar de manera sustancial al equilibrio entre los distintos tipos celulares.

3. Los ratones con delección epitelial de GR muestran signos de pérdida de sangre que se atribuyen a una hemorragia intramucosal que se potencia por la colitis experimental con DSS.

4. La delección epitelial intestinal de GR empeora en gran manera la respuesta inflamatoria inicial al DSS, pero tiene un papel protector en etapas tardías debido tanto a una modulación en el tráfico de leucocitos como a una sepsis atenuada.

5. El eje HHA parece estar inhibido en los ratones GR<sup>IEC</sup> por mecanismos aún desconocidos. Este inesperado hallazgo requiere estudios adicionales y puede estar implicado en los efectos a nivel colónico.

6. La producción de corticosterona intestinal está potenciada en la colitis por DSS pero no se afecta en los ratones GR<sup>IEC</sup> pese a la evidencia de un mecanismo de *feedback* negativo por parte del GR sobre la expresión de LRH1, de acuerdo al aumento de la expresión en ausencia del receptor.

7. Los efectos perjudiciales de la budesonida en la colitis inducida por DSS están mediados por el GR epitelial intestinal. La protección puede deberse a que los efectos antiproliferativos de la budesonida en el epitelio no tienen lugar.



# CONCLUSIONS



1. Genetic deletion of the GR in intestinal epithelial cells is stable and results in a moderate inflammatory response in the colon which is attributed to the secretion of proinflammatory mediators by the enterocytes and exhibits time-dependent effects.
2. GR deletion increases epithelial proliferation without affecting substantially the balance between the different epithelial lineages.
3. Mice with epithelial GR deletion exhibit signs of blood loss which are attributed to intramucosal hemorrhage, and which is enhanced by experimental DSS colitis.
4. Intestinal epithelial GR deletion greatly worsens the initial inflammatory response to DSS, but it has protective effects in later stages, which are attributed to the modulation of leukocyte trafficking, as well as to attenuated sepsis.
5. The HPA axis appears to be downregulated in GR<sup>AIEC</sup> mice by unknown mechanisms. This surprising outcome requires confirmation in additional studies and may be involved in the effects at the colonic level.
6. The intestinal production of corticosterone is upregulated in DSS colitis but is largely unaffected in GR<sup>AIEC</sup> despite evidence of an epithelial GR negative feedback mechanism regulating LRH1 expression, according to the increased expression in the absence of the receptor.
7. The harmful effects of budesonide in DSS colitis are mediated by the epithelial GR receptor. Protection may be related to avoidance of budesonide antiproliferative effects on the epithelium.





# BIBLIOGRAFÍA



1. Addison, T., *On the constitutional and local effects of disease of the suprarenal capsule*, in *A collection of the published writings of the late Thomas Addison MD*. 1868: London : the New Sydenham Society.
2. Laryea, G., et al., *Dissection of glucocorticoid receptor-mediated inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by gene targeting in mice*. *Front Neuroendocrinol*, 2015. **36C**: p. 150-164.
3. Turnbull, A.V. and C.L. Rivier, *Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action*. *Physiol Rev*, 1999. **79**(1): p. 1-71.
4. Bornstein, S.R., et al., *Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human adrenals*. *Horm Metab Res*, 2004. **36**(7): p. 470-3.
5. Bornstein, S.R., et al., *The role of toll-like receptors in the immune-adrenal crosstalk*. *Ann N Y Acad Sci*, 2006. **1088**: p. 307-18.
6. Wieck, A., et al., *Differential neuroendocrine and immune responses to acute psychosocial stress in women with type 1 bipolar disorder*. *Brain Behav Immun*, 2013. **34**: p. 47-55.
7. Steigbigel, N.H., *Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock*. *Curr Infect Dis Rep*, 2003. **5**(5): p. 363-364.
8. Chatterjee, S., et al., *Synergistic therapeutic potential of dexamethasone and L-arginine in lipopolysaccharide-induced septic shock*. *J Surg Res*, 2007. **140**(1): p. 99-108.
9. Krakauer, T. and M. Buckley, *Dexamethasone attenuates staphylococcal enterotoxin B-induced hypothermic response and protects mice from superantigen-induced toxic shock*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006. **50**(1): p. 391-5.
10. Medzhitov, R., *Septic shock: on the importance of being tolerant*. *Immunity*, 2013. **39**(5): p. 799-800.
11. Bornstein, S.R. and J. Briegel, *A new role for glucocorticoids in septic shock: balancing the immune response*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003. **167**(4): p. 485-6.
12. Chrousos, G.P., *Stress and disorders of the stress system*. *Nat Rev Endocrinol*, 2009. **5**(7): p. 374-81.
13. Mayer, E.A., et al., *V. Stress and irritable bowel syndrome*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001. **280**(4): p. G519-24.
14. Anagnostis, P., et al., *11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitors: novel agents for the treatment of metabolic syndrome and obesity-related disorders?* *Metabolism*, 2013. **62**(1): p. 21-33.
15. Bujalska, I.J., S. Kumar, and P.M. Stewart, *Does central obesity reflect "Cushing's disease of the omentum"?* *Lancet*, 1997. **349**(9060): p. 1210-3.
16. Tomlinson, J.W., et al., *Inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity in vivo limits glucocorticoid exposure to human adipose tissue and decreases lipolysis*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007. **92**(3): p. 857-64.

17. Tomlinson, J.W., et al., *Weight loss increases 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression in human adipose tissue*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(6): p. 2711-6.
18. Feig, P.U., et al., *Effects of an 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor, MK-0916, in patients with type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome*. Diabetes Obes Metab, 2011. **13**(6): p. 498-504.
19. Tomlinson, J.W., et al., *11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a tissue-specific regulator of glucocorticoid response*. Endocr Rev, 2004. **25**(5): p. 831-66.
20. Chapman, K., M. Holmes, and J. Seckl, *11beta-hydroxysteroid dehydrogenases: intracellular gate-keepers of tissue glucocorticoid action*. Physiol Rev, 2013. **93**(3): p. 1139-206.
21. Edwards, C.R., et al., *Localisation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase--tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor*. Lancet, 1988. **2**(8618): p. 986-9.
22. Whorwood, C.B., M.L. Ricketts, and P.M. Stewart, *Epithelial cell localization of type 2 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in rat and human colon*. Endocrinology, 1994. **135**(6): p. 2533-41.
23. Fukushima, K., et al., *Aldosterone enhances 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in colonic epithelial cells in vivo*. Scand J Gastroenterol, 2005. **40**(7): p. 850-7.
24. Zbankova, S., et al., *11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 and 2 expression in colon from patients with ulcerative colitis*. J Gastroenterol Hepatol, 2007. **22**(7): p. 1019-23.
25. Hammond, G.L., et al., *Primary structure of human corticosteroid binding globulin, deduced from hepatic and pulmonary cDNAs, exhibits homology with serine protease inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(15): p. 5153-7.
26. Mendel, C.M., *The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model*. Endocr Rev, 1989. **10**(3): p. 232-74.
27. Pemberton, P.A., et al., *Hormone binding globulins undergo serpin conformational change in inflammation*. Nature, 1988. **336**(6196): p. 257-8.
28. Singer, C.J., M.S. Khan, and W. Rosner, *Characteristics of the binding of corticosteroid-binding globulin to rat cell membranes*. Endocrinology, 1988. **122**(1): p. 89-96.
29. Strel'chyonok, O.A. and G.V. Avvakumov, *Interaction of human CBG with cell membranes*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1991. **40**(4-6): p. 795-803.
30. Jitrapakdee, S., *Transcription factors and coactivators controlling nutrient and hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis*. Int J Biochem Cell Biol, 2012. **44**(1): p. 33-45.
31. Hwang, J.L. and R.E. Weiss, *Steroid-induced diabetes: a clinical and molecular approach to understanding and treatment*. Diabetes Metab Res Rev, 2014. **30**(2): p. 96-102.
32. Lee, M.J., et al., *Deconstructing the roles of glucocorticoids in adipose tissue biology and the development of central obesity*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1842**(3): p. 473-81.

33. Geer, E.B., J. Islam, and C. Buettner, *Mechanisms of glucocorticoid-induced insulin resistance: focus on adipose tissue function and lipid metabolism*. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2014. **43**(1): p. 75-102.
34. Pimenta, E., M. Wolley, and M. Stowasser, *Adverse cardiovascular outcomes of corticosteroid excess*. *Endocrinology*, 2012. **153**(11): p. 5137-42.
35. Fardet, L., I. Petersen, and I. Nazareth, *Risk of cardiovascular events in people prescribed glucocorticoids with iatrogenic Cushing's syndrome: cohort study*. *BMJ*, 2012. **345**: p. e4928.
36. Johannsson, G. and O. Ragnarsson, *Cardiovascular and metabolic impact of glucocorticoid replacement therapy*. *Front Horm Res*, 2014. **43**: p. 33-44.
37. Nussinovitch, U., et al., *Glucocorticoids and the cardiovascular system: state of the art*. *Curr Pharm Des*, 2010. **16**(32): p. 3574-85.
38. Hanaoka, B.Y., et al., *Implications of glucocorticoid therapy in idiopathic inflammatory myopathies*. *Nat Rev Rheumatol*, 2012. **8**(8): p. 448-57.
39. Kuo, T., et al., *Genome-wide analysis of glucocorticoid receptor-binding sites in myotubes identifies gene networks modulating insulin signaling*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(28): p. 11160-5.
40. Larsson, L., et al., *Acute quadriplegia and loss of muscle myosin in patients treated with nondepolarizing neuromuscular blocking agents and corticosteroids: mechanisms at the cellular and molecular levels*. *Crit Care Med*, 2000. **28**(1): p. 34-45.
41. Hanaoka, B.Y., C.A. Peterson, and L.J. Crofford, *Glucocorticoid effects on skeletal muscle: benefit and risk in patients with autoimmune inflammatory rheumatoid diseases*. *Expert Rev Clin Immunol*, 2012. **8**(8): p. 695-7.
42. Goldstein, M.F., J.J. Fallon, Jr., and R. Harning, *Chronic glucocorticoid therapy-induced osteoporosis in patients with obstructive lung disease*. *Chest*, 1999. **116**(6): p. 1733-49.
43. Pearce, G., et al., *The deleterious effects of low-dose corticosteroids on bone density in patients with polymyalgia rheumatica*. *Br J Rheumatol*, 1998. **37**(3): p. 292-9.
44. Silva, E.J., et al., *Innate immunity and glucocorticoids: potential regulatory mechanisms in epididymal biology*. *J Androl*, 2011. **32**(6): p. 614-24.
45. Moisiadis, V.G. and S.G. Matthews, *Glucocorticoids and fetal programming part 2: Mechanisms*. *Nat Rev Endocrinol*, 2014. **10**(7): p. 403-11.
46. Harris, A. and J. Seckl, *Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease*. *Horm Behav*, 2011. **59**(3): p. 279-89.
47. Manwani, N., et al., *Reduced viability of mice with lung epithelial-specific knockout of glucocorticoid receptor*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2010. **43**(5): p. 599-606.
48. Sevilla, L.M., et al., *Epidermal inactivation of the glucocorticoid receptor triggers skin barrier defects and cutaneous inflammation*. *J Invest Dermatol*, 2013. **133**(2): p. 361-70.
49. Hostettler, N., et al., *Local glucocorticoid production in the mouse lung is induced by immune cell stimulation*. *Allergy*, 2012. **67**(2): p. 227-34.

50. Gomez-Sanchez, E.P., et al., *Aldosterone synthesis in the brain contributes to Dahl salt-sensitive rat hypertension*. *Exp Physiol*, 2010. **95**(1): p. 120-30.
51. Ohtani, T., et al., *Elevated cardiac tissue level of aldosterone and mineralocorticoid receptor in diastolic heart failure: Beneficial effects of mineralocorticoid receptor blocker*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2007. **292**(2): p. R946-54.
52. Croft, A.P., et al., *Effects of minor laboratory procedures, adrenalectomy, social defeat or acute alcohol on regional brain concentrations of corticosterone*. *Brain Res*, 2008. **1238**: p. 12-22.
53. Taves, M.D., et al., *Steroid concentrations in plasma, whole blood and brain: effects of saline perfusion to remove blood contamination from brain*. *PLoS One*, 2010. **5**(12): p. e15727.
54. Pazirandeh, A., et al., *Paracrine glucocorticoid activity produced by mouse thymic epithelial cells*. *FASEB J*, 1999. **13**(8): p. 893-901.
55. Vacchio, M.S., V. Papadopoulos, and J.D. Ashwell, *Steroid production in the thymus: implications for thymocyte selection*. *J Exp Med*, 1994. **179**(6): p. 1835-46.
56. Slominski, A., et al., *A novel pathway for sequential transformation of 7-dehydrocholesterol and expression of the P450scc system in mammalian skin*. *Eur J Biochem*, 2004. **271**(21): p. 4178-88.
57. Cirillo, N. and S.S. Prime, *Keratinocytes synthesize and activate cortisol*. *J Cell Biochem*, 2011. **112**(6): p. 1499-505.
58. Hannen, R.F., et al., *Steroid synthesis by primary human keratinocytes; implications for skin disease*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. **404**(1): p. 62-7.
59. Zmijewski, M.A. and A.T. Slominski, *Neuroendocrinology of the skin: An overview and selective analysis*. *Dermatoendocrinol*, 2011. **3**(1): p. 3-10.
60. Vukelic, S., et al., *Cortisol synthesis in epidermis is induced by IL-1 and tissue injury*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(12): p. 10265-75.
61. Keeney, D.S., C.M. Jenkins, and M.R. Waterman, *Developmentally regulated expression of adrenal 17 alpha-hydroxylase cytochrome P450 in the mouse embryo*. *Endocrinology*, 1995. **136**(11): p. 4872-9.
62. Cima, I., et al., *Intestinal epithelial cells synthesize glucocorticoids and regulate T cell activation*. *J Exp Med*, 2004. **200**(12): p. 1635-46.
63. Atanasov, A.G., et al., *Cell cycle-dependent regulation of extra-adrenal glucocorticoid synthesis in murine intestinal epithelial cells*. *FASEB J*, 2008. **22**(12): p. 4117-25.
64. Mueller, M., et al., *The nuclear receptor LRH-1 critically regulates extra-adrenal glucocorticoid synthesis in the intestine*. *J Exp Med*, 2006. **203**(9): p. 2057-62.
65. Noti, M., et al., *Lipopolysaccharide induces intestinal glucocorticoid synthesis in a TNFalpha-dependent manner*. *FASEB J*, 2010. **24**(5): p. 1340-6.
66. Noti, M., et al., *TNF suppresses acute intestinal inflammation by inducing local glucocorticoid synthesis*. *J Exp Med*, 2010. **207**(5): p. 1057-66.

67. Mueller, M., et al., *Differential regulation of glucocorticoid synthesis in murine intestinal epithelial versus adrenocortical cell lines*. *Endocrinology*, 2007. **148**(3): p. 1445-53.
68. Val, P., et al., *SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues*. *Nucl Recept*, 2003. **1**(1): p. 8.
69. Fayard, E., J. Auwerx, and K. Schoonjans, *LRH-1: an orphan nuclear receptor involved in development, metabolism and steroidogenesis*. *Trends Cell Biol*, 2004. **14**(5): p. 250-60.
70. Brunner, T., et al., *Regulation of cell death and survival in intestinal intraepithelial lymphocytes*. *Cell Death Differ*, 2001. **8**(7): p. 706-14.
71. Botrugno, O.A., et al., *Synergy between LRH-1 and beta-catenin induces G1 cyclin-mediated cell proliferation*. *Mol Cell*, 2004. **15**(4): p. 499-509.
72. Oakley, R.H. and J.A. Cidlowski, *Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(5): p. 3177-84.
73. Lewis-Tuffin, L.J., et al., *Human glucocorticoid receptor beta binds RU-486 and is transcriptionally active*. *Mol Cell Biol*, 2007. **27**(6): p. 2266-82.
74. Kino, T., Y.A. Su, and G.P. Chrousos, *Human glucocorticoid receptor isoform beta: recent understanding of its potential implications in physiology and pathophysiology*. *Cell Mol Life Sci*, 2009. **66**(21): p. 3435-48.
75. Heck, S., et al., *A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription factor AP-1*. *EMBO J*, 1994. **13**(17): p. 4087-95.
76. Hakim, A., et al., *Importin-7 mediates glucocorticoid receptor nuclear import and is impaired by oxidative stress, leading to glucocorticoid insensitivity*. *FASEB J*, 2013. **27**(11): p. 4510-9.
77. Fant, M.E., J. Yeakley, and R.W. Harrison, *Evidence for carrier-mediated transport of glucocorticoids by human placental membrane vesicles*. *Biochim Biophys Acta*, 1983. **731**(3): p. 415-20.
78. Pratt, W.B., et al., *Chaperoning of glucocorticoid receptors*. *Handb Exp Pharmacol*, 2006(172): p. 111-38.
79. Tsai, S.Y., et al., *Molecular interactions of steroid hormone receptor with its enhancer element: evidence for receptor dimer formation*. *Cell*, 1988. **55**(2): p. 361-9.
80. Kadmiel, M. and J.A. Cidlowski, *Glucocorticoid receptor signaling in health and disease*. *Trends Pharmacol Sci*, 2013. **34**(9): p. 518-30.
81. Nixon, M., R. Andrew, and K.E. Chapman, *It takes two to tango: dimerisation of glucocorticoid receptor and its anti-inflammatory functions*. *Steroids*, 2013. **78**(1): p. 59-68.
82. Malkoski, S.P. and R.I. Dorin, *Composite glucocorticoid regulation at a functionally defined negative glucocorticoid response element of the human corticotropin-releasing hormone gene*. *Mol Endocrinol*, 1999. **13**(10): p. 1629-44.



83. Ray, A. and K.E. Prefontaine, *Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(2): p. 752-6.
84. De Bosscher, K., et al., *Glucocorticoid-mediated repression of nuclear factor-kappaB-dependent transcription involves direct interference with transactivation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(25): p. 13504-9.
85. Langlais, D., et al., *The Stat3/GR interaction code: predictive value of direct/indirect DNA recruitment for transcription outcome*. Mol Cell, 2012. **47**(1): p. 38-49.
86. Jonat, C., et al., *Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone*. Cell, 1990. **62**(6): p. 1189-204.
87. Schule, R., et al., *Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor*. Cell, 1990. **62**(6): p. 1217-26.
88. Tasker, J.G., S. Di, and R. Malcher-Lopes, *Minireview: Rapid Glucocorticoid Signaling via Membrane-Associated Receptors*. Endocrinology, 2006. **147**(12): p. 5549-5556.
89. Wang, C., Y. Liu, and J.-M. Cao, *G Protein-Coupled Receptors: Extranuclear Mediators for the Non-Genomic Actions of Steroids*. International Journal of Molecular Sciences, 2014. **15**(9): p. 15412-15425.
90. Ayroldi, E., et al., *Mechanisms of the anti-inflammatory effects of glucocorticoids: genomic and nongenomic interference with MAPK signaling pathways*. FASEB J, 2012. **26**(12): p. 4805-20.
91. Busillo, J.M. and J.A. Cidlowski, *The five Rs of glucocorticoid action during inflammation: ready, reinforce, repress, resolve, and restore*. Trends Endocrinol Metab, 2013. **24**(3): p. 109-19.
92. Savory, J.G., et al., *Glucocorticoid receptor homodimers and glucocorticoid-mineralocorticoid receptor heterodimers form in the cytoplasm through alternative dimerization interfaces*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(3): p. 781-93.
93. Trapp, T., et al., *Heterodimerization between mineralocorticoid and glucocorticoid receptor: a new principle of glucocorticoid action in the CNS*. Neuron, 1994. **13**(6): p. 1457-62.
94. Liu, W., et al., *Steroid receptor heterodimerization demonstrated in vitro and in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(26): p. 12480-4.
95. Pepin, M.C., F. Pothier, and N. Barden, *Impaired type II glucocorticoid-receptor function in mice bearing antisense RNA transgene*. Nature, 1992. **355**(6362): p. 725-8.
96. Cole, T.J., et al., *Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation*. Genes Dev, 1995. **9**(13): p. 1608-21.
97. Bouabe, H. and K. Okkenhaug, *Gene targeting in mice: a review*. Methods Mol Biol, 2013. **1064**: p. 315-36.
98. Li, A., et al., *Deletion of mesenchymal glucocorticoid receptor attenuates embryonic lung development and abdominal wall closure*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e63578.

99. Habermehl, D., et al., *Glucocorticoid activity during lung maturation is essential in mesenchymal and less in alveolar epithelial cells*. *Mol Endocrinol*, 2011. **25**(8): p. 1280-8.
100. Goodwin, J.E., et al., *The glucocorticoid receptor in the distal nephron is not necessary for the development or maintenance of dexamethasone-induced hypertension*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. **394**(2): p. 266-71.
101. Goodwin, J.E., et al., *Knockout of the vascular endothelial glucocorticoid receptor abrogates dexamethasone-induced hypertension*. *J Hypertens*, 2011. **29**(7): p. 1347-56.
102. Sainte-Marie, Y., et al., *Conditional glucocorticoid receptor expression in the heart induces atrio-ventricular block*. *FASEB J*, 2007. **21**(12): p. 3133-41.
103. Watson, M.L., et al., *A cell-autonomous role for the glucocorticoid receptor in skeletal muscle atrophy induced by systemic glucocorticoid exposure*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2012. **302**(10): p. E1210-20.
104. Rauch, A., et al., *Glucocorticoids suppress bone formation by attenuating osteoblast differentiation via the monomeric glucocorticoid receptor*. *Cell Metab*, 2010. **11**(6): p. 517-31.
105. Preusch, M.R., et al., *Critical role of macrophages in glucocorticoid driven vascular calcification in a mouse-model of atherosclerosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. **28**(12): p. 2158-64.
106. Baschant, U., et al., *Glucocorticoid therapy of antigen-induced arthritis depends on the dimerized glucocorticoid receptor in T cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(48): p. 19317-22.
107. Rose, A.J., et al., *Molecular control of systemic bile acid homeostasis by the liver glucocorticoid receptor*. *Cell Metab*, 2011. **14**(1): p. 123-30.
108. Gesina, E., et al., *Dissecting the role of glucocorticoids on pancreas development*. *Diabetes*, 2004. **53**(9): p. 2322-9.
109. Mueller, K.M., et al., *Adipocyte Glucocorticoid Receptor Deficiency Attenuates Aging- and Hfd-Induced Obesity, and Impairs the Feeding-Fasting Transition*. *Diabetes*, 2016.
110. Sevilla, L.M., et al., *Glucocorticoid receptor and Klf4 co-regulate anti-inflammatory genes in keratinocytes*. *Mol Cell Endocrinol*, 2015.
111. Sanchis, A., et al., *Keratinocyte-targeted overexpression of the glucocorticoid receptor delays cutaneous wound healing*. *PLoS One*, 2012. **7**(1): p. e29701.
112. Reichardt, S.D., et al., *Glucocorticoids enhance intestinal glucose uptake via the dimerized glucocorticoid receptor in enterocytes*. *Endocrinology*, 2012. **153**(4): p. 1783-94.
113. Reichardt, S.D., et al., *Glucocorticoids induce gastroparesis in mice through depletion of l-arginine*. *Endocrinology*, 2014. **155**(10): p. 3899-908.
114. Baumgart, D.C. and S.R. Carding, *Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology*. *Lancet*, 2007. **369**(9573): p. 1627-40.
115. Kelly, J.K. and T.O. Siu, *The strictures, sinuses, and fissures of Crohn's disease*. *J Clin Gastroenterol*, 1986. **8**(5): p. 594-8.

116. Lohsiriwat, V. and S.K. Clark, *Persistent perineal sinus after ileoanal pouch excision in inflammatory bowel diseases: incidence, risk factors, and clinical course*. Dis Colon Rectum, 2008. **51**(12): p. 1795-9.
117. Cheung, O. and M.D. Regueiro, *Inflammatory bowel disease emergencies*. Gastroenterol Clin North Am, 2003. **32**(4): p. 1269-88.
118. Brahme, F. and C. Lindstrom, *A comparative radiographic and pathological study of intestinal vaso-architecture in Crohn's disease and in ulcerative colitis*. Gut, 1970. **11**(11): p. 928-40.
119. Bolondi, L., et al., *Changes in splanchnic hemodynamics in inflammatory bowel disease. Non-invasive assessment by Doppler ultrasound flowmetry*. Scand J Gastroenterol, 1992. **27**(6): p. 501-7.
120. Lott, M.F. and J.D. Davies, *Lymph node hypervascularity: haemangiomatoid lesions and pan-nodal vasodilatation*. J Pathol, 1983. **140**(3): p. 209-19.
121. Mortensen, N., *Fulminant acute and diffuse chronic ulcerative colitis--the argument for surgery*. Acta Gastroenterol Belg, 2000. **63**(3): p. 289.
122. Wong, C.K. and B.R. Yacyshyn, *Fulminant Ulcerative Colitis*. Curr Treat Options Gastroenterol, 2000. **3**(3): p. 217-226.
123. Geboes, K., et al., *Indeterminate colitis: a review of the concept--what's in a name?* Inflamm Bowel Dis, 2008. **14**(6): p. 850-7.
124. Rose, J.D., et al., *Cardiff Crohn's disease jubilee: the incidence over 50 years*. Gut, 1988. **29**(3): p. 346-51.
125. Garland, C.F., et al., *Incidence rates of ulcerative colitis and Crohn's disease in fifteen areas of the United States*. Gastroenterology, 1981. **81**(6): p. 1115-24.
126. Bonnevie, O., *A socio-economic study of patients with ulcerative colitis*. Scand J Gastroenterol, 1967. **2**(2): p. 129-36.
127. Gent, A.E., et al., *Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy*. Lancet, 1994. **343**(8900): p. 766-7.
128. Kull, K., et al., *Antineutrophil cytoplasmic antibodies in Estonian patients with inflammatory bowel disease. Prevalence and diagnostic role*. Hepatogastroenterology, 1998. **45**(24): p. 2132-7.
129. Ihasz, M., et al., *Surgical relations of Crohn's disease and the frequency of recurrence*. Acta Chir Hung, 1995. **35**(1-2): p. 63-75.
130. Sonnenberg, A., *Date of birth in the occurrence of inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 2009. **15**(2): p. 206-11.
131. Kugathasan, S., et al., *Epidemiologic and clinical characteristics of children with newly diagnosed inflammatory bowel disease in Wisconsin: a statewide population-based study*. J Pediatr, 2003. **143**(4): p. 525-31.
132. Ekblom, A., et al., *The epidemiology of inflammatory bowel disease: a large, population-based study in Sweden*. Gastroenterology, 1991. **100**(2): p. 350-8.
133. Karlinger, K., et al., *The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease*. Eur J Radiol, 2000. **35**(3): p. 154-67.
134. Segal, I., et al., *The rarity of ulcerative colitis in South African blacks*. Am J Gastroenterol, 1980. **74**(4): p. 332-6.

135. Roth, M.P., et al., *Geographic origins of Jewish patients with inflammatory bowel disease*. Gastroenterology, 1989. **97**(4): p. 900-4.
136. Zhang, W., et al., *Extended haplotype association study in Crohn's disease identifies a novel, Ashkenazi Jewish-specific missense mutation in the NF-kappaB pathway gene, HEATR3*. Genes Immun, 2013. **14**(5): p. 310-6.
137. Kenny, E.E., et al., *A genome-wide scan of Ashkenazi Jewish Crohn's disease suggests novel susceptibility loci*. PLoS Genet, 2012. **8**(3): p. e1002559.
138. El-Tawil, A.M., *Jews and inflammatory bowel disease*. J Gastrointestin Liver Dis, 2009. **18**(2): p. 137-8.
139. Chiodini, R.J., et al., *Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease. I. An unclassified Mycobacterium species isolated from patients with Crohn's disease*. Dig Dis Sci, 1984. **29**(12): p. 1073-9.
140. Miranda-Bautista, J., et al., *Listeria monocytogenes infection in inflammatory bowel disease patients: case series and review of the literature*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2014. **26**(11): p. 1247-52.
141. Parent, K. and P. Mitchell, *Cell wall-defective variants of pseudomonas-like (group Va) bacteria in Crohn's disease*. Gastroenterology, 1978. **75**(3): p. 368-72.
142. Kangro, H.O., et al., *A prospective study of viral and mycoplasma infections in chronic inflammatory bowel disease*. Gastroenterology, 1990. **98**(3): p. 549-53.
143. Momotani, E., et al., *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis lipophilic antigen causes Crohn's disease-type necrotizing colitis in Mice*. Springerplus, 2012. **1**(1): p. 47.
144. Burke, D.A. and A.T. Axon, *Adhesive Escherichia coli in inflammatory bowel disease and infective diarrhoea*. BMJ, 1988. **297**(6641): p. 102-4.
145. Ohkusa, T., et al., *Fusobacterium varium localized in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis stimulates species-specific antibody*. J Gastroenterol Hepatol, 2002. **17**(8): p. 849-53.
146. Darfeuille-Michaud, A., et al., *Presence of adherent Escherichia coli strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease*. Gastroenterology, 1998. **115**(6): p. 1405-13.
147. Negroni, A., et al., *Characterization of adherent-invasive Escherichia coli isolated from pediatric patients with inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 2012. **18**(5): p. 913-24.
148. Higgins, P.D., et al., *Prior Helicobacter pylori infection ameliorates Salmonella typhimurium-induced colitis: mucosal crosstalk between stomach and distal intestine*. Inflamm Bowel Dis, 2011. **17**(6): p. 1398-408.
149. Fukuda, Y., et al., *Helicobacter pylori infection increases mucosal permeability of the stomach and intestine*. Digestion, 2001. **63 Suppl 1**: p. 93-6.
150. Kirsner, J.B. and J.A. Spencer, *Family Occurrences of Ulcerative Colitis, Regional Enteritis, and Ileocolitis*. Ann Intern Med, 1963. **59**: p. 133-44.
151. Saro Gismera, C., et al., *[Epidemiology of chronic inflammatory bowel disease in Gijon, Asturias]*. Gastroenterol Hepatol, 2001. **24**(5): p. 228-35.

152. Weterman, I.T. and A.S. Pena, *Familial incidence of Crohn's disease in The Netherlands and a review of the literature*. *Gastroenterology*, 1984. **86**(3): p. 449-52.
153. McConnell, R.B., *Ulcerative colitis--genetic features*. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 1983. **88**: p. 14-6.
154. Tysk, C., et al., *Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking*. *Gut*, 1988. **29**(7): p. 990-6.
155. Halfvarson, J., et al., *Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics*. *Gastroenterology*, 2003. **124**(7): p. 1767-73.
156. Thompson, N.P., et al., *Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study*. *BMJ*, 1996. **312**(7023): p. 95-6.
157. Franke, A., et al., *Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci*. *Nat Genet*, 2010. **42**(12): p. 1118-25.
158. Ohmen, J.D., et al., *Susceptibility locus for inflammatory bowel disease on chromosome 16 has a role in Crohn's disease, but not in ulcerative colitis*. *Hum Mol Genet*, 1996. **5**(10): p. 1679-83.
159. Economou, M., et al., *Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis*. *Am J Gastroenterol*, 2004. **99**(12): p. 2393-404.
160. Fernandez, L., et al., *IBD1 and IBD3 determine location of Crohn's disease in the Spanish population*. *Inflamm Bowel Dis*, 2004. **10**(6): p. 715-22.
161. Libioulle, C., et al., *Novel Crohn disease locus identified by genome-wide association maps to a gene desert on 5p13.1 and modulates expression of PTGER4*. *PLoS Genet*, 2007. **3**(4): p. e58.
162. Schmechel, S., et al., *Linking genetic susceptibility to Crohn's disease with Th17 cell function: IL-22 serum levels are increased in Crohn's disease and correlate with disease activity and IL23R genotype status*. *Inflamm Bowel Dis*, 2008. **14**(2): p. 204-12.
163. Glas, J., et al., *rs1004819 is the main disease-associated IL23R variant in German Crohn's disease patients: combined analysis of IL23R, CARD15, and OCTN1/2 variants*. *PLoS One*, 2007. **2**(9): p. e819.
164. Cox, J.H., et al., *Opposing consequences of IL-23 signaling mediated by innate and adaptive cells in chemically induced colitis in mice*. *Mucosal Immunol*, 2012. **5**(1): p. 99-109.
165. Kamada, N., et al., *Abnormally differentiated subsets of intestinal macrophage play a key role in Th1-dominant chronic colitis through excess production of IL-12 and IL-23 in response to bacteria*. *J Immunol*, 2005. **175**(10): p. 6900-8.
166. Jostins, L., et al., *Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease*. *Nature*, 2012. **491**(7422): p. 119-24.
167. Franke, A., et al., *Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility*. *Nat Genet*, 2008. **40**(11): p. 1319-23.

168. Prescott, N.J., et al., *A nonsynonymous SNP in ATG16L1 predisposes to ileal Crohn's disease and is independent of CARD15 and IBD5*. *Gastroenterology*, 2007. **132**(5): p. 1665-71.
169. Cadwell, K., et al., *A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells*. *Nature*, 2008. **456**(7219): p. 259-63.
170. Van Limbergen, J., G. Radford-Smith, and J. Satsangi, *Advances in IBD genetics*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2014. **11**(6): p. 372-85.
171. Liang, J., S.M. Sha, and K.C. Wu, *Role of the intestinal microbiota and fecal transplantation in inflammatory bowel diseases*. *J Dig Dis*, 2014. **15**(12): p. 641-6.
172. Machiels, K., et al., *A decrease of the butyrate-producing species Roseburia hominis and Faecalibacterium prausnitzii defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis*. *Gut*, 2014. **63**(8): p. 1275-83.
173. Sha, S., et al., *The biodiversity and composition of the dominant fecal microbiota in patients with inflammatory bowel disease*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2013. **75**(3): p. 245-51.
174. Swidsinski, A., et al., *Mucosal flora in inflammatory bowel disease*. *Gastroenterology*, 2002. **122**(1): p. 44-54.
175. Swidsinski, A., et al., *Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease*. *J Clin Microbiol*, 2005. **43**(7): p. 3380-9.
176. Frank, D.N., et al., *Disease phenotype and genotype are associated with shifts in intestinal-associated microbiota in inflammatory bowel diseases*. *Inflamm Bowel Dis*, 2011. **17**(1): p. 179-84.
177. Riol-Blanco, L., et al., *IL-23 receptor regulates unconventional IL-17-producing T cells that control bacterial infections*. *J Immunol*, 2010. **184**(4): p. 1710-20.
178. Goyal, R.K. and I. Hirano, *The enteric nervous system*. *N Engl J Med*, 1996. **334**(17): p. 1106-15.
179. Rao, S.S., et al., *Psychological and physical stress induce differential effects on human colonic motility*. *Am J Gastroenterol*, 1998. **93**(6): p. 985-90.
180. Enck, P., et al., *Stress effects on gastrointestinal transit in the rat*. *Gut*, 1989. **30**(4): p. 455-9.
181. Barclay, G.R. and L.A. Turnberg, *Effect of psychological stress on salt and water transport in the human jejunum*. *Gastroenterology*, 1987. **93**(1): p. 91-7.
182. Wallon, C., et al., *Corticotropin-releasing hormone (CRH) regulates macromolecular permeability via mast cells in normal human colonic biopsies in vitro*. *Gut*, 2008. **57**(1): p. 50-8.
183. Wik, M., et al., *Corticotropin-releasing hormone antagonists possess anti-inflammatory effects in the mouse ileum*. *Gastroenterology*, 2002. **123**(2): p. 505-15.
184. Reber, S.O., et al., *Chronic intermittent psychosocial stress (social defeat/overcrowding) in mice increases the severity of an acute DSS-induced colitis and impairs regeneration*. *Endocrinology*, 2006. **147**(10): p. 4968-76.

185. Reber, S.O., et al., *Aggravation of DSS-induced colitis after chronic subordinate colony (CSC) housing is partially mediated by adrenal mechanisms*. *Stress*, 2008. **11**(3): p. 225-34.
186. Matsunaga, H., et al., *Physiological stress exacerbates murine colitis by enhancing proinflammatory cytokine expression that is dependent on IL-18*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2011. **301**(3): p. G555-64.
187. Schwarz, S.P. and E.B. Blanchard, *Evaluation of a psychological treatment for inflammatory bowel disease*. *Behav Res Ther*, 1991. **29**(2): p. 167-77.
188. Jantschek, G., et al., *Effect of psychotherapy on the course of Crohn's disease. Results of the German prospective multicenter psychotherapy treatment study on Crohn's disease. German Study Group on Psychosocial Intervention in Crohn's Disease*. *Scand J Gastroenterol*, 1998. **33**(12): p. 1289-96.
189. Keller, W., et al., *Effect of psychotherapy and relaxation on the psychosocial and somatic course of Crohn's disease: main results of the German Prospective Multicenter Psychotherapy Treatment study on Crohn's Disease*. *J Psychosom Res*, 2004. **56**(6): p. 687-96.
190. Persson, P.G., A. Ahlbom, and G. Hellers, *Diet and inflammatory bowel disease: a case-control study*. *Epidemiology*, 1992. **3**(1): p. 47-52.
191. Russel, M.G., et al., *Modern life' in the epidemiology of inflammatory bowel disease: a case-control study with special emphasis on nutritional factors*. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 1998. **10**(3): p. 243-9.
192. Shoda, R., et al., *Epidemiologic analysis of Crohn disease in Japan: increased dietary intake of n-6 polyunsaturated fatty acids and animal protein relates to the increased incidence of Crohn disease in Japan*. *Am J Clin Nutr*, 1996. **63**(5): p. 741-5.
193. Geerling, B.J., et al., *Diet as a risk factor for the development of ulcerative colitis*. *Am J Gastroenterol*, 2000. **95**(4): p. 1008-13.
194. Endres, S., et al., *Dietary supplementation with n-3 fatty acids suppresses interleukin-2 production and mononuclear cell proliferation*. *J Leukoc Biol*, 1993. **54**(6): p. 599-603.
195. Meydani, S.N., et al., *Oral (n-3) fatty acid supplementation suppresses cytokine production and lymphocyte proliferation: comparison between young and older women*. *J Nutr*, 1991. **121**(4): p. 547-55.
196. Endres, S., et al., *The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells*. *N Engl J Med*, 1989. **320**(5): p. 265-71.
197. Kim, Y.I., *Short-chain fatty acids in ulcerative colitis*. *Nutr Rev*, 1998. **56**(1 Pt 1): p. 17-24.
198. Belluzzi, A., et al., *Effect of an enteric-coated fish-oil preparation on relapses in Crohn's disease*. *N Engl J Med*, 1996. **334**(24): p. 1557-60.
199. Bergstrand, O. and G. Hellers, *Breast-feeding during infancy in patients who later develop Crohn's disease*. *Scand J Gastroenterol*, 1983. **18**(7): p. 903-6.

200. Acheson, E.D. and S.C. True Love, *Early weaning in the aetiology of ulcerative colitis. A study of feeding in infancy in cases and controls*. Br Med J, 1961. **2**(5257): p. 929-33.
201. Hennet, T., A. Weiss, and L. Borsig, *Decoding breast milk oligosaccharides*. Swiss Med Wkly, 2014. **144**: p. w13927.
202. Penttila, I.A., *Milk-derived transforming growth factor-beta and the infant immune response*. J Pediatr, 2010. **156**(2 Suppl): p. S21-5.
203. Vidal, K. and A. Donnet-Hughes, *CD14: a soluble pattern recognition receptor in milk*. Adv Exp Med Biol, 2008. **606**: p. 195-216.
204. Cleary, T.G., *Human milk protective mechanisms*. Adv Exp Med Biol, 2004. **554**: p. 145-54.
205. Bergmann, H., et al., *Probiotics in human milk and probiotic supplementation in infant nutrition: a workshop report*. Br J Nutr, 2014. **112**(7): p. 1119-28.
206. Tanabe, S., *Short peptide modules for enhancing intestinal barrier function*. Curr Pharm Des, 2012. **18**(6): p. 776-81.
207. Kotler, B.M., J.E. Kerstetter, and K.L. Insogna, *Claudins, dietary milk proteins, and intestinal barrier regulation*. Nutr Rev, 2013. **71**(1): p. 60-5.
208. Binder, J.H., et al., *Intolerance to milk in ulcerative colitis. A preliminary report*. Am J Dig Dis, 1966. **11**(11): p. 858-64.
209. Lerner, A., et al., *Serum antibodies to cow's milk proteins in pediatric inflammatory bowel disease: Crohn's disease vs. ulcerative colitis*. Acta Paediatr Scand, 1989. **78**(1): p. 81-6.
210. Harries, A.D., A. Baird, and J. Rhodes, *Non-smoking: a feature of ulcerative colitis*. Br Med J (Clin Res Ed), 1982. **284**(6317): p. 706.
211. Rampton, D.S., *Smoking and ulcerative colitis*. Lancet, 1984. **1**(8369): p. 168.
212. Srivasta, E.D., et al., *Smoking and ulcerative colitis: a community study*. Int J Colorectal Dis, 1993. **8**(2): p. 71-4.
213. Franceschi, S., et al., *Nonspecific inflammatory bowel disease and smoking*. Am J Epidemiol, 1987. **125**(3): p. 445-52.
214. Benoni, C. and A. Nilsson, *Smoking habits in patients with inflammatory bowel disease. A case-control study*. Scand J Gastroenterol, 1987. **22**(9): p. 1130-6.
215. Benoni, C. and A. Nilsson, *Smoking habits in patients with inflammatory bowel disease*. Scand J Gastroenterol, 1984. **19**(6): p. 824-30.
216. Cottone, M., et al., *Smoking habits and recurrence in Crohn's disease*. Gastroenterology, 1994. **106**(3): p. 643-8.
217. Sher, M.E., et al., *The influence of cigarette smoking on cytokine levels in patients with inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 1999. **5**(2): p. 73-8.
218. Motley, R.J., et al., *Smoking, eicosanoids and ulcerative colitis*. J Pharm Pharmacol, 1990. **42**(4): p. 288-9.
219. van Dijk, A.P., et al., *Transdermal nicotine inhibits interleukin 2 synthesis by mononuclear cells derived from healthy volunteers*. Eur J Clin Invest, 1998. **28**(8): p. 664-71.



220. Rutgeerts, P., et al., *Appendectomy protects against ulcerative colitis*. *Gastroenterology*, 1994. **106**(5): p. 1251-3.
221. Mizoguchi, A., et al., *Role of appendix in the development of inflammatory bowel disease in TCR-alpha mutant mice*. *J Exp Med*, 1996. **184**(2): p. 707-15.
222. Duggan, A.E., et al., *Appendicectomy, childhood hygiene, Helicobacter pylori status, and risk of inflammatory bowel disease: a case control study*. *Gut*, 1998. **43**(4): p. 494-8.
223. Ekbohm, A., *Appendicectomy and childhood hygiene: different sides of the same coin?* *Gut*, 1998. **43**(4): p. 451.
224. Radford-Smith, G.L., et al., *Protective role of appendicectomy on onset and severity of ulcerative colitis and Crohn's disease*. *Gut*, 2002. **51**(6): p. 808-13.
225. Cosnes, J., et al., *Effects of appendicectomy on the course of ulcerative colitis*. *Gut*, 2002. **51**(6): p. 803-7.
226. Cosnes, J., et al., *Prior appendectomy and the phenotype and course of Crohn's disease*. *World J Gastroenterol*, 2006. **12**(8): p. 1235-42.
227. Mahida, Y.R., *Microbial-gut interactions in health and disease. Epithelial cell responses*. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2004. **18**(2): p. 241-53.
228. Booth, C. and C.S. Potten, *Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells*. *J Clin Invest*, 2000. **105**(11): p. 1493-9.
229. Pacha, J., V. Lisa, and I. Miksik, *Effect of cellular differentiation on 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in the intestine*. *Steroids*, 2002. **67**(2): p. 119-26.
230. Watanabe, S., et al., *Conditioned mesenchymal stem cells produce pleiotropic gut trophic factors*. *J Gastroenterol*, 2014. **49**(2): p. 270-82.
231. Liao, Y. and B. Lonnerdal, *Beta-catenin/TCF4 transactivates miR-30e during intestinal cell differentiation*. *Cell Mol Life Sci*, 2010. **67**(17): p. 2969-78.
232. Koo, B.K., et al., *Notch signaling promotes the generation of EphrinB1-positive intestinal epithelial cells*. *Gastroenterology*, 2009. **137**(1): p. 145-55, 155 e1-3.
233. Crosnier, C., D. Stamatakis, and J. Lewis, *Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control*. *Nat Rev Genet*, 2006. **7**(5): p. 349-59.
234. Melmed, G., et al., *Human intestinal epithelial cells are broadly unresponsive to Toll-like receptor 2-dependent bacterial ligands: implications for host-microbial interactions in the gut*. *J Immunol*, 2003. **170**(3): p. 1406-15.
235. Abreu, M.T., et al., *TLR signaling at the intestinal epithelial interface*. *J Endotoxin Res*, 2003. **9**(5): p. 322-30.
236. Abreu, M.T., et al., *Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide*. *J Immunol*, 2001. **167**(3): p. 1609-16.
237. Schneeberger, E.E. and R.D. Lynch, *The tight junction: a multifunctional complex*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004. **286**(6): p. C1213-28.

238. Abreu, M.T., *Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(2): p. 131-44.
239. Hershberg, R.M., *The epithelial cell cytoskeleton and intracellular trafficking. V. Polarized compartmentalization of antigen processing and Toll-like receptor signaling in intestinal epithelial cells*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002. **283**(4): p. G833-9.
240. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 499-511.
241. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Toll-like receptor control of the adaptive immune responses*. Nat Immunol, 2004. **5**(10): p. 987-95.
242. Bocker, U., et al., *Responsiveness of intestinal epithelial cell lines to lipopolysaccharide is correlated with Toll-like receptor 4 but not Toll-like receptor 2 or CD14 expression*. Int J Colorectal Dis, 2003. **18**(1): p. 25-32.
243. Suzuki, M., T. Hisamatsu, and D.K. Podolsky, *Gamma interferon augments the intracellular pathway for lipopolysaccharide (LPS) recognition in human intestinal epithelial cells through coordinated up-regulation of LPS uptake and expression of the intracellular Toll-like receptor 4-MD-2 complex*. Infect Immun, 2003. **71**(6): p. 3503-11.
244. Abreu, M.T., et al., *TLR4 and MD-2 expression is regulated by immune-mediated signals in human intestinal epithelial cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(23): p. 20431-7.
245. Bambou, J.C., et al., *In vitro and ex vivo activation of the TLR5 signaling pathway in intestinal epithelial cells by a commensal Escherichia coli strain*. J Biol Chem, 2004. **279**(41): p. 42984-92.
246. Nandakumar, N.S., et al., *Effect of Vibrio cholerae on chemokine gene expression in HT29 cells and its modulation by Lactobacillus GG*. Scand J Immunol, 2009. **69**(3): p. 181-7.
247. Tallant, T., et al., *Flagellin acting via TLR5 is the major activator of key signaling pathways leading to NF-kappa B and proinflammatory gene program activation in intestinal epithelial cells*. BMC Microbiol, 2004. **4**: p. 33.
248. Ewaschuk, J.B., et al., *Surface expression of Toll-like receptor 9 is upregulated on intestinal epithelial cells in response to pathogenic bacterial DNA*. Infect Immun, 2007. **75**(5): p. 2572-9.
249. Akhtar, M., et al., *Bacterial DNA evokes epithelial IL-8 production by a MAPK-dependent, NF-kappaB-independent pathway*. FASEB J, 2003. **17**(10): p. 1319-21.
250. Steenholdt, C., et al., *Expression and function of toll-like receptor 8 and Tollip in colonic epithelial cells from patients with inflammatory bowel disease*. Scand J Gastroenterol, 2009. **44**(2): p. 195-204.
251. Pedersen, G., et al., *Expression of Toll-like receptor 9 and response to bacterial CpG oligodeoxynucleotides in human intestinal epithelium*. Clin Exp Immunol, 2005. **141**(2): p. 298-306.
252. Rumio, C., et al., *Degranulation of paneth cells via toll-like receptor 9*. Am J Pathol, 2004. **165**(2): p. 373-81.

253. Chuang, T. and R.J. Ulevitch, *Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells*. *Biochim Biophys Acta*, 2001. **1518**(1-2): p. 157-61.
254. Jijon, H.B., et al., *MAP kinases contribute to IL-8 secretion by intestinal epithelial cells via a posttranscriptional mechanism*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002. **283**(1): p. C31-41.
255. Haller, D., et al., *IKK beta and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt participate in non-pathogenic Gram-negative enteric bacteria-induced RelA phosphorylation and NF-kappa B activation in both primary and intestinal epithelial cell lines*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(41): p. 38168-78.
256. Vora, P., et al., *Beta-defensin-2 expression is regulated by TLR signaling in intestinal epithelial cells*. *J Immunol*, 2004. **173**(9): p. 5398-405.
257. Lee, J., et al., *Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells*. *Nat Cell Biol*, 2006. **8**(12): p. 1327-36.
258. Otte, J.M., E. Cario, and D.K. Podolsky, *Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells*. *Gastroenterology*, 2004. **126**(4): p. 1054-70.
259. Bank, S., *A cohort of anti-TNF treated Danish patients with inflammatory bowel disease, used for identifying genetic markers associated with treatment response*. *Dan Med J*, 2015. **62**(5).
260. Girardin, S.E., et al., *Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan*. *Science*, 2003. **300**(5625): p. 1584-7.
261. Girardin, S.E., et al., *Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(11): p. 8869-72.
262. Strober, W., et al., *Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(1): p. 9-20.
263. Rosenstiel, P., et al., *TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells*. *Gastroenterology*, 2003. **124**(4): p. 1001-9.
264. Berrebi, D., et al., *Card15 gene overexpression in mononuclear and epithelial cells of the inflamed Crohn's disease colon*. *Gut*, 2003. **52**(6): p. 840-6.
265. Stockinger, S., et al., *IFN regulatory factor 3-dependent induction of type I IFNs by intracellular bacteria is mediated by a TLR- and Nod2-independent mechanism*. *J Immunol*, 2004. **173**(12): p. 7416-25.
266. Ogura, Y., et al., *Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(7): p. 4812-8.
267. Kobayashi, K.S., et al., *Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract*. *Science*, 2005. **307**(5710): p. 731-4.
268. Wilson, C.L., et al., *Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense*. *Science*, 1999. **286**(5437): p. 113-7.
269. Garabedian, E.M., et al., *Examining the role of Paneth cells in the small intestine by lineage ablation in transgenic mice*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(38): p. 23729-40.

270. Knoop, K.A., M.J. Miller, and R.D. Newberry, *Transepithelial antigen delivery in the small intestine: different paths, different outcomes*. *Curr Opin Gastroenterol*, 2013. **29**(2): p. 112-8.
271. Niess, J.H., et al., *CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance*. *Science*, 2005. **307**(5707): p. 254-8.
272. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. *Nature*, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
273. Hart, A.L., et al., *Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria*. *Gut*, 2004. **53**(11): p. 1602-9.
274. Steinman, R.M. and M.C. Nussenzweig, *Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(1): p. 351-8.
275. Bettelli, E., et al., *Induction and effector functions of T(H)17 cells*. *Nature*, 2008. **453**(7198): p. 1051-7.
276. Yang, X.O., et al., *T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma*. *Immunity*, 2008. **28**(1): p. 29-39.
277. Zhang, F., G. Meng, and W. Strober, *Interactions among the transcription factors Runx1, RORgammat and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17-producing T cells*. *Nat Immunol*, 2008. **9**(11): p. 1297-306.
278. Manel, N., D. Unutmaz, and D.R. Littman, *The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgammat*. *Nat Immunol*, 2008. **9**(6): p. 641-9.
279. Granger, D.N. and P. Kubes, *The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion*. *J Leukoc Biol*, 1994. **55**(5): p. 662-75.
280. Soderholm, J.D., et al., *Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of Crohn's disease*. *Gut*, 2002. **50**(3): p. 307-13.
281. Irvine, E.J. and J.K. Marshall, *Increased intestinal permeability precedes the onset of Crohn's disease in a subject with familial risk*. *Gastroenterology*, 2000. **119**(6): p. 1740-4.
282. Buhner, S., et al., *Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation?* *Gut*, 2006. **55**(3): p. 342-7.
283. Heller, F., et al., *Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution*. *Gastroenterology*, 2005. **129**(2): p. 550-64.
284. Sun, Y., et al., *Enteric neurones modulate the colonic permeability response to luminal bile acids in rat colon in vivo*. *Gut*, 2004. **53**(3): p. 362-7.
285. Ma, T.Y., et al., *TNF-alpha-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF-kappa B activation*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004. **286**(3): p. G367-76.
286. Musch, M.W., et al., *T cell activation causes diarrhea by increasing intestinal permeability and inhibiting epithelial Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase*. *J Clin Invest*, 2002. **110**(11): p. 1739-47.

287. Cario, E. and D.K. Podolsky, *Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease*. *Infect Immun*, 2000. **68**(12): p. 7010-7.
288. Rhee, S.H., et al., *Pathophysiological role of Toll-like receptor 5 engagement by bacterial flagellin in colonic inflammation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(38): p. 13610-5.
289. Hart, A.L., et al., *Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases*. *Gastroenterology*, 2005. **129**(1): p. 50-65.
290. Baumgart, D.C., et al., *Patients with active inflammatory bowel disease lack immature peripheral blood plasmacytoid and myeloid dendritic cells*. *Gut*, 2005. **54**(2): p. 228-36.
291. Papadakis, K.A., et al., *Dominant role for TL1A/DR3 pathway in IL-12 plus IL-18-induced IFN-gamma production by peripheral blood and mucosal CCR9+ T lymphocytes*. *J Immunol*, 2005. **174**(8): p. 4985-90.
292. Cruickshank, S.M., et al., *Colonic epithelial cell mediated suppression of CD4 T cell activation*. *Gut*, 2004. **53**(5): p. 678-84.
293. van de Wal, Y., et al., *Delineation of a CD1d-restricted antigen presentation pathway associated with human and mouse intestinal epithelial cells*. *Gastroenterology*, 2003. **124**(5): p. 1420-31.
294. Van den Brande, J.M., et al., *Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease*. *Gastroenterology*, 2003. **124**(7): p. 1774-85.
295. Ina, K., et al., *Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance*. *J Immunol*, 1999. **163**(2): p. 1081-90.
296. Martin, B., et al., *Suppression of CD4+ T lymphocyte effector functions by CD4+CD25+ cells in vivo*. *J Immunol*, 2004. **172**(6): p. 3391-8.
297. Fuss, I.J., et al., *Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis*. *J Clin Invest*, 2004. **113**(10): p. 1490-7.
298. Goebel, S., et al., *VEGF-A stimulation of leukocyte adhesion to colonic microvascular endothelium: implications for inflammatory bowel disease*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006. **290**(4): p. G648-54.
299. Charo, I.F. and R.M. Ransohoff, *The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation*. *N Engl J Med*, 2006. **354**(6): p. 610-21.
300. Kirkegaard, T., et al., *Expression and localisation of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in fistulae of patients with Crohn's disease*. *Gut*, 2004. **53**(5): p. 701-9.
301. Theiss, A.L., et al., *Tumor necrosis factor (TNF) alpha increases collagen accumulation and proliferation in intestinal myofibroblasts via TNF receptor 2*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(43): p. 36099-109.

302. Leeb, S.N., et al., *Reduced migration of fibroblasts in inflammatory bowel disease: role of inflammatory mediators and focal adhesion kinase*. *Gastroenterology*, 2003. **125**(5): p. 1341-54.
303. Keshavarzian, A., et al., *Increases in free radicals and cytoskeletal protein oxidation and nitration in the colon of patients with inflammatory bowel disease*. *Gut*, 2003. **52**(5): p. 720-8.
304. Sparberg, M., J. Fennessy, and J.B. Kirsner, *Ulcerative proctitis and mild ulcerative colitis: A study of 220 patients*. *Medicine (Baltimore)*, 1966. **45**(5): p. 391-412.
305. Gabay, C. and I. Kushner, *Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation*. *N Engl J Med*, 1999. **340**(6): p. 448-54.
306. Kotler, D.P., *Cachexia*. *Ann Intern Med*, 2000. **133**(8): p. 622-34.
307. Dinarello, C.A., *Cytokines as endogenous pyrogens*. *J Infect Dis*, 1999. **179 Suppl 2**: p. S294-304.
308. Gasche, C., et al., *Anemia in Crohn's disease. Importance of inadequate erythropoietin production and iron deficiency*. *Dig Dis Sci*, 1994. **39**(9): p. 1930-4.
309. Dyer, N.H. and A.M. Dawson, *Malnutrition and malabsorption in Crohn's disease with reference to the effect of surgery*. *Br J Surg*, 1973. **60**(2): p. 134-40.
310. Dyer, N.H., et al., *Anaemia in Crohn's disease*. *Q J Med*, 1972. **41**(164): p. 419-36.
311. Means, R.T., Jr., *Erythropoietin in the treatment of anemia in chronic infectious, inflammatory, and malignant diseases*. *Curr Opin Hematol*, 1995. **2**(3): p. 210-3.
312. Schreiber, S., et al., *Recombinant erythropoietin for the treatment of anemia in inflammatory bowel disease*. *N Engl J Med*, 1996. **334**(10): p. 619-23.
313. Koury, M.J. and M.C. Bondurant, *The molecular mechanism of erythropoietin action*. *Eur J Biochem*, 1992. **210**(3): p. 649-63.
314. Gumaste, V., et al., *Coombs-positive autoimmune hemolytic anemia in ulcerative colitis*. *Dig Dis Sci*, 1989. **34**(9): p. 1457-61.
315. Bell, D.W., et al., *Ulcerative colitis complicated by autoimmune hemolytic anemia*. *South Med J*, 1981. **74**(3): p. 359-61.
316. Altman, A.R., C. Maltz, and H.D. Janowitz, *Autoimmune hemolytic anemia in ulcerative colitis: report of three cases, review of the literature, and evaluation of modes of therapy*. *Dig Dis Sci*, 1979. **24**(4): p. 282-5.
317. Heits, F., et al., *Elevated serum thrombopoietin and interleukin-6 concentrations in thrombocytosis associated with inflammatory bowel disease*. *J Interferon Cytokine Res*, 1999. **19**(7): p. 757-60.
318. Loftus, E.V., Jr., et al., *Risk of lymphoma in inflammatory bowel disease*. *Am J Gastroenterol*, 2000. **95**(9): p. 2308-12.
319. Connell, W.R., et al., *Long-term neoplasia risk after azathioprine treatment in inflammatory bowel disease*. *Lancet*, 1994. **343**(8908): p. 1249-52.
320. Caspi, O., et al., *The association of inflammatory bowel disease and leukemia-- coincidence or not?* *Leuk Lymphoma*, 1995. **17**(3-4): p. 255-62.

321. Gupta, R.B., et al., *Histologic inflammation is a risk factor for progression to colorectal neoplasia in ulcerative colitis: a cohort study*. *Gastroenterology*, 2007. **133**(4): p. 1099-105; quiz 1340-1.
322. Itzkowitz, S.H. and N. Harpaz, *Diagnosis and management of dysplasia in patients with inflammatory bowel diseases*. *Gastroenterology*, 2004. **126**(6): p. 1634-48.
323. Rutter, M., et al., *Severity of inflammation is a risk factor for colorectal neoplasia in ulcerative colitis*. *Gastroenterology*, 2004. **126**(2): p. 451-9.
324. Li, Q., S. Withoff, and I.M. Verma, *Inflammation-associated cancer: NF-kappaB is the lynchpin*. *Trends Immunol*, 2005. **26**(6): p. 318-25.
325. Baschant, U., N.E. Lane, and J. Tuckermann, *The multiple facets of glucocorticoid action in rheumatoid arthritis*. *Nat Rev Rheumatol*, 2012. **8**(11): p. 645-55.
326. Ford, A.C., et al., *Glucocorticosteroid therapy in inflammatory bowel disease: systematic review and meta-analysis*. *Am J Gastroenterol*, 2011. **106**(4): p. 590-9; quiz 600.
327. Faubion, W.A., Jr., et al., *The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: a population-based study*. *Gastroenterology*, 2001. **121**(2): p. 255-60.
328. Chan, M.T., et al., *Difficult-to-control asthma: clinical characteristics of steroid-insensitive asthma*. *J Allergy Clin Immunol*, 1998. **101**(5): p. 594-601.
329. Duffy, D.L., et al., *Genetics of asthma and hay fever in Australian twins*. *Am Rev Respir Dis*, 1990. **142**(6 Pt 1): p. 1351-8.
330. Lee, R.W., et al., *Steroid refractory CD4+ T cells in patients with sight-threatening uveitis*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009. **50**(9): p. 4273-8.
331. Maranville, J.C., et al., *In vitro sensitivity assays and clinical response to glucocorticoids in patients with inflammatory bowel disease*. *J Crohns Colitis*, 2014. **8**(11): p. 1539-47.
332. Manz, M., et al., *Therapy of steroid-resistant inflammatory bowel disease*. *Digestion*, 2012. **86 Suppl 1**: p. 11-5.
333. Kuenzig, M.E., et al., *Budesonide for maintenance of remission in Crohn's disease*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2014. **8**: p. CD002913.
334. Steinhart, A.H., et al., *Corticosteroids for maintenance of remission in Crohn's disease*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2003(4): p. CD000301.
335. Benchimol, E.I., et al., *Budesonide for maintenance of remission in Crohn's disease*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2009(1): p. CD002913.
336. Schoon, E.J., *Budesonide: a useful tool in the maintenance treatment of Crohn's disease?* *Neth J Med*, 2007. **65**(9): p. 316-7.
337. Rutgeerts, P., S. Vermeire, and G. Van Assche, *Mucosal healing in inflammatory bowel disease: impossible ideal or therapeutic target?* *Gut*, 2007. **56**(4): p. 453-5.
338. Gonvers, J.J., et al., *Maintenance of remission in Crohn's disease*. *Digestion*, 2005. **71**(1): p. 41-8.
339. Brookes, M.J. and J.R. Green, *Maintenance of remission in Crohn's disease: current and emerging therapeutic options*. *Drugs*, 2004. **64**(10): p. 1069-89.

340. Yang, Y.X. and G.R. Lichtenstein, *Corticosteroids in Crohn's disease*. *Am J Gastroenterol*, 2002. **97**(4): p. 803-23.
341. Coste, A., et al., *LRH-1-mediated glucocorticoid synthesis in enterocytes protects against inflammatory bowel disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(32): p. 13098-103.
342. Suzuki, K., et al., *Effects of crowding and heat stress on intestinal flora, body weight gain, and feed efficiency of growing rats and chicks*. *Nihon Juigaku Zasshi*, 1983. **45**(3): p. 331-8.
343. Ocon, B., et al., *The glucocorticoid budesonide has protective and deleterious effects in experimental colitis in mice*. *Biochem Pharmacol*, 2016. **116**: p. 73-88.
344. Bradesi, S., et al., *Repeated exposure to water avoidance stress in rats: a new model for sustained visceral hyperalgesia*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2005. **289**(1): p. G42-53.
345. Ait-Belgnaoui, A., et al., *Acute stress-induced hypersensitivity to colonic distension depends upon increase in paracellular permeability: role of myosin light chain kinase*. *Pain*, 2005. **113**(1-2): p. 141-7.
346. Mazzon, E. and S. Cuzzocrea, *Role of TNF-alpha in ileum tight junction alteration in mouse model of restraint stress*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008. **294**(5): p. G1268-80.
347. Matsuo, K., et al., *Acute stress-induced colonic tissue HSP70 expression requires commensal bacterial components and intrinsic glucocorticoid*. *Brain Behav Immun*, 2009. **23**(1): p. 108-15.
348. Chinenov, Y. and I. Rogatsky, *Glucocorticoids and the innate immune system: crosstalk with the toll-like receptor signaling network*. *Mol Cell Endocrinol*, 2007. **275**(1-2): p. 30-42.
349. Das, I., et al., *Glucocorticoids alleviate intestinal ER stress by enhancing protein folding and degradation of misfolded proteins*. *J Exp Med*, 2013. **210**(6): p. 1201-16.
350. Barclay, G.R. and L.A. Turnberg, *Effect of cold-induced pain on salt and water transport in the human jejunum*. *Gastroenterology*, 1988. **94**(4): p. 994-8.
351. Saunders, P.R., et al., *Acute stressors stimulate ion secretion and increase epithelial permeability in rat intestine*. *Am J Physiol*, 1994. **267**(5 Pt 1): p. G794-9.
352. Soderholm, J.D., et al., *Neonatal maternal separation predisposes adult rats to colonic barrier dysfunction in response to mild stress*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002. **283**(6): p. G1257-63.
353. Turnbull, A.V. and C. Rivier, *Corticotropin-releasing factor (CRF) and endocrine responses to stress: CRF receptors, binding protein, and related peptides*. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1997. **215**(1): p. 1-10.
354. Santos, J., et al., *Corticotropin-releasing hormone mimics stress-induced colonic epithelial pathophysiology in the rat*. *Am J Physiol*, 1999. **277**(2 Pt 1): p. G391-9.
355. Sandle, G.I. and H.J. Binder, *Corticosteroids and intestinal ion transport*. *Gastroenterology*, 1987. **93**(1): p. 188-96.



356. Barreau, F., et al., *Neonatal maternal deprivation triggers long term alterations in colonic epithelial barrier and mucosal immunity in rats*. Gut, 2004. **53**(4): p. 501-6.
357. Veenema, A.H., et al., *Early life stress enhances the vulnerability to chronic psychosocial stress and experimental colitis in adult mice*. Endocrinology, 2008. **149**(6): p. 2727-36.
358. Wilson, L.M. and A.L. Baldwin, *Environmental stress causes mast cell degranulation, endothelial and epithelial changes, and edema in the rat intestinal mucosa*. Microcirculation, 1999. **6**(3): p. 189-98.
359. Jorge, E., et al., *Functional changes induced by psychological stress are not enough to cause intestinal inflammation in Sprague-Dawley rats*. Neurogastroenterol Motil, 2010. **22**(8): p. e241-50.
360. Soderholm, J.D. and M.H. Perdue, *Stress and gastrointestinal tract. II. Stress and intestinal barrier function*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **280**(1): p. G7-G13.
361. Finnie, I.A., et al., *Stimulation of colonic mucin synthesis by corticosteroids and nicotine*. Clin Sci (Lond), 1996. **91**(3): p. 359-64.
362. Meddings, J.B. and M.G. Swain, *Environmental stress-induced gastrointestinal permeability is mediated by endogenous glucocorticoids in the rat*. Gastroenterology, 2000. **119**(4): p. 1019-28.
363. Spitz, J., et al., *The effect of dexamethasone administration on rat intestinal permeability: the role of bacterial adherence*. Gastroenterology, 1994. **106**(1): p. 35-41.
364. Spitz, J.C., et al., *Characteristics of the intestinal epithelial barrier during dietary manipulation and glucocorticoid stress*. Crit Care Med, 1996. **24**(4): p. 635-41.
365. Bailey, M.T., et al., *Stressor exposure disrupts commensal microbial populations in the intestines and leads to increased colonization by Citrobacter rodentium*. Infect Immun, 2010. **78**(4): p. 1509-19.
366. Galand, G., *Brush border membrane sucrase-isomaltase, maltase-glucoamylase and trehalase in mammals. Comparative development, effects of glucocorticoids, molecular mechanisms, and phylogenetic implications*. Comp Biochem Physiol B, 1989. **94**(1): p. 1-11.
367. Jacomino, M., P. Shukla, and S.J. Henning, *Use of amphotropic retroviral vectors for gene transfer in human colon carcinoma cells*. Hum Gene Ther, 1997. **8**(7): p. 835-41.
368. Yaylaoglu, M.B., et al., *Diverse patterns of cell-specific gene expression in response to glucocorticoid in the developing small intestine*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006. **291**(6): p. G1041-50.
369. Aszterbaum, M., et al., *Glucocorticoids accelerate fetal maturation of the epidermal permeability barrier in the rat*. J Clin Invest, 1993. **91**(6): p. 2703-8.
370. Sheu, H.M., et al., *Modulation of epidermal terminal differentiation in patients after long-term topical corticosteroids*. J Dermatol, 1991. **18**(8): p. 454-64.
371. Bayo, P., et al., *Glucocorticoid receptor is required for skin barrier competence*. Endocrinology, 2008. **149**(3): p. 1377-88.

372. Kao, J.S., et al., *Short-term glucocorticoid treatment compromises both permeability barrier homeostasis and stratum corneum integrity: inhibition of epidermal lipid synthesis accounts for functional abnormalities*. *J Invest Dermatol*, 2003. **120**(3): p. 456-64.
373. Sidler, D., et al., *Colon cancer cells produce immunoregulatory glucocorticoids*. *Oncogene*, 2011. **30**(21): p. 2411-9.
374. Pascussi, J.M., et al., *Transcriptional analysis of the orphan nuclear receptor constitutive androstane receptor (NR1I3) gene promoter: identification of a distal glucocorticoid response element*. *Mol Endocrinol*, 2003. **17**(1): p. 42-55.
375. Saitou, M., et al., *Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands*. *Mol Biol Cell*, 2000. **11**(12): p. 4131-42.
376. Bamforth, S.D., et al., *A dominant mutant of occludin disrupts tight junction structure and function*. *J Cell Sci*, 1999. **112 ( Pt 12)**: p. 1879-88.
377. Balda, M.S., et al., *Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein*. *J Cell Biol*, 1996. **134**(4): p. 1031-49.
378. Felinski, E.A., et al., *Glucocorticoids induce transactivation of tight junction genes occludin and claudin-5 in retinal endothelial cells via a novel cis-element*. *Exp Eye Res*, 2008. **86**(6): p. 867-78.
379. Forster, C., *Tight junctions and the modulation of barrier function in disease*. *Histochem Cell Biol*, 2008. **130**(1): p. 55-70.
380. Burek, M. and C.Y. Forster, *Cloning and characterization of the murine claudin-5 promoter*. *Mol Cell Endocrinol*, 2009. **298**(1-2): p. 19-24.
381. Gavard, J., *Breaking the VE-cadherin bonds*. *FEBS Lett*, 2009. **583**(1): p. 1-6.
382. Blecharz, K.G., D. Drenckhahn, and C.Y. Forster, *Glucocorticoids increase VE-cadherin expression and cause cytoskeletal rearrangements in murine brain endothelial cEND cells*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2008. **28**(6): p. 1139-49.
383. Salvador, E., S. Shityakov, and C. Forster, *Glucocorticoids and endothelial cell barrier function*. *Cell Tissue Res*, 2014. **355**(3): p. 597-605.
384. Pitzalis, C., N. Pipitone, and M. Perretti, *Regulation of leukocyte-endothelial interactions by glucocorticoids*. *Ann N Y Acad Sci*, 2002. **966**: p. 108-18.
385. Cronstein, B.N., et al., *A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(21): p. 9991-5.
386. Pitzalis, C., et al., *Corticosteroids inhibit lymphocyte binding to endothelium and intercellular adhesion: an additional mechanism for their anti-inflammatory and immunosuppressive effect*. *J Immunol*, 1997. **158**(10): p. 5007-16.
387. Anacker, C., et al., *The glucocorticoid receptor: pivot of depression and of antidepressant treatment?* *Psychoneuroendocrinology*, 2011. **36**(3): p. 415-25.

388. Schacke, H., W.D. Docke, and K. Asadullah, *Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids*. *Pharmacol Ther*, 2002. **96**(1): p. 23-43.
389. Torriglia, A., F. Valamanesh, and F. Behar-Cohen, *On the retinal toxicity of intraocular glucocorticoids*. *Biochem Pharmacol*, 2010. **80**(12): p. 1878-86.
390. Small, G.R., et al., *Preventing local regeneration of glucocorticoids by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 enhances angiogenesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(34): p. 12165-70.
391. Shikatani, E.A., et al., *Inhibition of proliferation, migration and proteolysis contribute to corticosterone-mediated inhibition of angiogenesis*. *PLoS One*, 2012. **7**(10): p. e46625.
392. Moser, M., et al., *Glucocorticoids down-regulate dendritic cell function in vitro and in vivo*. *Eur J Immunol*, 1995. **25**(10): p. 2818-24.
393. Kim, K.D., et al., *Inhibition of glucocorticoid-mediated, caspase-independent dendritic cell death by CD40 activation*. *J Leukoc Biol*, 2001. **69**(3): p. 426-34.
394. Cumberbatch, M., R.J. Dearman, and I. Kimber, *Inhibition by dexamethasone of Langerhans cell migration: influence of epidermal cytokine signals*. *Immunopharmacology*, 1999. **41**(3): p. 235-43.
395. Kitajima, T., et al., *A novel mechanism of glucocorticoid-induced immune suppression: the inhibition of T cell-mediated terminal maturation of a murine dendritic cell line*. *J Clin Invest*, 1996. **98**(1): p. 142-7.
396. Matyszak, M.K., et al., *Differential effects of corticosteroids during different stages of dendritic cell maturation*. *Eur J Immunol*, 2000. **30**(4): p. 1233-42.
397. Rutella, S., S. Danese, and G. Leone, *Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age*. *Blood*, 2006. **108**(5): p. 1435-40.
398. Chamorro, S., et al., *TLR triggering on tolerogenic dendritic cells results in TLR2 up-regulation and a reduced proinflammatory immune program*. *J Immunol*, 2009. **183**(5): p. 2984-94.
399. Pedersen, A.E., et al., *Dexamethasone/1alpha-25-dihydroxyvitamin D3-treated dendritic cells suppress colitis in the SCID T-cell transfer model*. *Immunology*, 2009. **127**(3): p. 354-64.
400. Ogawa, S., et al., *Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors*. *Cell*, 2005. **122**(5): p. 707-21.
401. Varga, G., et al., *Glucocorticoids induce an activated, anti-inflammatory monocyte subset in mice that resembles myeloid-derived suppressor cells*. *J Leukoc Biol*, 2008. **84**(3): p. 644-50.
402. Stroncek, D.F., et al., *Administration of G-CSF plus dexamethasone produces greater granulocyte concentrate yields while causing no more donor toxicity than G-CSF alone*. *Transfusion*, 2001. **41**(8): p. 1037-44.
403. Purton, J.F., et al., *Intrathymic T cell development and selection proceeds normally in the absence of glucocorticoid receptor signaling*. *Immunity*, 2000. **13**(2): p. 179-86.
404. Brewer, J.A., et al., *Thymocyte apoptosis induced by T cell activation is mediated by glucocorticoids in vivo*. *J Immunol*, 2002. **169**(4): p. 1837-43.

405. Stephens, G.L., J.D. Ashwell, and L. Ignatowicz, *Mutually antagonistic signals regulate selection of the T cell repertoire*. *Int Immunol*, 2003. **15**(5): p. 623-32.
406. Vacchio, M.S., J.Y. Lee, and J.D. Ashwell, *Thymus-derived glucocorticoids set the thresholds for thymocyte selection by inhibiting TCR-mediated thymocyte activation*. *J Immunol*, 1999. **163**(3): p. 1327-33.
407. Lowenberg, M., et al., *Rapid immunosuppressive effects of glucocorticoids mediated through Lck and Fyn*. *Blood*, 2005. **106**(5): p. 1703-10.
408. Lowenberg, M., et al., *Glucocorticoids cause rapid dissociation of a T-cell-receptor-associated protein complex containing LCK and FYN*. *EMBO Rep*, 2006. **7**(10): p. 1023-9.
409. Brewer, J.A., et al., *T-cell glucocorticoid receptor is required to suppress COX-2-mediated lethal immune activation*. *Nat Med*, 2003. **9**(10): p. 1318-22.
410. Baschant, U. and J. Tuckermann, *The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2010. **120**(2-3): p. 69-75.
411. Chen, X., et al., *Differential response of murine CD4+CD25+ and CD4+CD25- T cells to dexamethasone-induced cell death*. *Eur J Immunol*, 2004. **34**(3): p. 859-69.
412. Kang, Y., et al., *Cutting edge: Immunosuppressant as adjuvant for tolerogenic immunization*. *J Immunol*, 2008. **180**(8): p. 5172-6.
413. Noti, M., D. Sidler, and T. Brunner, *Extra-adrenal glucocorticoid synthesis in the intestinal epithelium: more than a drop in the ocean?* *Semin Immunopathol*, 2009. **31**(2): p. 237-48.
414. Mittelstadt, P.R., J.P. Monteiro, and J.D. Ashwell, *Thymocyte responsiveness to endogenous glucocorticoids is required for immunological fitness*. *J Clin Invest*, 2012. **122**(7): p. 2384-94.
415. el Marjou, F., et al., *Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium*. *Genesis*, 2004. **39**(3): p. 186-93.
416. Chassaing, B., et al., *Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice*. *Curr Protoc Immunol*, 2014. **104**: p. Unit 15 25.
417. Bryan, N.S. and M.B. Grisham, *Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples*. *Free Radic Biol Med*, 2007. **43**(5): p. 645-57.
418. Krawisz, J.E., P. Sharon, and W.F. Stenson, *Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models*. *Gastroenterology*, 1984. **87**(6): p. 1344-50.
419. Sanchez de Medina, F., et al., *Induction of alkaline phosphatase in the inflamed intestine: a novel pharmacological target for inflammatory bowel disease*. *Biochem Pharmacol*, 2004. **68**(12): p. 2317-26.
420. Vilaseca, J., et al., *Dietary fish oil reduces progression of chronic inflammatory lesions in a rat model of granulomatous colitis*. *Gut*, 1990. **31**(5): p. 539-44.
421. Weigmann, B., et al., *Isolation and subsequent analysis of murine lamina propria mononuclear cells from colonic tissue*. *Nat Protoc*, 2007. **2**(10): p. 2307-11.

422. Mucida, D., et al., *Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid*. *Science*, 2007. **317**(5835): p. 256-60.
423. Mucida, D., et al., *Transcriptional reprogramming of mature CD4(+) helper T cells generates distinct MHC class II-restricted cytotoxic T lymphocytes*. *Nat Immunol*, 2013. **14**(3): p. 281-9.
424. Mucida, D. and H. Cheroutre, *TGFbeta and retinoic acid intersect in immune-regulation*. *Cell Adh Migr*, 2007. **1**(3): p. 142-4.
425. Denning, T.L., et al., *Mouse TCRalpha+CD8alphaalpha intraepithelial lymphocytes express genes that down-regulate their antigen reactivity and suppress immune responses*. *J Immunol*, 2007. **178**(7): p. 4230-9.
426. Boivin, M.A., et al., *Mechanism of glucocorticoid regulation of the intestinal tight junction barrier*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007. **292**(2): p. G590-8.
427. Fischer, A., et al., *Glucocorticoids regulate barrier function and claudin expression in intestinal epithelial cells via MKP-1*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2014. **306**(3): p. G218-28.
428. Lopez-Posadas, R., et al., *Tissue-nonspecific alkaline phosphatase is activated in enterocytes by oxidative stress via changes in glycosylation*. *Inflamm Bowel Dis*, 2011. **17**(2): p. 543-56.
429. Koch, S., et al., *The Wnt antagonist Dkk1 regulates intestinal epithelial homeostasis and wound repair*. *Gastroenterology*, 2011. **141**(1): p. 259-68, 268 e1-8.
430. Krausova, M. and V. Korinek, *Wnt signaling in adult intestinal stem cells and cancer*. *Cell Signal*, 2014. **26**(3): p. 570-9.
431. Perez-Navarro, R., et al., *Experimental inflammation of the rat distal colon inhibits ion secretion in the proximal colon by affecting the enteric nervous system*. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 2005. **371**(2): p. 114-21.
432. Lee, M.J., et al., *Interleukin-6 induces S100A9 expression in colonic epithelial cells through STAT3 activation in experimental ulcerative colitis*. *PLoS One*, 2012. **7**(9): p. e38801.
433. Vogl, T., et al., *Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock*. *Nat Med*, 2007. **13**(9): p. 1042-9.
434. de Souza, P.R., et al., *Adrenal-Derived Hormones Differentially Modulate Intestinal Immunity in Experimental Colitis*. *Mediators Inflamm*, 2016. **2016**: p. 4936370.
435. Gay, J., et al., *Corticotropin-releasing hormone deficiency is associated with reduced local inflammation in a mouse model of experimental colitis*. *Endocrinology*, 2008. **149**(7): p. 3403-9.
436. Shibolet, O., et al., *Regulatory role of the pituitary-adrenal axis in experimental colitis: Effect of adrenalectomy on the clinical course and the TH1/TH2 immune profile*. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2005. **11**(12): p. 1053-1059.
437. Hernandez-Chirlaque, C., et al., *Germ-free and Antibiotic-treated Mice are Highly Susceptible to Epithelial Injury in DSS Colitis*. *J Crohns Colitis*, 2016.

438. Sanchez de Medina, F., et al., *Intestinal inflammation and mucosal barrier function*. *Inflamm Bowel Dis*, 2014. **20**(12): p. 2394-404.
439. Huang, S.C., C.T. Lee, and B.C. Chung, *Tumor necrosis factor suppresses NR5A2 activity and intestinal glucocorticoid synthesis to sustain chronic colitis*. *Sci Signal*, 2014. **7**(314): p. ra20.
440. Hostettler, N., et al., *Local glucocorticoid production in the mouse lung is induced by immune cell stimulation*. *Allergy*, 2012. **67**(2): p. 227-234.
1. Addison, T., *On the constitutional and local effects of disease of the suprarenal capsule*, in *A collection of the published writings of the late Thomas Addison MD*. 1868: London : the New Sydenham Society.
2. Laryea, G., et al., *Dissection of glucocorticoid receptor-mediated inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by gene targeting in mice*. *Front Neuroendocrinol*, 2015. **36C**: p. 150-164.
3. Turnbull, A.V. and C.L. Rivier, *Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action*. *Physiol Rev*, 1999. **79**(1): p. 1-71.
4. Bornstein, S.R., et al., *Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human adrenals*. *Horm Metab Res*, 2004. **36**(7): p. 470-3.
5. Bornstein, S.R., et al., *The role of toll-like receptors in the immune-adrenal crosstalk*. *Ann N Y Acad Sci*, 2006. **1088**: p. 307-18.
6. Wieck, A., et al., *Differential neuroendocrine and immune responses to acute psychosocial stress in women with type 1 bipolar disorder*. *Brain Behav Immun*, 2013. **34**: p. 47-55.
7. Steigbigel, N.H., *Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock*. *Curr Infect Dis Rep*, 2003. **5**(5): p. 363-364.
8. Chatterjee, S., et al., *Synergistic therapeutic potential of dexamethasone and L-arginine in lipopolysaccharide-induced septic shock*. *J Surg Res*, 2007. **140**(1): p. 99-108.
9. Krakauer, T. and M. Buckley, *Dexamethasone attenuates staphylococcal enterotoxin B-induced hypothermic response and protects mice from superantigen-induced toxic shock*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006. **50**(1): p. 391-5.
10. Medzhitov, R., *Septic shock: on the importance of being tolerant*. *Immunity*, 2013. **39**(5): p. 799-800.
11. Bornstein, S.R. and J. Briegel, *A new role for glucocorticoids in septic shock: balancing the immune response*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003. **167**(4): p. 485-6.
12. Chrousos, G.P., *Stress and disorders of the stress system*. *Nat Rev Endocrinol*, 2009. **5**(7): p. 374-81.
13. Mayer, E.A., et al., *V. Stress and irritable bowel syndrome*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001. **280**(4): p. G519-24.

14. Anagnostis, P., et al., *11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitors: novel agents for the treatment of metabolic syndrome and obesity-related disorders?* *Metabolism*, 2013. **62**(1): p. 21-33.
15. Bujalska, I.J., S. Kumar, and P.M. Stewart, *Does central obesity reflect "Cushing's disease of the omentum"?* *Lancet*, 1997. **349**(9060): p. 1210-3.
16. Tomlinson, J.W., et al., *Inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity in vivo limits glucocorticoid exposure to human adipose tissue and decreases lipolysis.* *J Clin Endocrinol Metab*, 2007. **92**(3): p. 857-64.
17. Tomlinson, J.W., et al., *Weight loss increases 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression in human adipose tissue.* *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. **89**(6): p. 2711-6.
18. Feig, P.U., et al., *Effects of an 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor, MK-0916, in patients with type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome.* *Diabetes Obes Metab*, 2011. **13**(6): p. 498-504.
19. Tomlinson, J.W., et al., *11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a tissue-specific regulator of glucocorticoid response.* *Endocr Rev*, 2004. **25**(5): p. 831-66.
20. Chapman, K., M. Holmes, and J. Seckl, *11beta-hydroxysteroid dehydrogenases: intracellular gate-keepers of tissue glucocorticoid action.* *Physiol Rev*, 2013. **93**(3): p. 1139-206.
21. Edwards, C.R., et al., *Localisation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase--tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor.* *Lancet*, 1988. **2**(8618): p. 986-9.
22. Whorwood, C.B., M.L. Ricketts, and P.M. Stewart, *Epithelial cell localization of type 2 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in rat and human colon.* *Endocrinology*, 1994. **135**(6): p. 2533-41.
23. Fukushima, K., et al., *Aldosterone enhances 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in colonic epithelial cells in vivo.* *Scand J Gastroenterol*, 2005. **40**(7): p. 850-7.
24. Zbankova, S., et al., *11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 and 2 expression in colon from patients with ulcerative colitis.* *J Gastroenterol Hepatol*, 2007. **22**(7): p. 1019-23.
25. Hammond, G.L., et al., *Primary structure of human corticosteroid binding globulin, deduced from hepatic and pulmonary cDNAs, exhibits homology with serine protease inhibitors.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(15): p. 5153-7.
26. Mendel, C.M., *The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model.* *Endocr Rev*, 1989. **10**(3): p. 232-74.
27. Pemberton, P.A., et al., *Hormone binding globulins undergo serpin conformational change in inflammation.* *Nature*, 1988. **336**(6196): p. 257-8.
28. Singer, C.J., M.S. Khan, and W. Rosner, *Characteristics of the binding of corticosteroid-binding globulin to rat cell membranes.* *Endocrinology*, 1988. **122**(1): p. 89-96.
29. Strel'chyonok, O.A. and G.V. Avvakumov, *Interaction of human CBG with cell membranes.* *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1991. **40**(4-6): p. 795-803.

30. Jitrapakdee, S., *Transcription factors and coactivators controlling nutrient and hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012. **44**(1): p. 33-45.
31. Hwang, J.L. and R.E. Weiss, *Steroid-induced diabetes: a clinical and molecular approach to understanding and treatment*. *Diabetes Metab Res Rev*, 2014. **30**(2): p. 96-102.
32. Lee, M.J., et al., *Deconstructing the roles of glucocorticoids in adipose tissue biology and the development of central obesity*. *Biochim Biophys Acta*, 2014. **1842**(3): p. 473-81.
33. Geer, E.B., J. Islam, and C. Buettner, *Mechanisms of glucocorticoid-induced insulin resistance: focus on adipose tissue function and lipid metabolism*. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2014. **43**(1): p. 75-102.
34. Pimenta, E., M. Wolley, and M. Stowasser, *Adverse cardiovascular outcomes of corticosteroid excess*. *Endocrinology*, 2012. **153**(11): p. 5137-42.
35. Fardet, L., I. Petersen, and I. Nazareth, *Risk of cardiovascular events in people prescribed glucocorticoids with iatrogenic Cushing's syndrome: cohort study*. *BMJ*, 2012. **345**: p. e4928.
36. Johannsson, G. and O. Ragnarsson, *Cardiovascular and metabolic impact of glucocorticoid replacement therapy*. *Front Horm Res*, 2014. **43**: p. 33-44.
37. Nussinovitch, U., et al., *Glucocorticoids and the cardiovascular system: state of the art*. *Curr Pharm Des*, 2010. **16**(32): p. 3574-85.
38. Hanaoka, B.Y., et al., *Implications of glucocorticoid therapy in idiopathic inflammatory myopathies*. *Nat Rev Rheumatol*, 2012. **8**(8): p. 448-57.
39. Kuo, T., et al., *Genome-wide analysis of glucocorticoid receptor-binding sites in myotubes identifies gene networks modulating insulin signaling*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(28): p. 11160-5.
40. Larsson, L., et al., *Acute quadriplegia and loss of muscle myosin in patients treated with nondepolarizing neuromuscular blocking agents and corticosteroids: mechanisms at the cellular and molecular levels*. *Crit Care Med*, 2000. **28**(1): p. 34-45.
41. Hanaoka, B.Y., C.A. Peterson, and L.J. Crofford, *Glucocorticoid effects on skeletal muscle: benefit and risk in patients with autoimmune inflammatory rheumatoid diseases*. *Expert Rev Clin Immunol*, 2012. **8**(8): p. 695-7.
42. Goldstein, M.F., J.J. Fallon, Jr., and R. Harning, *Chronic glucocorticoid therapy-induced osteoporosis in patients with obstructive lung disease*. *Chest*, 1999. **116**(6): p. 1733-49.
43. Pearce, G., et al., *The deleterious effects of low-dose corticosteroids on bone density in patients with polymyalgia rheumatica*. *Br J Rheumatol*, 1998. **37**(3): p. 292-9.
44. Silva, E.J., et al., *Innate immunity and glucocorticoids: potential regulatory mechanisms in epididymal biology*. *J Androl*, 2011. **32**(6): p. 614-24.
45. Moisiadis, V.G. and S.G. Matthews, *Glucocorticoids and fetal programming part 2: Mechanisms*. *Nat Rev Endocrinol*, 2014. **10**(7): p. 403-11.



46. Harris, A. and J. Seckl, *Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease*. *Horm Behav*, 2011. **59**(3): p. 279-89.
47. Manwani, N., et al., *Reduced viability of mice with lung epithelial-specific knockout of glucocorticoid receptor*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2010. **43**(5): p. 599-606.
48. Sevilla, L.M., et al., *Epidermal inactivation of the glucocorticoid receptor triggers skin barrier defects and cutaneous inflammation*. *J Invest Dermatol*, 2013. **133**(2): p. 361-70.
49. Hostettler, N., et al., *Local glucocorticoid production in the mouse lung is induced by immune cell stimulation*. *Allergy*, 2012. **67**(2): p. 227-34.
50. Gomez-Sanchez, E.P., et al., *Aldosterone synthesis in the brain contributes to Dahl salt-sensitive rat hypertension*. *Exp Physiol*, 2010. **95**(1): p. 120-30.
51. Ohtani, T., et al., *Elevated cardiac tissue level of aldosterone and mineralocorticoid receptor in diastolic heart failure: Beneficial effects of mineralocorticoid receptor blocker*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2007. **292**(2): p. R946-54.
52. Croft, A.P., et al., *Effects of minor laboratory procedures, adrenalectomy, social defeat or acute alcohol on regional brain concentrations of corticosterone*. *Brain Res*, 2008. **1238**: p. 12-22.
53. Taves, M.D., et al., *Steroid concentrations in plasma, whole blood and brain: effects of saline perfusion to remove blood contamination from brain*. *PLoS One*, 2010. **5**(12): p. e15727.
54. Pazirandeh, A., et al., *Paracrine glucocorticoid activity produced by mouse thymic epithelial cells*. *FASEB J*, 1999. **13**(8): p. 893-901.
55. Vacchio, M.S., V. Papadopoulos, and J.D. Ashwell, *Steroid production in the thymus: implications for thymocyte selection*. *J Exp Med*, 1994. **179**(6): p. 1835-46.
56. Slominski, A., et al., *A novel pathway for sequential transformation of 7-dehydrocholesterol and expression of the P450scc system in mammalian skin*. *Eur J Biochem*, 2004. **271**(21): p. 4178-88.
57. Cirillo, N. and S.S. Prime, *Keratinocytes synthesize and activate cortisol*. *J Cell Biochem*, 2011. **112**(6): p. 1499-505.
58. Hannen, R.F., et al., *Steroid synthesis by primary human keratinocytes; implications for skin disease*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. **404**(1): p. 62-7.
59. Zmijewski, M.A. and A.T. Slominski, *Neuroendocrinology of the skin: An overview and selective analysis*. *Dermatoendocrinol*, 2011. **3**(1): p. 3-10.
60. Vukelic, S., et al., *Cortisol synthesis in epidermis is induced by IL-1 and tissue injury*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(12): p. 10265-75.
61. Keeney, D.S., C.M. Jenkins, and M.R. Waterman, *Developmentally regulated expression of adrenal 17 alpha-hydroxylase cytochrome P450 in the mouse embryo*. *Endocrinology*, 1995. **136**(11): p. 4872-9.
62. Cima, I., et al., *Intestinal epithelial cells synthesize glucocorticoids and regulate T cell activation*. *J Exp Med*, 2004. **200**(12): p. 1635-46.

63. Atanasov, A.G., et al., *Cell cycle-dependent regulation of extra-adrenal glucocorticoid synthesis in murine intestinal epithelial cells*. FASEB J, 2008. **22**(12): p. 4117-25.
64. Mueller, M., et al., *The nuclear receptor LRH-1 critically regulates extra-adrenal glucocorticoid synthesis in the intestine*. J Exp Med, 2006. **203**(9): p. 2057-62.
65. Noti, M., et al., *Lipopolysaccharide induces intestinal glucocorticoid synthesis in a TNFalpha-dependent manner*. FASEB J, 2010. **24**(5): p. 1340-6.
66. Noti, M., et al., *TNF suppresses acute intestinal inflammation by inducing local glucocorticoid synthesis*. J Exp Med, 2010. **207**(5): p. 1057-66.
67. Mueller, M., et al., *Differential regulation of glucocorticoid synthesis in murine intestinal epithelial versus adrenocortical cell lines*. Endocrinology, 2007. **148**(3): p. 1445-53.
68. Val, P., et al., *SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues*. Nucl Recept, 2003. **1**(1): p. 8.
69. Fayard, E., J. Auwerx, and K. Schoonjans, *LRH-1: an orphan nuclear receptor involved in development, metabolism and steroidogenesis*. Trends Cell Biol, 2004. **14**(5): p. 250-60.
70. Brunner, T., et al., *Regulation of cell death and survival in intestinal intraepithelial lymphocytes*. Cell Death Differ, 2001. **8**(7): p. 706-14.
71. Botrugno, O.A., et al., *Synergy between LRH-1 and beta-catenin induces G1 cyclin-mediated cell proliferation*. Mol Cell, 2004. **15**(4): p. 499-509.
72. Oakley, R.H. and J.A. Cidlowski, *Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids*. J Biol Chem, 2011. **286**(5): p. 3177-84.
73. Lewis-Tuffin, L.J., et al., *Human glucocorticoid receptor beta binds RU-486 and is transcriptionally active*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(6): p. 2266-82.
74. Kino, T., Y.A. Su, and G.P. Chrousos, *Human glucocorticoid receptor isoform beta: recent understanding of its potential implications in physiology and pathophysiology*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(21): p. 3435-48.
75. Heck, S., et al., *A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription factor AP-1*. EMBO J, 1994. **13**(17): p. 4087-95.
76. Hakim, A., et al., *Importin-7 mediates glucocorticoid receptor nuclear import and is impaired by oxidative stress, leading to glucocorticoid insensitivity*. FASEB J, 2013. **27**(11): p. 4510-9.
77. Fant, M.E., J. Yeakley, and R.W. Harrison, *Evidence for carrier-mediated transport of glucocorticoids by human placental membrane vesicles*. Biochim Biophys Acta, 1983. **731**(3): p. 415-20.
78. Pratt, W.B., et al., *Chaperoning of glucocorticoid receptors*. Handb Exp Pharmacol, 2006(172): p. 111-38.
79. Tsai, S.Y., et al., *Molecular interactions of steroid hormone receptor with its enhancer element: evidence for receptor dimer formation*. Cell, 1988. **55**(2): p. 361-9.

80. Kadmiel, M. and J.A. Cidlowski, *Glucocorticoid receptor signaling in health and disease*. Trends Pharmacol Sci, 2013. **34**(9): p. 518-30.
81. Nixon, M., R. Andrew, and K.E. Chapman, *It takes two to tango: dimerisation of glucocorticoid receptor and its anti-inflammatory functions*. Steroids, 2013. **78**(1): p. 59-68.
82. Malkoski, S.P. and R.I. Dorin, *Composite glucocorticoid regulation at a functionally defined negative glucocorticoid response element of the human corticotropin-releasing hormone gene*. Mol Endocrinol, 1999. **13**(10): p. 1629-44.
83. Ray, A. and K.E. Prefontaine, *Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(2): p. 752-6.
84. De Bosscher, K., et al., *Glucocorticoid-mediated repression of nuclear factor-kappaB-dependent transcription involves direct interference with transactivation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(25): p. 13504-9.
85. Langlais, D., et al., *The Stat3/GR interaction code: predictive value of direct/indirect DNA recruitment for transcription outcome*. Mol Cell, 2012. **47**(1): p. 38-49.
86. Jonat, C., et al., *Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone*. Cell, 1990. **62**(6): p. 1189-204.
87. Schule, R., et al., *Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor*. Cell, 1990. **62**(6): p. 1217-26.
88. Tasker, J.G., S. Di, and R. Malcher-Lopes, *Minireview: Rapid Glucocorticoid Signaling via Membrane-Associated Receptors*. Endocrinology, 2006. **147**(12): p. 5549-5556.
89. Wang, C., Y. Liu, and J.-M. Cao, *G Protein-Coupled Receptors: Extranuclear Mediators for the Non-Genomic Actions of Steroids*. International Journal of Molecular Sciences, 2014. **15**(9): p. 15412-15425.
90. Ayroldi, E., et al., *Mechanisms of the anti-inflammatory effects of glucocorticoids: genomic and nongenomic interference with MAPK signaling pathways*. FASEB J, 2012. **26**(12): p. 4805-20.
91. Busillo, J.M. and J.A. Cidlowski, *The five Rs of glucocorticoid action during inflammation: ready, reinforce, repress, resolve, and restore*. Trends Endocrinol Metab, 2013. **24**(3): p. 109-19.
92. Savory, J.G., et al., *Glucocorticoid receptor homodimers and glucocorticoid-mineralocorticoid receptor heterodimers form in the cytoplasm through alternative dimerization interfaces*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(3): p. 781-93.
93. Trapp, T., et al., *Heterodimerization between mineralocorticoid and glucocorticoid receptor: a new principle of glucocorticoid action in the CNS*. Neuron, 1994. **13**(6): p. 1457-62.
94. Liu, W., et al., *Steroid receptor heterodimerization demonstrated in vitro and in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(26): p. 12480-4.

95. Pepin, M.C., F. Pothier, and N. Barden, *Impaired type II glucocorticoid-receptor function in mice bearing antisense RNA transgene*. *Nature*, 1992. **355**(6362): p. 725-8.
96. Cole, T.J., et al., *Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation*. *Genes Dev*, 1995. **9**(13): p. 1608-21.
97. Bouabe, H. and K. Okkenhaug, *Gene targeting in mice: a review*. *Methods Mol Biol*, 2013. **1064**: p. 315-36.
98. Li, A., et al., *Deletion of mesenchymal glucocorticoid receptor attenuates embryonic lung development and abdominal wall closure*. *PLoS One*, 2013. **8**(5): p. e63578.
99. Habermehl, D., et al., *Glucocorticoid activity during lung maturation is essential in mesenchymal and less in alveolar epithelial cells*. *Mol Endocrinol*, 2011. **25**(8): p. 1280-8.
100. Goodwin, J.E., et al., *The glucocorticoid receptor in the distal nephron is not necessary for the development or maintenance of dexamethasone-induced hypertension*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. **394**(2): p. 266-71.
101. Goodwin, J.E., et al., *Knockout of the vascular endothelial glucocorticoid receptor abrogates dexamethasone-induced hypertension*. *J Hypertens*, 2011. **29**(7): p. 1347-56.
102. Sainte-Marie, Y., et al., *Conditional glucocorticoid receptor expression in the heart induces atrio-ventricular block*. *FASEB J*, 2007. **21**(12): p. 3133-41.
103. Watson, M.L., et al., *A cell-autonomous role for the glucocorticoid receptor in skeletal muscle atrophy induced by systemic glucocorticoid exposure*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2012. **302**(10): p. E1210-20.
104. Rauch, A., et al., *Glucocorticoids suppress bone formation by attenuating osteoblast differentiation via the monomeric glucocorticoid receptor*. *Cell Metab*, 2010. **11**(6): p. 517-31.
105. Preusch, M.R., et al., *Critical role of macrophages in glucocorticoid driven vascular calcification in a mouse-model of atherosclerosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. **28**(12): p. 2158-64.
106. Baschant, U., et al., *Glucocorticoid therapy of antigen-induced arthritis depends on the dimerized glucocorticoid receptor in T cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(48): p. 19317-22.
107. Rose, A.J., et al., *Molecular control of systemic bile acid homeostasis by the liver glucocorticoid receptor*. *Cell Metab*, 2011. **14**(1): p. 123-30.
108. Gesina, E., et al., *Dissecting the role of glucocorticoids on pancreas development*. *Diabetes*, 2004. **53**(9): p. 2322-9.
109. Mueller, K.M., et al., *Adipocyte Glucocorticoid Receptor Deficiency Attenuates Aging- and Hfd-Induced Obesity, and Impairs the Feeding-Fasting Transition*. *Diabetes*, 2016.
110. Sevilla, L.M., et al., *Glucocorticoid receptor and Klf4 co-regulate anti-inflammatory genes in keratinocytes*. *Mol Cell Endocrinol*, 2015.

111. Sanchis, A., et al., *Keratinocyte-targeted overexpression of the glucocorticoid receptor delays cutaneous wound healing*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e29701.
112. Reichardt, S.D., et al., *Glucocorticoids enhance intestinal glucose uptake via the dimerized glucocorticoid receptor in enterocytes*. Endocrinology, 2012. **153**(4): p. 1783-94.
113. Reichardt, S.D., et al., *Glucocorticoids induce gastroparesis in mice through depletion of l-arginine*. Endocrinology, 2014. **155**(10): p. 3899-908.
114. Baumgart, D.C. and S.R. Carding, *Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology*. Lancet, 2007. **369**(9573): p. 1627-40.
115. Kelly, J.K. and T.O. Siu, *The strictures, sinuses, and fissures of Crohn's disease*. J Clin Gastroenterol, 1986. **8**(5): p. 594-8.
116. Lohsiriwat, V. and S.K. Clark, *Persistent perineal sinus after ileoanal pouch excision in inflammatory bowel diseases: incidence, risk factors, and clinical course*. Dis Colon Rectum, 2008. **51**(12): p. 1795-9.
117. Cheung, O. and M.D. Regueiro, *Inflammatory bowel disease emergencies*. Gastroenterol Clin North Am, 2003. **32**(4): p. 1269-88.
118. Brahme, F. and C. Lindstrom, *A comparative radiographic and pathological study of intestinal vaso-architecture in Crohn's disease and in ulcerative colitis*. Gut, 1970. **11**(11): p. 928-40.
119. Bolondi, L., et al., *Changes in splanchnic hemodynamics in inflammatory bowel disease. Non-invasive assessment by Doppler ultrasound flowmetry*. Scand J Gastroenterol, 1992. **27**(6): p. 501-7.
120. Lott, M.F. and J.D. Davies, *Lymph node hypervascularity: haemangiomatoid lesions and pan-nodal vasodilatation*. J Pathol, 1983. **140**(3): p. 209-19.
121. Mortensen, N., *Fulminant acute and diffuse chronic ulcerative colitis--the argument for surgery*. Acta Gastroenterol Belg, 2000. **63**(3): p. 289.
122. Wong, C.K. and B.R. Yacyshyn, *Fulminant Ulcerative Colitis*. Curr Treat Options Gastroenterol, 2000. **3**(3): p. 217-226.
123. Geboes, K., et al., *Indeterminate colitis: a review of the concept--what's in a name?* Inflamm Bowel Dis, 2008. **14**(6): p. 850-7.
124. Rose, J.D., et al., *Cardiff Crohn's disease jubilee: the incidence over 50 years*. Gut, 1988. **29**(3): p. 346-51.
125. Garland, C.F., et al., *Incidence rates of ulcerative colitis and Crohn's disease in fifteen areas of the United States*. Gastroenterology, 1981. **81**(6): p. 1115-24.
126. Bonnevie, O., *A socio-economic study of patients with ulcerative colitis*. Scand J Gastroenterol, 1967. **2**(2): p. 129-36.
127. Gent, A.E., et al., *Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy*. Lancet, 1994. **343**(8900): p. 766-7.
128. Kull, K., et al., *Antineutrophil cytoplasmic antibodies in Estonian patients with inflammatory bowel disease. Prevalence and diagnostic role*. Hepatogastroenterology, 1998. **45**(24): p. 2132-7.
129. Ihasz, M., et al., *Surgical relations of Crohn's disease and the frequency of recurrence*. Acta Chir Hung, 1995. **35**(1-2): p. 63-75.

130. Sonnenberg, A., *Date of birth in the occurrence of inflammatory bowel disease*. *Inflamm Bowel Dis*, 2009. **15**(2): p. 206-11.
131. Kugathasan, S., et al., *Epidemiologic and clinical characteristics of children with newly diagnosed inflammatory bowel disease in Wisconsin: a statewide population-based study*. *J Pediatr*, 2003. **143**(4): p. 525-31.
132. Ekblom, A., et al., *The epidemiology of inflammatory bowel disease: a large, population-based study in Sweden*. *Gastroenterology*, 1991. **100**(2): p. 350-8.
133. Karlinger, K., et al., *The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease*. *Eur J Radiol*, 2000. **35**(3): p. 154-67.
134. Segal, I., et al., *The rarity of ulcerative colitis in South African blacks*. *Am J Gastroenterol*, 1980. **74**(4): p. 332-6.
135. Roth, M.P., et al., *Geographic origins of Jewish patients with inflammatory bowel disease*. *Gastroenterology*, 1989. **97**(4): p. 900-4.
136. Zhang, W., et al., *Extended haplotype association study in Crohn's disease identifies a novel, Ashkenazi Jewish-specific missense mutation in the NF-kappaB pathway gene, HEATR3*. *Genes Immun*, 2013. **14**(5): p. 310-6.
137. Kenny, E.E., et al., *A genome-wide scan of Ashkenazi Jewish Crohn's disease suggests novel susceptibility loci*. *PLoS Genet*, 2012. **8**(3): p. e1002559.
138. El-Tawil, A.M., *Jews and inflammatory bowel disease*. *J Gastrointest Liver Dis*, 2009. **18**(2): p. 137-8.
139. Chiodini, R.J., et al., *Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease. I. An unclassified Mycobacterium species isolated from patients with Crohn's disease*. *Dig Dis Sci*, 1984. **29**(12): p. 1073-9.
140. Miranda-Bautista, J., et al., *Listeria monocytogenes infection in inflammatory bowel disease patients: case series and review of the literature*. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2014. **26**(11): p. 1247-52.
141. Parent, K. and P. Mitchell, *Cell wall-defective variants of pseudomonas-like (group Va) bacteria in Crohn's disease*. *Gastroenterology*, 1978. **75**(3): p. 368-72.
142. Kangro, H.O., et al., *A prospective study of viral and mycoplasma infections in chronic inflammatory bowel disease*. *Gastroenterology*, 1990. **98**(3): p. 549-53.
143. Momotani, E., et al., *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis lipophilic antigen causes Crohn's disease-type necrotizing colitis in Mice*. *Springerplus*, 2012. **1**(1): p. 47.
144. Burke, D.A. and A.T. Axon, *Adhesive Escherichia coli in inflammatory bowel disease and infective diarrhoea*. *BMJ*, 1988. **297**(6641): p. 102-4.
145. Ohkusa, T., et al., *Fusobacterium varium localized in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis stimulates species-specific antibody*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2002. **17**(8): p. 849-53.
146. Darfeuille-Michaud, A., et al., *Presence of adherent Escherichia coli strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease*. *Gastroenterology*, 1998. **115**(6): p. 1405-13.

147. Negroni, A., et al., *Characterization of adherent-invasive Escherichia coli isolated from pediatric patients with inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 2012. **18**(5): p. 913-24.
148. Higgins, P.D., et al., *Prior Helicobacter pylori infection ameliorates Salmonella typhimurium-induced colitis: mucosal crosstalk between stomach and distal intestine*. Inflamm Bowel Dis, 2011. **17**(6): p. 1398-408.
149. Fukuda, Y., et al., *Helicobacter pylori infection increases mucosal permeability of the stomach and intestine*. Digestion, 2001. **63 Suppl 1**: p. 93-6.
150. Kirsner, J.B. and J.A. Spencer, *Family Occurrences of Ulcerative Colitis, Regional Enteritis, and Ileocolitis*. Ann Intern Med, 1963. **59**: p. 133-44.
151. Saro Gismera, C., et al., *[Epidemiology of chronic inflammatory bowel disease in Gijón, Asturias]*. Gastroenterol Hepatol, 2001. **24**(5): p. 228-35.
152. Weterman, I.T. and A.S. Pena, *Familial incidence of Crohn's disease in The Netherlands and a review of the literature*. Gastroenterology, 1984. **86**(3): p. 449-52.
153. McConnell, R.B., *Ulcerative colitis--genetic features*. Scand J Gastroenterol Suppl, 1983. **88**: p. 14-6.
154. Tysk, C., et al., *Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking*. Gut, 1988. **29**(7): p. 990-6.
155. Halfvarson, J., et al., *Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics*. Gastroenterology, 2003. **124**(7): p. 1767-73.
156. Thompson, N.P., et al., *Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study*. BMJ, 1996. **312**(7023): p. 95-6.
157. Franke, A., et al., *Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci*. Nat Genet, 2010. **42**(12): p. 1118-25.
158. Ohmen, J.D., et al., *Susceptibility locus for inflammatory bowel disease on chromosome 16 has a role in Crohn's disease, but not in ulcerative colitis*. Hum Mol Genet, 1996. **5**(10): p. 1679-83.
159. Economou, M., et al., *Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis*. Am J Gastroenterol, 2004. **99**(12): p. 2393-404.
160. Fernandez, L., et al., *IBD1 and IBD3 determine location of Crohn's disease in the Spanish population*. Inflamm Bowel Dis, 2004. **10**(6): p. 715-22.
161. Libioulle, C., et al., *Novel Crohn disease locus identified by genome-wide association maps to a gene desert on 5p13.1 and modulates expression of PTGER4*. PLoS Genet, 2007. **3**(4): p. e58.
162. Schmechel, S., et al., *Linking genetic susceptibility to Crohn's disease with Th17 cell function: IL-22 serum levels are increased in Crohn's disease and correlate with disease activity and IL23R genotype status*. Inflamm Bowel Dis, 2008. **14**(2): p. 204-12.

163. Glas, J., et al., *rs1004819 is the main disease-associated IL23R variant in German Crohn's disease patients: combined analysis of IL23R, CARD15, and OCTN1/2 variants*. PLoS One, 2007. **2**(9): p. e819.
164. Cox, J.H., et al., *Opposing consequences of IL-23 signaling mediated by innate and adaptive cells in chemically induced colitis in mice*. Mucosal Immunol, 2012. **5**(1): p. 99-109.
165. Kamada, N., et al., *Abnormally differentiated subsets of intestinal macrophage play a key role in Th1-dominant chronic colitis through excess production of IL-12 and IL-23 in response to bacteria*. J Immunol, 2005. **175**(10): p. 6900-8.
166. Jostins, L., et al., *Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease*. Nature, 2012. **491**(7422): p. 119-24.
167. Franke, A., et al., *Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility*. Nat Genet, 2008. **40**(11): p. 1319-23.
168. Prescott, N.J., et al., *A nonsynonymous SNP in ATG16L1 predisposes to ileal Crohn's disease and is independent of CARD15 and IBD5*. Gastroenterology, 2007. **132**(5): p. 1665-71.
169. Cadwell, K., et al., *A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells*. Nature, 2008. **456**(7219): p. 259-63.
170. Van Limbergen, J., G. Radford-Smith, and J. Satsangi, *Advances in IBD genetics*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2014. **11**(6): p. 372-85.
171. Liang, J., S.M. Sha, and K.C. Wu, *Role of the intestinal microbiota and fecal transplantation in inflammatory bowel diseases*. J Dig Dis, 2014. **15**(12): p. 641-6.
172. Machiels, K., et al., *A decrease of the butyrate-producing species Roseburia hominis and Faecalibacterium prausnitzii defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis*. Gut, 2014. **63**(8): p. 1275-83.
173. Sha, S., et al., *The biodiversity and composition of the dominant fecal microbiota in patients with inflammatory bowel disease*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2013. **75**(3): p. 245-51.
174. Swidsinski, A., et al., *Mucosal flora in inflammatory bowel disease*. Gastroenterology, 2002. **122**(1): p. 44-54.
175. Swidsinski, A., et al., *Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(7): p. 3380-9.
176. Frank, D.N., et al., *Disease phenotype and genotype are associated with shifts in intestinal-associated microbiota in inflammatory bowel diseases*. Inflamm Bowel Dis, 2011. **17**(1): p. 179-84.
177. Riol-Blanco, L., et al., *IL-23 receptor regulates unconventional IL-17-producing T cells that control bacterial infections*. J Immunol, 2010. **184**(4): p. 1710-20.
178. Goyal, R.K. and I. Hirano, *The enteric nervous system*. N Engl J Med, 1996. **334**(17): p. 1106-15.
179. Rao, S.S., et al., *Psychological and physical stress induce differential effects on human colonic motility*. Am J Gastroenterol, 1998. **93**(6): p. 985-90.



180. Enck, P., et al., *Stress effects on gastrointestinal transit in the rat*. Gut, 1989. **30**(4): p. 455-9.
181. Barclay, G.R. and L.A. Turnberg, *Effect of psychological stress on salt and water transport in the human jejunum*. Gastroenterology, 1987. **93**(1): p. 91-7.
182. Wallon, C., et al., *Corticotropin-releasing hormone (CRH) regulates macromolecular permeability via mast cells in normal human colonic biopsies in vitro*. Gut, 2008. **57**(1): p. 50-8.
183. Wik, M., et al., *Corticotropin-releasing hormone antagonists possess anti-inflammatory effects in the mouse ileum*. Gastroenterology, 2002. **123**(2): p. 505-15.
184. Reber, S.O., et al., *Chronic intermittent psychosocial stress (social defeat/overcrowding) in mice increases the severity of an acute DSS-induced colitis and impairs regeneration*. Endocrinology, 2006. **147**(10): p. 4968-76.
185. Reber, S.O., et al., *Aggravation of DSS-induced colitis after chronic subordinate colony (CSC) housing is partially mediated by adrenal mechanisms*. Stress, 2008. **11**(3): p. 225-34.
186. Matsunaga, H., et al., *Physiological stress exacerbates murine colitis by enhancing proinflammatory cytokine expression that is dependent on IL-18*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2011. **301**(3): p. G555-64.
187. Schwarz, S.P. and E.B. Blanchard, *Evaluation of a psychological treatment for inflammatory bowel disease*. Behav Res Ther, 1991. **29**(2): p. 167-77.
188. Jantschek, G., et al., *Effect of psychotherapy on the course of Crohn's disease. Results of the German prospective multicenter psychotherapy treatment study on Crohn's disease. German Study Group on Psychosocial Intervention in Crohn's Disease*. Scand J Gastroenterol, 1998. **33**(12): p. 1289-96.
189. Keller, W., et al., *Effect of psychotherapy and relaxation on the psychosocial and somatic course of Crohn's disease: main results of the German Prospective Multicenter Psychotherapy Treatment study on Crohn's Disease*. J Psychosom Res, 2004. **56**(6): p. 687-96.
190. Persson, P.G., A. Ahlbom, and G. Hellers, *Diet and inflammatory bowel disease: a case-control study*. Epidemiology, 1992. **3**(1): p. 47-52.
191. Russel, M.G., et al., *Modern life' in the epidemiology of inflammatory bowel disease: a case-control study with special emphasis on nutritional factors*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 1998. **10**(3): p. 243-9.
192. Shoda, R., et al., *Epidemiologic analysis of Crohn disease in Japan: increased dietary intake of n-6 polyunsaturated fatty acids and animal protein relates to the increased incidence of Crohn disease in Japan*. Am J Clin Nutr, 1996. **63**(5): p. 741-5.
193. Geerling, B.J., et al., *Diet as a risk factor for the development of ulcerative colitis*. Am J Gastroenterol, 2000. **95**(4): p. 1008-13.
194. Endres, S., et al., *Dietary supplementation with n-3 fatty acids suppresses interleukin-2 production and mononuclear cell proliferation*. J Leukoc Biol, 1993. **54**(6): p. 599-603.

195. Meydani, S.N., et al., *Oral (n-3) fatty acid supplementation suppresses cytokine production and lymphocyte proliferation: comparison between young and older women*. J Nutr, 1991. **121**(4): p. 547-55.
196. Endres, S., et al., *The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells*. N Engl J Med, 1989. **320**(5): p. 265-71.
197. Kim, Y.I., *Short-chain fatty acids in ulcerative colitis*. Nutr Rev, 1998. **56**(1 Pt 1): p. 17-24.
198. Belluzzi, A., et al., *Effect of an enteric-coated fish-oil preparation on relapses in Crohn's disease*. N Engl J Med, 1996. **334**(24): p. 1557-60.
199. Bergstrand, O. and G. Hellers, *Breast-feeding during infancy in patients who later develop Crohn's disease*. Scand J Gastroenterol, 1983. **18**(7): p. 903-6.
200. Acheson, E.D. and S.C. True Love, *Early weaning in the aetiology of ulcerative colitis. A study of feeding in infancy in cases and controls*. Br Med J, 1961. **2**(5257): p. 929-33.
201. Hennet, T., A. Weiss, and L. Borsig, *Decoding breast milk oligosaccharides*. Swiss Med Wkly, 2014. **144**: p. w13927.
202. Penttila, I.A., *Milk-derived transforming growth factor-beta and the infant immune response*. J Pediatr, 2010. **156**(2 Suppl): p. S21-5.
203. Vidal, K. and A. Donnet-Hughes, *CD14: a soluble pattern recognition receptor in milk*. Adv Exp Med Biol, 2008. **606**: p. 195-216.
204. Cleary, T.G., *Human milk protective mechanisms*. Adv Exp Med Biol, 2004. **554**: p. 145-54.
205. Bergmann, H., et al., *Probiotics in human milk and probiotic supplementation in infant nutrition: a workshop report*. Br J Nutr, 2014. **112**(7): p. 1119-28.
206. Tanabe, S., *Short peptide modules for enhancing intestinal barrier function*. Curr Pharm Des, 2012. **18**(6): p. 776-81.
207. Kotler, B.M., J.E. Kerstetter, and K.L. Insogna, *Claudins, dietary milk proteins, and intestinal barrier regulation*. Nutr Rev, 2013. **71**(1): p. 60-5.
208. Binder, J.H., et al., *Intolerance to milk in ulcerative colitis. A preliminary report*. Am J Dig Dis, 1966. **11**(11): p. 858-64.
209. Lerner, A., et al., *Serum antibodies to cow's milk proteins in pediatric inflammatory bowel disease: Crohn's disease vs. ulcerative colitis*. Acta Paediatr Scand, 1989. **78**(1): p. 81-6.
210. Harries, A.D., A. Baird, and J. Rhodes, *Non-smoking: a feature of ulcerative colitis*. Br Med J (Clin Res Ed), 1982. **284**(6317): p. 706.
211. Rampton, D.S., *Smoking and ulcerative colitis*. Lancet, 1984. **1**(8369): p. 168.
212. Srivasta, E.D., et al., *Smoking and ulcerative colitis: a community study*. Int J Colorectal Dis, 1993. **8**(2): p. 71-4.
213. Franceschi, S., et al., *Nonspecific inflammatory bowel disease and smoking*. Am J Epidemiol, 1987. **125**(3): p. 445-52.
214. Benoni, C. and A. Nilsson, *Smoking habits in patients with inflammatory bowel disease. A case-control study*. Scand J Gastroenterol, 1987. **22**(9): p. 1130-6.

215. Benoni, C. and A. Nilsson, *Smoking habits in patients with inflammatory bowel disease*. Scand J Gastroenterol, 1984. **19**(6): p. 824-30.
216. Cottone, M., et al., *Smoking habits and recurrence in Crohn's disease*. Gastroenterology, 1994. **106**(3): p. 643-8.
217. Sher, M.E., et al., *The influence of cigarette smoking on cytokine levels in patients with inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 1999. **5**(2): p. 73-8.
218. Motley, R.J., et al., *Smoking, eicosanoids and ulcerative colitis*. J Pharm Pharmacol, 1990. **42**(4): p. 288-9.
219. van Dijk, A.P., et al., *Transdermal nicotine inhibits interleukin 2 synthesis by mononuclear cells derived from healthy volunteers*. Eur J Clin Invest, 1998. **28**(8): p. 664-71.
220. Rutgeerts, P., et al., *Appendectomy protects against ulcerative colitis*. Gastroenterology, 1994. **106**(5): p. 1251-3.
221. Mizoguchi, A., et al., *Role of appendix in the development of inflammatory bowel disease in TCR-alpha mutant mice*. J Exp Med, 1996. **184**(2): p. 707-15.
222. Duggan, A.E., et al., *Appendectomy, childhood hygiene, Helicobacter pylori status, and risk of inflammatory bowel disease: a case control study*. Gut, 1998. **43**(4): p. 494-8.
223. Ekbom, A., *Appendectomy and childhood hygiene: different sides of the same coin?* Gut, 1998. **43**(4): p. 451.
224. Radford-Smith, G.L., et al., *Protective role of appendectomy on onset and severity of ulcerative colitis and Crohn's disease*. Gut, 2002. **51**(6): p. 808-13.
225. Cosnes, J., et al., *Effects of appendectomy on the course of ulcerative colitis*. Gut, 2002. **51**(6): p. 803-7.
226. Cosnes, J., et al., *Prior appendectomy and the phenotype and course of Crohn's disease*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(8): p. 1235-42.
227. Mahida, Y.R., *Microbial-gut interactions in health and disease. Epithelial cell responses*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2004. **18**(2): p. 241-53.
228. Booth, C. and C.S. Potten, *Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells*. J Clin Invest, 2000. **105**(11): p. 1493-9.
229. Pacha, J., V. Lisa, and I. Miksik, *Effect of cellular differentiation on 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in the intestine*. Steroids, 2002. **67**(2): p. 119-26.
230. Watanabe, S., et al., *Conditioned mesenchymal stem cells produce pleiotropic gut trophic factors*. J Gastroenterol, 2014. **49**(2): p. 270-82.
231. Liao, Y. and B. Lonnerdal, *Beta-catenin/TCF4 transactivates miR-30e during intestinal cell differentiation*. Cell Mol Life Sci, 2010. **67**(17): p. 2969-78.
232. Koo, B.K., et al., *Notch signaling promotes the generation of EphrinB1-positive intestinal epithelial cells*. Gastroenterology, 2009. **137**(1): p. 145-55, 155 e1-3.
233. Crosnier, C., D. Stamatakis, and J. Lewis, *Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control*. Nat Rev Genet, 2006. **7**(5): p. 349-59.

234. Melmed, G., et al., *Human intestinal epithelial cells are broadly unresponsive to Toll-like receptor 2-dependent bacterial ligands: implications for host-microbial interactions in the gut.* J Immunol, 2003. **170**(3): p. 1406-15.
235. Abreu, M.T., et al., *TLR signaling at the intestinal epithelial interface.* J Endotoxin Res, 2003. **9**(5): p. 322-30.
236. Abreu, M.T., et al., *Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide.* J Immunol, 2001. **167**(3): p. 1609-16.
237. Schneeberger, E.E. and R.D. Lynch, *The tight junction: a multifunctional complex.* Am J Physiol Cell Physiol, 2004. **286**(6): p. C1213-28.
238. Abreu, M.T., *Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function.* Nat Rev Immunol, 2010. **10**(2): p. 131-44.
239. Hershberg, R.M., *The epithelial cell cytoskeleton and intracellular trafficking. V. Polarized compartmentalization of antigen processing and Toll-like receptor signaling in intestinal epithelial cells.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002. **283**(4): p. G833-9.
240. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling.* Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 499-511.
241. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Toll-like receptor control of the adaptive immune responses.* Nat Immunol, 2004. **5**(10): p. 987-95.
242. Bocker, U., et al., *Responsiveness of intestinal epithelial cell lines to lipopolysaccharide is correlated with Toll-like receptor 4 but not Toll-like receptor 2 or CD14 expression.* Int J Colorectal Dis, 2003. **18**(1): p. 25-32.
243. Suzuki, M., T. Hisamatsu, and D.K. Podolsky, *Gamma interferon augments the intracellular pathway for lipopolysaccharide (LPS) recognition in human intestinal epithelial cells through coordinated up-regulation of LPS uptake and expression of the intracellular Toll-like receptor 4-MD-2 complex.* Infect Immun, 2003. **71**(6): p. 3503-11.
244. Abreu, M.T., et al., *TLR4 and MD-2 expression is regulated by immune-mediated signals in human intestinal epithelial cells.* J Biol Chem, 2002. **277**(23): p. 20431-7.
245. Bambou, J.C., et al., *In vitro and ex vivo activation of the TLR5 signaling pathway in intestinal epithelial cells by a commensal Escherichia coli strain.* J Biol Chem, 2004. **279**(41): p. 42984-92.
246. Nandakumar, N.S., et al., *Effect of Vibrio cholerae on chemokine gene expression in HT29 cells and its modulation by Lactobacillus GG.* Scand J Immunol, 2009. **69**(3): p. 181-7.
247. Tallant, T., et al., *Flagellin acting via TLR5 is the major activator of key signaling pathways leading to NF-kappa B and proinflammatory gene program activation in intestinal epithelial cells.* BMC Microbiol, 2004. **4**: p. 33.

248. Ewaschuk, J.B., et al., *Surface expression of Toll-like receptor 9 is upregulated on intestinal epithelial cells in response to pathogenic bacterial DNA*. *Infect Immun*, 2007. **75**(5): p. 2572-9.
249. Akhtar, M., et al., *Bacterial DNA evokes epithelial IL-8 production by a MAPK-dependent, NF-kappaB-independent pathway*. *FASEB J*, 2003. **17**(10): p. 1319-21.
250. Steenholdt, C., et al., *Expression and function of toll-like receptor 8 and Tollip in colonic epithelial cells from patients with inflammatory bowel disease*. *Scand J Gastroenterol*, 2009. **44**(2): p. 195-204.
251. Pedersen, G., et al., *Expression of Toll-like receptor 9 and response to bacterial CpG oligodeoxynucleotides in human intestinal epithelium*. *Clin Exp Immunol*, 2005. **141**(2): p. 298-306.
252. Rumio, C., et al., *Degranulation of paneth cells via toll-like receptor 9*. *Am J Pathol*, 2004. **165**(2): p. 373-81.
253. Chuang, T. and R.J. Ulevitch, *Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells*. *Biochim Biophys Acta*, 2001. **1518**(1-2): p. 157-61.
254. Jijon, H.B., et al., *MAP kinases contribute to IL-8 secretion by intestinal epithelial cells via a posttranscriptional mechanism*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002. **283**(1): p. C31-41.
255. Haller, D., et al., *IKK beta and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt participate in non-pathogenic Gram-negative enteric bacteria-induced RelA phosphorylation and NF-kappa B activation in both primary and intestinal epithelial cell lines*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(41): p. 38168-78.
256. Vora, P., et al., *Beta-defensin-2 expression is regulated by TLR signaling in intestinal epithelial cells*. *J Immunol*, 2004. **173**(9): p. 5398-405.
257. Lee, J., et al., *Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells*. *Nat Cell Biol*, 2006. **8**(12): p. 1327-36.
258. Otte, J.M., E. Cario, and D.K. Podolsky, *Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells*. *Gastroenterology*, 2004. **126**(4): p. 1054-70.
259. Bank, S., *A cohort of anti-TNF treated Danish patients with inflammatory bowel disease, used for identifying genetic markers associated with treatment response*. *Dan Med J*, 2015. **62**(5).
260. Girardin, S.E., et al., *Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan*. *Science*, 2003. **300**(5625): p. 1584-7.
261. Girardin, S.E., et al., *Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(11): p. 8869-72.
262. Strober, W., et al., *Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(1): p. 9-20.
263. Rosenstiel, P., et al., *TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells*. *Gastroenterology*, 2003. **124**(4): p. 1001-9.

264. Berrebi, D., et al., *Card15 gene overexpression in mononuclear and epithelial cells of the inflamed Crohn's disease colon*. Gut, 2003. **52**(6): p. 840-6.
265. Stockinger, S., et al., *IFN regulatory factor 3-dependent induction of type I IFNs by intracellular bacteria is mediated by a TLR- and Nod2-independent mechanism*. J Immunol, 2004. **173**(12): p. 7416-25.
266. Ogura, Y., et al., *Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB*. J Biol Chem, 2001. **276**(7): p. 4812-8.
267. Kobayashi, K.S., et al., *Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract*. Science, 2005. **307**(5710): p. 731-4.
268. Wilson, C.L., et al., *Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense*. Science, 1999. **286**(5437): p. 113-7.
269. Garabedian, E.M., et al., *Examining the role of Paneth cells in the small intestine by lineage ablation in transgenic mice*. J Biol Chem, 1997. **272**(38): p. 23729-40.
270. Knoop, K.A., M.J. Miller, and R.D. Newberry, *Transepithelial antigen delivery in the small intestine: different paths, different outcomes*. Curr Opin Gastroenterol, 2013. **29**(2): p. 112-8.
271. Niess, J.H., et al., *CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance*. Science, 2005. **307**(5707): p. 254-8.
272. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
273. Hart, A.L., et al., *Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria*. Gut, 2004. **53**(11): p. 1602-9.
274. Steinman, R.M. and M.C. Nussenzweig, *Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(1): p. 351-8.
275. Bettelli, E., et al., *Induction and effector functions of T(H)17 cells*. Nature, 2008. **453**(7198): p. 1051-7.
276. Yang, X.O., et al., *T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma*. Immunity, 2008. **28**(1): p. 29-39.
277. Zhang, F., G. Meng, and W. Strober, *Interactions among the transcription factors Runx1, RORgammat and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17-producing T cells*. Nat Immunol, 2008. **9**(11): p. 1297-306.
278. Manel, N., D. Unutmaz, and D.R. Littman, *The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgammat*. Nat Immunol, 2008. **9**(6): p. 641-9.
279. Granger, D.N. and P. Kubes, *The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion*. J Leukoc Biol, 1994. **55**(5): p. 662-75.
280. Soderholm, J.D., et al., *Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of Crohn's disease*. Gut, 2002. **50**(3): p. 307-13.

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

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



315. Bell, D.W., et al., *Ulcerative colitis complicated by autoimmune hemolytic anemia*. South Med J, 1981. **74**(3): p. 359-61.
316. Altman, A.R., C. Maltz, and H.D. Janowitz, *Autoimmune hemolytic anemia in ulcerative colitis: report of three cases, review of the literature, and evaluation of modes of therapy*. Dig Dis Sci, 1979. **24**(4): p. 282-5.
317. Heits, F., et al., *Elevated serum thrombopoietin and interleukin-6 concentrations in thrombocytosis associated with inflammatory bowel disease*. J Interferon Cytokine Res, 1999. **19**(7): p. 757-60.
318. Loftus, E.V., Jr., et al., *Risk of lymphoma in inflammatory bowel disease*. Am J Gastroenterol, 2000. **95**(9): p. 2308-12.
319. Connell, W.R., et al., *Long-term neoplasia risk after azathioprine treatment in inflammatory bowel disease*. Lancet, 1994. **343**(8908): p. 1249-52.
320. Caspi, O., et al., *The association of inflammatory bowel disease and leukemia--coincidence or not?* Leuk Lymphoma, 1995. **17**(3-4): p. 255-62.
321. Gupta, R.B., et al., *Histologic inflammation is a risk factor for progression to colorectal neoplasia in ulcerative colitis: a cohort study*. Gastroenterology, 2007. **133**(4): p. 1099-105; quiz 1340-1.
322. Itzkowitz, S.H. and N. Harpaz, *Diagnosis and management of dysplasia in patients with inflammatory bowel diseases*. Gastroenterology, 2004. **126**(6): p. 1634-48.
323. Rutter, M., et al., *Severity of inflammation is a risk factor for colorectal neoplasia in ulcerative colitis*. Gastroenterology, 2004. **126**(2): p. 451-9.
324. Li, Q., S. Withoff, and I.M. Verma, *Inflammation-associated cancer: NF-kappaB is the lynchpin*. Trends Immunol, 2005. **26**(6): p. 318-25.
325. Baschant, U., N.E. Lane, and J. Tuckermann, *The multiple facets of glucocorticoid action in rheumatoid arthritis*. Nat Rev Rheumatol, 2012. **8**(11): p. 645-55.
326. Ford, A.C., et al., *Glucocorticosteroid therapy in inflammatory bowel disease: systematic review and meta-analysis*. Am J Gastroenterol, 2011. **106**(4): p. 590-9; quiz 600.
327. Faubion, W.A., Jr., et al., *The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: a population-based study*. Gastroenterology, 2001. **121**(2): p. 255-60.
328. Chan, M.T., et al., *Difficult-to-control asthma: clinical characteristics of steroid-insensitive asthma*. J Allergy Clin Immunol, 1998. **101**(5): p. 594-601.
329. Duffy, D.L., et al., *Genetics of asthma and hay fever in Australian twins*. Am Rev Respir Dis, 1990. **142**(6 Pt 1): p. 1351-8.
330. Lee, R.W., et al., *Steroid refractory CD4+ T cells in patients with sight-threatening uveitis*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009. **50**(9): p. 4273-8.
331. Maranville, J.C., et al., *In vitro sensitivity assays and clinical response to glucocorticoids in patients with inflammatory bowel disease*. J Crohns Colitis, 2014. **8**(11): p. 1539-47.
332. Manz, M., et al., *Therapy of steroid-resistant inflammatory bowel disease*. Digestion, 2012. **86 Suppl 1**: p. 11-5.

333. Kuenzig, M.E., et al., *Budesonide for maintenance of remission in Crohn's disease*. Cochrane Database Syst Rev, 2014. **8**: p. CD002913.
334. Steinhart, A.H., et al., *Corticosteroids for maintenance of remission in Crohn's disease*. Cochrane Database Syst Rev, 2003(4): p. CD000301.
335. Benchimol, E.I., et al., *Budesonide for maintenance of remission in Crohn's disease*. Cochrane Database Syst Rev, 2009(1): p. CD002913.
336. Schoon, E.J., *Budesonide: a useful tool in the maintenance treatment of Crohn's disease?* Neth J Med, 2007. **65**(9): p. 316-7.
337. Rutgeerts, P., S. Vermeire, and G. Van Assche, *Mucosal healing in inflammatory bowel disease: impossible ideal or therapeutic target?* Gut, 2007. **56**(4): p. 453-5.
338. Gonvers, J.J., et al., *Maintenance of remission in Crohn's disease*. Digestion, 2005. **71**(1): p. 41-8.
339. Brookes, M.J. and J.R. Green, *Maintenance of remission in Crohn's disease: current and emerging therapeutic options*. Drugs, 2004. **64**(10): p. 1069-89.
340. Yang, Y.X. and G.R. Lichtenstein, *Corticosteroids in Crohn's disease*. Am J Gastroenterol, 2002. **97**(4): p. 803-23.
341. Coste, A., et al., *LRH-1-mediated glucocorticoid synthesis in enterocytes protects against inflammatory bowel disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(32): p. 13098-103.
342. Suzuki, K., et al., *Effects of crowding and heat stress on intestinal flora, body weight gain, and feed efficiency of growing rats and chicks*. Nihon Juigaku Zasshi, 1983. **45**(3): p. 331-8.
343. Ocon, B., et al., *The glucocorticoid budesonide has protective and deleterious effects in experimental colitis in mice*. Biochem Pharmacol, 2016. **116**: p. 73-88.
344. Bradesi, S., et al., *Repeated exposure to water avoidance stress in rats: a new model for sustained visceral hyperalgesia*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005. **289**(1): p. G42-53.
345. Ait-Belgnaoui, A., et al., *Acute stress-induced hypersensitivity to colonic distension depends upon increase in paracellular permeability: role of myosin light chain kinase*. Pain, 2005. **113**(1-2): p. 141-7.
346. Mazzon, E. and S. Cuzzocrea, *Role of TNF-alpha in ileum tight junction alteration in mouse model of restraint stress*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008. **294**(5): p. G1268-80.
347. Matsuo, K., et al., *Acute stress-induced colonic tissue HSP70 expression requires commensal bacterial components and intrinsic glucocorticoid*. Brain Behav Immun, 2009. **23**(1): p. 108-15.
348. Chinenov, Y. and I. Rogatsky, *Glucocorticoids and the innate immune system: crosstalk with the toll-like receptor signaling network*. Mol Cell Endocrinol, 2007. **275**(1-2): p. 30-42.
349. Das, I., et al., *Glucocorticoids alleviate intestinal ER stress by enhancing protein folding and degradation of misfolded proteins*. J Exp Med, 2013. **210**(6): p. 1201-16.

350. Barclay, G.R. and L.A. Turnberg, *Effect of cold-induced pain on salt and water transport in the human jejunum*. *Gastroenterology*, 1988. **94**(4): p. 994-8.
351. Saunders, P.R., et al., *Acute stressors stimulate ion secretion and increase epithelial permeability in rat intestine*. *Am J Physiol*, 1994. **267**(5 Pt 1): p. G794-9.
352. Soderholm, J.D., et al., *Neonatal maternal separation predisposes adult rats to colonic barrier dysfunction in response to mild stress*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002. **283**(6): p. G1257-63.
353. Turnbull, A.V. and C. Rivier, *Corticotropin-releasing factor (CRF) and endocrine responses to stress: CRF receptors, binding protein, and related peptides*. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1997. **215**(1): p. 1-10.
354. Santos, J., et al., *Corticotropin-releasing hormone mimics stress-induced colonic epithelial pathophysiology in the rat*. *Am J Physiol*, 1999. **277**(2 Pt 1): p. G391-9.
355. Sandle, G.I. and H.J. Binder, *Corticosteroids and intestinal ion transport*. *Gastroenterology*, 1987. **93**(1): p. 188-96.
356. Barreau, F., et al., *Neonatal maternal deprivation triggers long term alterations in colonic epithelial barrier and mucosal immunity in rats*. *Gut*, 2004. **53**(4): p. 501-6.
357. Veenema, A.H., et al., *Early life stress enhances the vulnerability to chronic psychosocial stress and experimental colitis in adult mice*. *Endocrinology*, 2008. **149**(6): p. 2727-36.
358. Wilson, L.M. and A.L. Baldwin, *Environmental stress causes mast cell degranulation, endothelial and epithelial changes, and edema in the rat intestinal mucosa*. *Microcirculation*, 1999. **6**(3): p. 189-98.
359. Jorge, E., et al., *Functional changes induced by psychological stress are not enough to cause intestinal inflammation in Sprague-Dawley rats*. *Neurogastroenterol Motil*, 2010. **22**(8): p. e241-50.
360. Soderholm, J.D. and M.H. Perdue, *Stress and gastrointestinal tract. II. Stress and intestinal barrier function*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001. **280**(1): p. G7-G13.
361. Finnie, I.A., et al., *Stimulation of colonic mucin synthesis by corticosteroids and nicotine*. *Clin Sci (Lond)*, 1996. **91**(3): p. 359-64.
362. Meddings, J.B. and M.G. Swain, *Environmental stress-induced gastrointestinal permeability is mediated by endogenous glucocorticoids in the rat*. *Gastroenterology*, 2000. **119**(4): p. 1019-28.
363. Spitz, J., et al., *The effect of dexamethasone administration on rat intestinal permeability: the role of bacterial adherence*. *Gastroenterology*, 1994. **106**(1): p. 35-41.
364. Spitz, J.C., et al., *Characteristics of the intestinal epithelial barrier during dietary manipulation and glucocorticoid stress*. *Crit Care Med*, 1996. **24**(4): p. 635-41.
365. Bailey, M.T., et al., *Stressor exposure disrupts commensal microbial populations in the intestines and leads to increased colonization by *Citrobacter rodentium**. *Infect Immun*, 2010. **78**(4): p. 1509-19.
366. Galand, G., *Brush border membrane sucrase-isomaltase, maltase-glucoamylase and trehalase in mammals. Comparative development, effects of glucocorticoids*,

- molecular mechanisms, and phylogenetic implications.* Comp Biochem Physiol B, 1989. **94**(1): p. 1-11.
367. Jacomino, M., P. Shukla, and S.J. Henning, *Use of amphotropic retroviral vectors for gene transfer in human colon carcinoma cells.* Hum Gene Ther, 1997. **8**(7): p. 835-41.
368. Yaylaoglu, M.B., et al., *Diverse patterns of cell-specific gene expression in response to glucocorticoid in the developing small intestine.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006. **291**(6): p. G1041-50.
369. Aszterbaum, M., et al., *Glucocorticoids accelerate fetal maturation of the epidermal permeability barrier in the rat.* J Clin Invest, 1993. **91**(6): p. 2703-8.
370. Sheu, H.M., et al., *Modulation of epidermal terminal differentiation in patients after long-term topical corticosteroids.* J Dermatol, 1991. **18**(8): p. 454-64.
371. Bayo, P., et al., *Glucocorticoid receptor is required for skin barrier competence.* Endocrinology, 2008. **149**(3): p. 1377-88.
372. Kao, J.S., et al., *Short-term glucocorticoid treatment compromises both permeability barrier homeostasis and stratum corneum integrity: inhibition of epidermal lipid synthesis accounts for functional abnormalities.* J Invest Dermatol, 2003. **120**(3): p. 456-64.
373. Sidler, D., et al., *Colon cancer cells produce immunoregulatory glucocorticoids.* Oncogene, 2011. **30**(21): p. 2411-9.
374. Pascussi, J.M., et al., *Transcriptional analysis of the orphan nuclear receptor constitutive androstane receptor (NR1I3) gene promoter: identification of a distal glucocorticoid response element.* Mol Endocrinol, 2003. **17**(1): p. 42-55.
375. Saitou, M., et al., *Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands.* Mol Biol Cell, 2000. **11**(12): p. 4131-42.
376. Bamforth, S.D., et al., *A dominant mutant of occludin disrupts tight junction structure and function.* J Cell Sci, 1999. **112 ( Pt 12)**: p. 1879-88.
377. Balda, M.S., et al., *Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein.* J Cell Biol, 1996. **134**(4): p. 1031-49.
378. Felinski, E.A., et al., *Glucocorticoids induce transactivation of tight junction genes occludin and claudin-5 in retinal endothelial cells via a novel cis-element.* Exp Eye Res, 2008. **86**(6): p. 867-78.
379. Forster, C., *Tight junctions and the modulation of barrier function in disease.* Histochem Cell Biol, 2008. **130**(1): p. 55-70.
380. Burek, M. and C.Y. Forster, *Cloning and characterization of the murine claudin-5 promoter.* Mol Cell Endocrinol, 2009. **298**(1-2): p. 19-24.
381. Gavard, J., *Breaking the VE-cadherin bonds.* FEBS Lett, 2009. **583**(1): p. 1-6.
382. Blecharz, K.G., D. Drenckhahn, and C.Y. Forster, *Glucocorticoids increase VE-cadherin expression and cause cytoskeletal rearrangements in murine brain endothelial cEND cells.* J Cereb Blood Flow Metab, 2008. **28**(6): p. 1139-49.

383. Salvador, E., S. Shityakov, and C. Forster, *Glucocorticoids and endothelial cell barrier function*. Cell Tissue Res, 2014. **355**(3): p. 597-605.
384. Pitzalis, C., N. Pipitone, and M. Perretti, *Regulation of leukocyte-endothelial interactions by glucocorticoids*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **966**: p. 108-18.
385. Cronstein, B.N., et al., *A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(21): p. 9991-5.
386. Pitzalis, C., et al., *Corticosteroids inhibit lymphocyte binding to endothelium and intercellular adhesion: an additional mechanism for their anti-inflammatory and immunosuppressive effect*. J Immunol, 1997. **158**(10): p. 5007-16.
387. Anacker, C., et al., *The glucocorticoid receptor: pivot of depression and of antidepressant treatment?* Psychoneuroendocrinology, 2011. **36**(3): p. 415-25.
388. Schacke, H., W.D. Docke, and K. Asadullah, *Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids*. Pharmacol Ther, 2002. **96**(1): p. 23-43.
389. Torriglia, A., F. Valamanesh, and F. Behar-Cohen, *On the retinal toxicity of intraocular glucocorticoids*. Biochem Pharmacol, 2010. **80**(12): p. 1878-86.
390. Small, G.R., et al., *Preventing local regeneration of glucocorticoids by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 enhances angiogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(34): p. 12165-70.
391. Shikatani, E.A., et al., *Inhibition of proliferation, migration and proteolysis contribute to corticosterone-mediated inhibition of angiogenesis*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e46625.
392. Moser, M., et al., *Glucocorticoids down-regulate dendritic cell function in vitro and in vivo*. Eur J Immunol, 1995. **25**(10): p. 2818-24.
393. Kim, K.D., et al., *Inhibition of glucocorticoid-mediated, caspase-independent dendritic cell death by CD40 activation*. J Leukoc Biol, 2001. **69**(3): p. 426-34.
394. Cumberbatch, M., R.J. Dearman, and I. Kimber, *Inhibition by dexamethasone of Langerhans cell migration: influence of epidermal cytokine signals*. Immunopharmacology, 1999. **41**(3): p. 235-43.
395. Kitajima, T., et al., *A novel mechanism of glucocorticoid-induced immune suppression: the inhibition of T cell-mediated terminal maturation of a murine dendritic cell line*. J Clin Invest, 1996. **98**(1): p. 142-7.
396. Matyszak, M.K., et al., *Differential effects of corticosteroids during different stages of dendritic cell maturation*. Eur J Immunol, 2000. **30**(4): p. 1233-42.
397. Rutella, S., S. Danese, and G. Leone, *Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age*. Blood, 2006. **108**(5): p. 1435-40.
398. Chamorro, S., et al., *TLR triggering on tolerogenic dendritic cells results in TLR2 up-regulation and a reduced proinflammatory immune program*. J Immunol, 2009. **183**(5): p. 2984-94.

399. Pedersen, A.E., et al., *Dexamethasone/1alpha-25-dihydroxyvitamin D3-treated dendritic cells suppress colitis in the SCID T-cell transfer model*. Immunology, 2009. **127**(3): p. 354-64.
400. Ogawa, S., et al., *Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors*. Cell, 2005. **122**(5): p. 707-21.
401. Varga, G., et al., *Glucocorticoids induce an activated, anti-inflammatory monocyte subset in mice that resembles myeloid-derived suppressor cells*. J Leukoc Biol, 2008. **84**(3): p. 644-50.
402. Stroncek, D.F., et al., *Administration of G-CSF plus dexamethasone produces greater granulocyte concentrate yields while causing no more donor toxicity than G-CSF alone*. Transfusion, 2001. **41**(8): p. 1037-44.
403. Purton, J.F., et al., *Intrathymic T cell development and selection proceeds normally in the absence of glucocorticoid receptor signaling*. Immunity, 2000. **13**(2): p. 179-86.
404. Brewer, J.A., et al., *Thymocyte apoptosis induced by T cell activation is mediated by glucocorticoids in vivo*. J Immunol, 2002. **169**(4): p. 1837-43.
405. Stephens, G.L., J.D. Ashwell, and L. Ignatowicz, *Mutually antagonistic signals regulate selection of the T cell repertoire*. Int Immunol, 2003. **15**(5): p. 623-32.
406. Vacchio, M.S., J.Y. Lee, and J.D. Ashwell, *Thymus-derived glucocorticoids set the thresholds for thymocyte selection by inhibiting TCR-mediated thymocyte activation*. J Immunol, 1999. **163**(3): p. 1327-33.
407. Lowenberg, M., et al., *Rapid immunosuppressive effects of glucocorticoids mediated through Lck and Fyn*. Blood, 2005. **106**(5): p. 1703-10.
408. Lowenberg, M., et al., *Glucocorticoids cause rapid dissociation of a T-cell-receptor-associated protein complex containing LCK and FYN*. EMBO Rep, 2006. **7**(10): p. 1023-9.
409. Brewer, J.A., et al., *T-cell glucocorticoid receptor is required to suppress COX-2-mediated lethal immune activation*. Nat Med, 2003. **9**(10): p. 1318-22.
410. Baschant, U. and J. Tuckermann, *The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2010. **120**(2-3): p. 69-75.
411. Chen, X., et al., *Differential response of murine CD4+CD25+ and CD4+CD25- T cells to dexamethasone-induced cell death*. Eur J Immunol, 2004. **34**(3): p. 859-69.
412. Kang, Y., et al., *Cutting edge: Immunosuppressant as adjuvant for tolerogenic immunization*. J Immunol, 2008. **180**(8): p. 5172-6.
413. Noti, M., D. Sidler, and T. Brunner, *Extra-adrenal glucocorticoid synthesis in the intestinal epithelium: more than a drop in the ocean?* Semin Immunopathol, 2009. **31**(2): p. 237-48.
414. Mittelstadt, P.R., J.P. Monteiro, and J.D. Ashwell, *Thymocyte responsiveness to endogenous glucocorticoids is required for immunological fitness*. J Clin Invest, 2012. **122**(7): p. 2384-94.
415. el Marjou, F., et al., *Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium*. Genesis, 2004. **39**(3): p. 186-93.

416. Chassaing, B., et al., *Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice*. *Curr Protoc Immunol*, 2014. **104**: p. Unit 15 25.
417. Bryan, N.S. and M.B. Grisham, *Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples*. *Free Radic Biol Med*, 2007. **43**(5): p. 645-57.
418. Krawisz, J.E., P. Sharon, and W.F. Stenson, *Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models*. *Gastroenterology*, 1984. **87**(6): p. 1344-50.
419. Sanchez de Medina, F., et al., *Induction of alkaline phosphatase in the inflamed intestine: a novel pharmacological target for inflammatory bowel disease*. *Biochem Pharmacol*, 2004. **68**(12): p. 2317-26.
420. Vilaseca, J., et al., *Dietary fish oil reduces progression of chronic inflammatory lesions in a rat model of granulomatous colitis*. *Gut*, 1990. **31**(5): p. 539-44.
421. Weigmann, B., et al., *Isolation and subsequent analysis of murine lamina propria mononuclear cells from colonic tissue*. *Nat Protoc*, 2007. **2**(10): p. 2307-11.
422. Mucida, D., et al., *Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid*. *Science*, 2007. **317**(5835): p. 256-60.
423. Mucida, D., et al., *Transcriptional reprogramming of mature CD4(+) helper T cells generates distinct MHC class II-restricted cytotoxic T lymphocytes*. *Nat Immunol*, 2013. **14**(3): p. 281-9.
424. Mucida, D. and H. Cheroutre, *TGFbeta and retinoic acid intersect in immune-regulation*. *Cell Adh Migr*, 2007. **1**(3): p. 142-4.
425. Denning, T.L., et al., *Mouse TCRalpha+CD8alpha intraepithelial lymphocytes express genes that down-regulate their antigen reactivity and suppress immune responses*. *J Immunol*, 2007. **178**(7): p. 4230-9.
426. Boivin, M.A., et al., *Mechanism of glucocorticoid regulation of the intestinal tight junction barrier*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007. **292**(2): p. G590-8.
427. Fischer, A., et al., *Glucocorticoids regulate barrier function and claudin expression in intestinal epithelial cells via MKP-1*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2014. **306**(3): p. G218-28.
1. Addison, T., *On the constitutional and local effects of disease of the suprarenal capsule*, in *A collection of the published writings of the late Thomas Addison MD*. 1868: London : the New Sydenham Society.
2. Laryea, G., et al., *Dissection of glucocorticoid receptor-mediated inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by gene targeting in mice*. *Front Neuroendocrinol*, 2015. **36C**: p. 150-164.
3. Turnbull, A.V. and C.L. Rivier, *Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action*. *Physiol Rev*, 1999. **79**(1): p. 1-71.
4. Bornstein, S.R., et al., *Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human adrenals*. *Horm Metab Res*, 2004. **36**(7): p. 470-3.

5. Bornstein, S.R., et al., *The role of toll-like receptors in the immune-adrenal crosstalk*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1088**: p. 307-18.
6. Wieck, A., et al., *Differential neuroendocrine and immune responses to acute psychosocial stress in women with type 1 bipolar disorder*. Brain Behav Immun, 2013. **34**: p. 47-55.
7. Steigbigel, N.H., *Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock*. Curr Infect Dis Rep, 2003. **5**(5): p. 363-364.
8. Chatterjee, S., et al., *Synergistic therapeutic potential of dexamethasone and L-arginine in lipopolysaccharide-induced septic shock*. J Surg Res, 2007. **140**(1): p. 99-108.
9. Krakauer, T. and M. Buckley, *Dexamethasone attenuates staphylococcal enterotoxin B-induced hypothermic response and protects mice from superantigen-induced toxic shock*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(1): p. 391-5.
10. Medzhitov, R., *Septic shock: on the importance of being tolerant*. Immunity, 2013. **39**(5): p. 799-800.
11. Bornstein, S.R. and J. Briegel, *A new role for glucocorticoids in septic shock: balancing the immune response*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. **167**(4): p. 485-6.
12. Chrousos, G.P., *Stress and disorders of the stress system*. Nat Rev Endocrinol, 2009. **5**(7): p. 374-81.
13. Mayer, E.A., et al., *V. Stress and irritable bowel syndrome*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **280**(4): p. G519-24.
14. Anagnostis, P., et al., *11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitors: novel agents for the treatment of metabolic syndrome and obesity-related disorders?* Metabolism, 2013. **62**(1): p. 21-33.
15. Bujalska, I.J., S. Kumar, and P.M. Stewart, *Does central obesity reflect "Cushing's disease of the omentum"?* Lancet, 1997. **349**(9060): p. 1210-3.
16. Tomlinson, J.W., et al., *Inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity in vivo limits glucocorticoid exposure to human adipose tissue and decreases lipolysis*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(3): p. 857-64.
17. Tomlinson, J.W., et al., *Weight loss increases 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression in human adipose tissue*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(6): p. 2711-6.
18. Feig, P.U., et al., *Effects of an 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor, MK-0916, in patients with type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome*. Diabetes Obes Metab, 2011. **13**(6): p. 498-504.
19. Tomlinson, J.W., et al., *11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a tissue-specific regulator of glucocorticoid response*. Endocr Rev, 2004. **25**(5): p. 831-66.
20. Chapman, K., M. Holmes, and J. Seckl, *11beta-hydroxysteroid dehydrogenases: intracellular gate-keepers of tissue glucocorticoid action*. Physiol Rev, 2013. **93**(3): p. 1139-206.



21. Edwards, C.R., et al., *Localisation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase--tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor*. Lancet, 1988. **2**(8618): p. 986-9.
22. Whorwood, C.B., M.L. Ricketts, and P.M. Stewart, *Epithelial cell localization of type 2 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in rat and human colon*. Endocrinology, 1994. **135**(6): p. 2533-41.
23. Fukushima, K., et al., *Aldosterone enhances 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in colonic epithelial cells in vivo*. Scand J Gastroenterol, 2005. **40**(7): p. 850-7.
24. Zbankova, S., et al., *11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 and 2 expression in colon from patients with ulcerative colitis*. J Gastroenterol Hepatol, 2007. **22**(7): p. 1019-23.
25. Hammond, G.L., et al., *Primary structure of human corticosteroid binding globulin, deduced from hepatic and pulmonary cDNAs, exhibits homology with serine protease inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(15): p. 5153-7.
26. Mendel, C.M., *The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model*. Endocr Rev, 1989. **10**(3): p. 232-74.
27. Pemberton, P.A., et al., *Hormone binding globulins undergo serpin conformational change in inflammation*. Nature, 1988. **336**(6196): p. 257-8.
28. Singer, C.J., M.S. Khan, and W. Rosner, *Characteristics of the binding of corticosteroid-binding globulin to rat cell membranes*. Endocrinology, 1988. **122**(1): p. 89-96.
29. Strel'chyonok, O.A. and G.V. Avvakumov, *Interaction of human CBG with cell membranes*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1991. **40**(4-6): p. 795-803.
30. Jitrapakdee, S., *Transcription factors and coactivators controlling nutrient and hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis*. Int J Biochem Cell Biol, 2012. **44**(1): p. 33-45.
31. Hwang, J.L. and R.E. Weiss, *Steroid-induced diabetes: a clinical and molecular approach to understanding and treatment*. Diabetes Metab Res Rev, 2014. **30**(2): p. 96-102.
32. Lee, M.J., et al., *Deconstructing the roles of glucocorticoids in adipose tissue biology and the development of central obesity*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1842**(3): p. 473-81.
33. Geer, E.B., J. Islam, and C. Buettner, *Mechanisms of glucocorticoid-induced insulin resistance: focus on adipose tissue function and lipid metabolism*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2014. **43**(1): p. 75-102.
34. Pimenta, E., M. Wolley, and M. Stowasser, *Adverse cardiovascular outcomes of corticosteroid excess*. Endocrinology, 2012. **153**(11): p. 5137-42.
35. Fardet, L., I. Petersen, and I. Nazareth, *Risk of cardiovascular events in people prescribed glucocorticoids with iatrogenic Cushing's syndrome: cohort study*. BMJ, 2012. **345**: p. e4928.
36. Johannsson, G. and O. Ragnarsson, *Cardiovascular and metabolic impact of glucocorticoid replacement therapy*. Front Horm Res, 2014. **43**: p. 33-44.

37. Nussinovitch, U., et al., *Glucocorticoids and the cardiovascular system: state of the art*. *Curr Pharm Des*, 2010. **16**(32): p. 3574-85.
38. Hanaoka, B.Y., et al., *Implications of glucocorticoid therapy in idiopathic inflammatory myopathies*. *Nat Rev Rheumatol*, 2012. **8**(8): p. 448-57.
39. Kuo, T., et al., *Genome-wide analysis of glucocorticoid receptor-binding sites in myotubes identifies gene networks modulating insulin signaling*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(28): p. 11160-5.
40. Larsson, L., et al., *Acute quadriplegia and loss of muscle myosin in patients treated with nondepolarizing neuromuscular blocking agents and corticosteroids: mechanisms at the cellular and molecular levels*. *Crit Care Med*, 2000. **28**(1): p. 34-45.
41. Hanaoka, B.Y., C.A. Peterson, and L.J. Crofford, *Glucocorticoid effects on skeletal muscle: benefit and risk in patients with autoimmune inflammatory rheumatoid diseases*. *Expert Rev Clin Immunol*, 2012. **8**(8): p. 695-7.
42. Goldstein, M.F., J.J. Fallon, Jr., and R. Harning, *Chronic glucocorticoid therapy-induced osteoporosis in patients with obstructive lung disease*. *Chest*, 1999. **116**(6): p. 1733-49.
43. Pearce, G., et al., *The deleterious effects of low-dose corticosteroids on bone density in patients with polymyalgia rheumatica*. *Br J Rheumatol*, 1998. **37**(3): p. 292-9.
44. Silva, E.J., et al., *Innate immunity and glucocorticoids: potential regulatory mechanisms in epididymal biology*. *J Androl*, 2011. **32**(6): p. 614-24.
45. Moisiadis, V.G. and S.G. Matthews, *Glucocorticoids and fetal programming part 2: Mechanisms*. *Nat Rev Endocrinol*, 2014. **10**(7): p. 403-11.
46. Harris, A. and J. Seckl, *Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease*. *Horm Behav*, 2011. **59**(3): p. 279-89.
47. Manwani, N., et al., *Reduced viability of mice with lung epithelial-specific knockout of glucocorticoid receptor*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2010. **43**(5): p. 599-606.
48. Sevilla, L.M., et al., *Epidermal inactivation of the glucocorticoid receptor triggers skin barrier defects and cutaneous inflammation*. *J Invest Dermatol*, 2013. **133**(2): p. 361-70.
49. Hostettler, N., et al., *Local glucocorticoid production in the mouse lung is induced by immune cell stimulation*. *Allergy*, 2012. **67**(2): p. 227-34.
50. Gomez-Sanchez, E.P., et al., *Aldosterone synthesis in the brain contributes to Dahl salt-sensitive rat hypertension*. *Exp Physiol*, 2010. **95**(1): p. 120-30.
51. Ohtani, T., et al., *Elevated cardiac tissue level of aldosterone and mineralocorticoid receptor in diastolic heart failure: Beneficial effects of mineralocorticoid receptor blocker*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2007. **292**(2): p. R946-54.
52. Croft, A.P., et al., *Effects of minor laboratory procedures, adrenalectomy, social defeat or acute alcohol on regional brain concentrations of corticosterone*. *Brain Res*, 2008. **1238**: p. 12-22.
53. Taves, M.D., et al., *Steroid concentrations in plasma, whole blood and brain: effects of saline perfusion to remove blood contamination from brain*. *PLoS One*, 2010. **5**(12): p. e15727.

54. Pazirandeh, A., et al., *Paracrine glucocorticoid activity produced by mouse thymic epithelial cells*. FASEB J, 1999. **13**(8): p. 893-901.
55. Vacchio, M.S., V. Papadopoulos, and J.D. Ashwell, *Steroid production in the thymus: implications for thymocyte selection*. J Exp Med, 1994. **179**(6): p. 1835-46.
56. Slominski, A., et al., *A novel pathway for sequential transformation of 7-dehydrocholesterol and expression of the P450<sub>scc</sub> system in mammalian skin*. Eur J Biochem, 2004. **271**(21): p. 4178-88.
57. Cirillo, N. and S.S. Prime, *Keratinocytes synthesize and activate cortisol*. J Cell Biochem, 2011. **112**(6): p. 1499-505.
58. Hannen, R.F., et al., *Steroid synthesis by primary human keratinocytes; implications for skin disease*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **404**(1): p. 62-7.
59. Zmijewski, M.A. and A.T. Slominski, *Neuroendocrinology of the skin: An overview and selective analysis*. Dermatoendocrinol, 2011. **3**(1): p. 3-10.
60. Vukelic, S., et al., *Cortisol synthesis in epidermis is induced by IL-1 and tissue injury*. J Biol Chem, 2011. **286**(12): p. 10265-75.
61. Keeney, D.S., C.M. Jenkins, and M.R. Waterman, *Developmentally regulated expression of adrenal 17 alpha-hydroxylase cytochrome P450 in the mouse embryo*. Endocrinology, 1995. **136**(11): p. 4872-9.
62. Cima, I., et al., *Intestinal epithelial cells synthesize glucocorticoids and regulate T cell activation*. J Exp Med, 2004. **200**(12): p. 1635-46.
63. Atanasov, A.G., et al., *Cell cycle-dependent regulation of extra-adrenal glucocorticoid synthesis in murine intestinal epithelial cells*. FASEB J, 2008. **22**(12): p. 4117-25.
64. Mueller, M., et al., *The nuclear receptor LRH-1 critically regulates extra-adrenal glucocorticoid synthesis in the intestine*. J Exp Med, 2006. **203**(9): p. 2057-62.
65. Noti, M., et al., *Lipopolysaccharide induces intestinal glucocorticoid synthesis in a TNFalpha-dependent manner*. FASEB J, 2010. **24**(5): p. 1340-6.
66. Noti, M., et al., *TNF suppresses acute intestinal inflammation by inducing local glucocorticoid synthesis*. J Exp Med, 2010. **207**(5): p. 1057-66.
67. Mueller, M., et al., *Differential regulation of glucocorticoid synthesis in murine intestinal epithelial versus adrenocortical cell lines*. Endocrinology, 2007. **148**(3): p. 1445-53.
68. Val, P., et al., *SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues*. Nucl Recept, 2003. **1**(1): p. 8.
69. Fayard, E., J. Auwerx, and K. Schoonjans, *LRH-1: an orphan nuclear receptor involved in development, metabolism and steroidogenesis*. Trends Cell Biol, 2004. **14**(5): p. 250-60.
70. Brunner, T., et al., *Regulation of cell death and survival in intestinal intraepithelial lymphocytes*. Cell Death Differ, 2001. **8**(7): p. 706-14.
71. Botrugno, O.A., et al., *Synergy between LRH-1 and beta-catenin induces G1 cyclin-mediated cell proliferation*. Mol Cell, 2004. **15**(4): p. 499-509.

72. Oakley, R.H. and J.A. Cidlowski, *Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids*. J Biol Chem, 2011. **286**(5): p. 3177-84.
73. Lewis-Tuffin, L.J., et al., *Human glucocorticoid receptor beta binds RU-486 and is transcriptionally active*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(6): p. 2266-82.
74. Kino, T., Y.A. Su, and G.P. Chrousos, *Human glucocorticoid receptor isoform beta: recent understanding of its potential implications in physiology and pathophysiology*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(21): p. 3435-48.
75. Heck, S., et al., *A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription factor AP-1*. EMBO J, 1994. **13**(17): p. 4087-95.
76. Hakim, A., et al., *Importin-7 mediates glucocorticoid receptor nuclear import and is impaired by oxidative stress, leading to glucocorticoid insensitivity*. FASEB J, 2013. **27**(11): p. 4510-9.
77. Fant, M.E., J. Yeakley, and R.W. Harrison, *Evidence for carrier-mediated transport of glucocorticoids by human placental membrane vesicles*. Biochim Biophys Acta, 1983. **731**(3): p. 415-20.
78. Pratt, W.B., et al., *Chaperoning of glucocorticoid receptors*. Handb Exp Pharmacol, 2006(172): p. 111-38.
79. Tsai, S.Y., et al., *Molecular interactions of steroid hormone receptor with its enhancer element: evidence for receptor dimer formation*. Cell, 1988. **55**(2): p. 361-9.
80. Kadmiel, M. and J.A. Cidlowski, *Glucocorticoid receptor signaling in health and disease*. Trends Pharmacol Sci, 2013. **34**(9): p. 518-30.
81. Nixon, M., R. Andrew, and K.E. Chapman, *It takes two to tango: dimerisation of glucocorticoid receptor and its anti-inflammatory functions*. Steroids, 2013. **78**(1): p. 59-68.
82. Malkoski, S.P. and R.I. Dorin, *Composite glucocorticoid regulation at a functionally defined negative glucocorticoid response element of the human corticotropin-releasing hormone gene*. Mol Endocrinol, 1999. **13**(10): p. 1629-44.
83. Ray, A. and K.E. Prefontaine, *Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(2): p. 752-6.
84. De Bosscher, K., et al., *Glucocorticoid-mediated repression of nuclear factor-kappaB-dependent transcription involves direct interference with transactivation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(25): p. 13504-9.
85. Langlais, D., et al., *The Stat3/GR interaction code: predictive value of direct/indirect DNA recruitment for transcription outcome*. Mol Cell, 2012. **47**(1): p. 38-49.
86. Jonat, C., et al., *Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone*. Cell, 1990. **62**(6): p. 1189-204.
87. Schule, R., et al., *Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor*. Cell, 1990. **62**(6): p. 1217-26.

88. Tasker, J.G., S. Di, and R. Malcher-Lopes, *Minireview: Rapid Glucocorticoid Signaling via Membrane-Associated Receptors*. *Endocrinology*, 2006. **147**(12): p. 5549-5556.
89. Wang, C., Y. Liu, and J.-M. Cao, *G Protein-Coupled Receptors: Extranuclear Mediators for the Non-Genomic Actions of Steroids*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014. **15**(9): p. 15412-15425.
90. Ayroldi, E., et al., *Mechanisms of the anti-inflammatory effects of glucocorticoids: genomic and nongenomic interference with MAPK signaling pathways*. *FASEB J*, 2012. **26**(12): p. 4805-20.
91. Busillo, J.M. and J.A. Cidlowski, *The five Rs of glucocorticoid action during inflammation: ready, reinforce, repress, resolve, and restore*. *Trends Endocrinol Metab*, 2013. **24**(3): p. 109-19.
92. Savory, J.G., et al., *Glucocorticoid receptor homodimers and glucocorticoid-mineralocorticoid receptor heterodimers form in the cytoplasm through alternative dimerization interfaces*. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(3): p. 781-93.
93. Trapp, T., et al., *Heterodimerization between mineralocorticoid and glucocorticoid receptor: a new principle of glucocorticoid action in the CNS*. *Neuron*, 1994. **13**(6): p. 1457-62.
94. Liu, W., et al., *Steroid receptor heterodimerization demonstrated in vitro and in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(26): p. 12480-4.
95. Pepin, M.C., F. Pothier, and N. Barden, *Impaired type II glucocorticoid-receptor function in mice bearing antisense RNA transgene*. *Nature*, 1992. **355**(6362): p. 725-8.
96. Cole, T.J., et al., *Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation*. *Genes Dev*, 1995. **9**(13): p. 1608-21.
97. Bouabe, H. and K. Okkenhaug, *Gene targeting in mice: a review*. *Methods Mol Biol*, 2013. **1064**: p. 315-36.
98. Li, A., et al., *Deletion of mesenchymal glucocorticoid receptor attenuates embryonic lung development and abdominal wall closure*. *PLoS One*, 2013. **8**(5): p. e63578.
99. Habermehl, D., et al., *Glucocorticoid activity during lung maturation is essential in mesenchymal and less in alveolar epithelial cells*. *Mol Endocrinol*, 2011. **25**(8): p. 1280-8.
100. Goodwin, J.E., et al., *The glucocorticoid receptor in the distal nephron is not necessary for the development or maintenance of dexamethasone-induced hypertension*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. **394**(2): p. 266-71.
101. Goodwin, J.E., et al., *Knockout of the vascular endothelial glucocorticoid receptor abrogates dexamethasone-induced hypertension*. *J Hypertens*, 2011. **29**(7): p. 1347-56.
102. Sainte-Marie, Y., et al., *Conditional glucocorticoid receptor expression in the heart induces atrio-ventricular block*. *FASEB J*, 2007. **21**(12): p. 3133-41.

103. Watson, M.L., et al., *A cell-autonomous role for the glucocorticoid receptor in skeletal muscle atrophy induced by systemic glucocorticoid exposure*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2012. **302**(10): p. E1210-20.
104. Rauch, A., et al., *Glucocorticoids suppress bone formation by attenuating osteoblast differentiation via the monomeric glucocorticoid receptor*. *Cell Metab*, 2010. **11**(6): p. 517-31.
105. Preusch, M.R., et al., *Critical role of macrophages in glucocorticoid driven vascular calcification in a mouse-model of atherosclerosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. **28**(12): p. 2158-64.
106. Baschant, U., et al., *Glucocorticoid therapy of antigen-induced arthritis depends on the dimerized glucocorticoid receptor in T cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(48): p. 19317-22.
107. Rose, A.J., et al., *Molecular control of systemic bile acid homeostasis by the liver glucocorticoid receptor*. *Cell Metab*, 2011. **14**(1): p. 123-30.
108. Gesina, E., et al., *Dissecting the role of glucocorticoids on pancreas development*. *Diabetes*, 2004. **53**(9): p. 2322-9.
109. Mueller, K.M., et al., *Adipocyte Glucocorticoid Receptor Deficiency Attenuates Aging- and Hfd-Induced Obesity, and Impairs the Feeding-Fasting Transition*. *Diabetes*, 2016.
110. Sevilla, L.M., et al., *Glucocorticoid receptor and Klf4 co-regulate anti-inflammatory genes in keratinocytes*. *Mol Cell Endocrinol*, 2015.
111. Sanchis, A., et al., *Keratinocyte-targeted overexpression of the glucocorticoid receptor delays cutaneous wound healing*. *PLoS One*, 2012. **7**(1): p. e29701.
112. Reichardt, S.D., et al., *Glucocorticoids enhance intestinal glucose uptake via the dimerized glucocorticoid receptor in enterocytes*. *Endocrinology*, 2012. **153**(4): p. 1783-94.
113. Reichardt, S.D., et al., *Glucocorticoids induce gastroparesis in mice through depletion of l-arginine*. *Endocrinology*, 2014. **155**(10): p. 3899-908.
114. Baumgart, D.C. and S.R. Carding, *Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology*. *Lancet*, 2007. **369**(9573): p. 1627-40.
115. Kelly, J.K. and T.O. Siu, *The strictures, sinuses, and fissures of Crohn's disease*. *J Clin Gastroenterol*, 1986. **8**(5): p. 594-8.
116. Lohsiriwat, V. and S.K. Clark, *Persistent perineal sinus after ileoanal pouch excision in inflammatory bowel diseases: incidence, risk factors, and clinical course*. *Dis Colon Rectum*, 2008. **51**(12): p. 1795-9.
117. Cheung, O. and M.D. Regueiro, *Inflammatory bowel disease emergencies*. *Gastroenterol Clin North Am*, 2003. **32**(4): p. 1269-88.
118. Brahme, F. and C. Lindstrom, *A comparative radiographic and pathological study of intestinal vaso-architecture in Crohn's disease and in ulcerative colitis*. *Gut*, 1970. **11**(11): p. 928-40.
119. Bolondi, L., et al., *Changes in splanchnic hemodynamics in inflammatory bowel disease. Non-invasive assessment by Doppler ultrasound flowmetry*. *Scand J Gastroenterol*, 1992. **27**(6): p. 501-7.

120. Lott, M.F. and J.D. Davies, *Lymph node hypervascularity: haemangiomatoid lesions and pan-nodal vasodilatation*. J Pathol, 1983. **140**(3): p. 209-19.
121. Mortensen, N., *Fulminant acute and diffuse chronic ulcerative colitis--the argument for surgery*. Acta Gastroenterol Belg, 2000. **63**(3): p. 289.
122. Wong, C.K. and B.R. Yacyshyn, *Fulminant Ulcerative Colitis*. Curr Treat Options Gastroenterol, 2000. **3**(3): p. 217-226.
123. Geboes, K., et al., *Indeterminate colitis: a review of the concept--what's in a name?* Inflamm Bowel Dis, 2008. **14**(6): p. 850-7.
124. Rose, J.D., et al., *Cardiff Crohn's disease jubilee: the incidence over 50 years*. Gut, 1988. **29**(3): p. 346-51.
125. Garland, C.F., et al., *Incidence rates of ulcerative colitis and Crohn's disease in fifteen areas of the United States*. Gastroenterology, 1981. **81**(6): p. 1115-24.
126. Bonnevie, O., *A socio-economic study of patients with ulcerative colitis*. Scand J Gastroenterol, 1967. **2**(2): p. 129-36.
127. Gent, A.E., et al., *Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy*. Lancet, 1994. **343**(8900): p. 766-7.
128. Kull, K., et al., *Antineutrophil cytoplasmic antibodies in Estonian patients with inflammatory bowel disease. Prevalence and diagnostic role*. Hepatogastroenterology, 1998. **45**(24): p. 2132-7.
129. Ihasz, M., et al., *Surgical relations of Crohn's disease and the frequency of recurrence*. Acta Chir Hung, 1995. **35**(1-2): p. 63-75.
130. Sonnenberg, A., *Date of birth in the occurrence of inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 2009. **15**(2): p. 206-11.
131. Kugathasan, S., et al., *Epidemiologic and clinical characteristics of children with newly diagnosed inflammatory bowel disease in Wisconsin: a statewide population-based study*. J Pediatr, 2003. **143**(4): p. 525-31.
132. Ekblom, A., et al., *The epidemiology of inflammatory bowel disease: a large, population-based study in Sweden*. Gastroenterology, 1991. **100**(2): p. 350-8.
133. Karlinger, K., et al., *The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease*. Eur J Radiol, 2000. **35**(3): p. 154-67.
134. Segal, I., et al., *The rarity of ulcerative colitis in South African blacks*. Am J Gastroenterol, 1980. **74**(4): p. 332-6.
135. Roth, M.P., et al., *Geographic origins of Jewish patients with inflammatory bowel disease*. Gastroenterology, 1989. **97**(4): p. 900-4.
136. Zhang, W., et al., *Extended haplotype association study in Crohn's disease identifies a novel, Ashkenazi Jewish-specific missense mutation in the NF-kappaB pathway gene, HEATR3*. Genes Immun, 2013. **14**(5): p. 310-6.
137. Kenny, E.E., et al., *A genome-wide scan of Ashkenazi Jewish Crohn's disease suggests novel susceptibility loci*. PLoS Genet, 2012. **8**(3): p. e1002559.
138. El-Tawil, A.M., *Jews and inflammatory bowel disease*. J Gastrointest Liver Dis, 2009. **18**(2): p. 137-8.

139. Chiodini, R.J., et al., *Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease. I. An unclassified Mycobacterium species isolated from patients with Crohn's disease*. Dig Dis Sci, 1984. **29**(12): p. 1073-9.
140. Miranda-Bautista, J., et al., *Listeria monocytogenes infection in inflammatory bowel disease patients: case series and review of the literature*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2014. **26**(11): p. 1247-52.
141. Parent, K. and P. Mitchell, *Cell wall-defective variants of pseudomonas-like (group Va) bacteria in Crohn's disease*. Gastroenterology, 1978. **75**(3): p. 368-72.
142. Kangro, H.O., et al., *A prospective study of viral and mycoplasma infections in chronic inflammatory bowel disease*. Gastroenterology, 1990. **98**(3): p. 549-53.
143. Momotani, E., et al., *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis lipophilic antigen causes Crohn's disease-type necrotizing colitis in Mice*. Springerplus, 2012. **1**(1): p. 47.
144. Burke, D.A. and A.T. Axon, *Adhesive Escherichia coli in inflammatory bowel disease and infective diarrhoea*. BMJ, 1988. **297**(6641): p. 102-4.
145. Ohkusa, T., et al., *Fusobacterium varium localized in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis stimulates species-specific antibody*. J Gastroenterol Hepatol, 2002. **17**(8): p. 849-53.
146. Darfeuille-Michaud, A., et al., *Presence of adherent Escherichia coli strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease*. Gastroenterology, 1998. **115**(6): p. 1405-13.
147. Negroni, A., et al., *Characterization of adherent-invasive Escherichia coli isolated from pediatric patients with inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 2012. **18**(5): p. 913-24.
148. Higgins, P.D., et al., *Prior Helicobacter pylori infection ameliorates Salmonella typhimurium-induced colitis: mucosal crosstalk between stomach and distal intestine*. Inflamm Bowel Dis, 2011. **17**(6): p. 1398-408.
149. Fukuda, Y., et al., *Helicobacter pylori infection increases mucosal permeability of the stomach and intestine*. Digestion, 2001. **63 Suppl 1**: p. 93-6.
150. Kirsner, J.B. and J.A. Spencer, *Family Occurrences of Ulcerative Colitis, Regional Enteritis, and Ileocolitis*. Ann Intern Med, 1963. **59**: p. 133-44.
151. Saro Gismera, C., et al., *[Epidemiology of chronic inflammatory bowel disease in Gijón, Asturias]*. Gastroenterol Hepatol, 2001. **24**(5): p. 228-35.
152. Weterman, I.T. and A.S. Pena, *Familial incidence of Crohn's disease in The Netherlands and a review of the literature*. Gastroenterology, 1984. **86**(3): p. 449-52.
153. McConnell, R.B., *Ulcerative colitis--genetic features*. Scand J Gastroenterol Suppl, 1983. **88**: p. 14-6.
154. Tysk, C., et al., *Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking*. Gut, 1988. **29**(7): p. 990-6.



155. Halfvarson, J., et al., *Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics*. *Gastroenterology*, 2003. **124**(7): p. 1767-73.
156. Thompson, N.P., et al., *Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study*. *BMJ*, 1996. **312**(7023): p. 95-6.
157. Franke, A., et al., *Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci*. *Nat Genet*, 2010. **42**(12): p. 1118-25.
158. Ohmen, J.D., et al., *Susceptibility locus for inflammatory bowel disease on chromosome 16 has a role in Crohn's disease, but not in ulcerative colitis*. *Hum Mol Genet*, 1996. **5**(10): p. 1679-83.
159. Economou, M., et al., *Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis*. *Am J Gastroenterol*, 2004. **99**(12): p. 2393-404.
160. Fernandez, L., et al., *IBD1 and IBD3 determine location of Crohn's disease in the Spanish population*. *Inflamm Bowel Dis*, 2004. **10**(6): p. 715-22.
161. Libioulle, C., et al., *Novel Crohn disease locus identified by genome-wide association maps to a gene desert on 5p13.1 and modulates expression of PTGER4*. *PLoS Genet*, 2007. **3**(4): p. e58.
162. Schmechel, S., et al., *Linking genetic susceptibility to Crohn's disease with Th17 cell function: IL-22 serum levels are increased in Crohn's disease and correlate with disease activity and IL23R genotype status*. *Inflamm Bowel Dis*, 2008. **14**(2): p. 204-12.
163. Glas, J., et al., *rs1004819 is the main disease-associated IL23R variant in German Crohn's disease patients: combined analysis of IL23R, CARD15, and OCTN1/2 variants*. *PLoS One*, 2007. **2**(9): p. e819.
164. Cox, J.H., et al., *Opposing consequences of IL-23 signaling mediated by innate and adaptive cells in chemically induced colitis in mice*. *Mucosal Immunol*, 2012. **5**(1): p. 99-109.
165. Kamada, N., et al., *Abnormally differentiated subsets of intestinal macrophage play a key role in Th1-dominant chronic colitis through excess production of IL-12 and IL-23 in response to bacteria*. *J Immunol*, 2005. **175**(10): p. 6900-8.
166. Jostins, L., et al., *Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease*. *Nature*, 2012. **491**(7422): p. 119-24.
167. Franke, A., et al., *Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility*. *Nat Genet*, 2008. **40**(11): p. 1319-23.
168. Prescott, N.J., et al., *A nonsynonymous SNP in ATG16L1 predisposes to ileal Crohn's disease and is independent of CARD15 and IBD5*. *Gastroenterology*, 2007. **132**(5): p. 1665-71.
169. Cadwell, K., et al., *A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells*. *Nature*, 2008. **456**(7219): p. 259-63.
170. Van Limbergen, J., G. Radford-Smith, and J. Satsangi, *Advances in IBD genetics*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2014. **11**(6): p. 372-85.

171. Liang, J., S.M. Sha, and K.C. Wu, *Role of the intestinal microbiota and fecal transplantation in inflammatory bowel diseases*. J Dig Dis, 2014. **15**(12): p. 641-6.
172. Machiels, K., et al., *A decrease of the butyrate-producing species Roseburia hominis and Faecalibacterium prausnitzii defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis*. Gut, 2014. **63**(8): p. 1275-83.
173. Sha, S., et al., *The biodiversity and composition of the dominant fecal microbiota in patients with inflammatory bowel disease*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2013. **75**(3): p. 245-51.
174. Swidsinski, A., et al., *Mucosal flora in inflammatory bowel disease*. Gastroenterology, 2002. **122**(1): p. 44-54.
175. Swidsinski, A., et al., *Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(7): p. 3380-9.
176. Frank, D.N., et al., *Disease phenotype and genotype are associated with shifts in intestinal-associated microbiota in inflammatory bowel diseases*. Inflamm Bowel Dis, 2011. **17**(1): p. 179-84.
177. Riol-Blanco, L., et al., *IL-23 receptor regulates unconventional IL-17-producing T cells that control bacterial infections*. J Immunol, 2010. **184**(4): p. 1710-20.
178. Goyal, R.K. and I. Hirano, *The enteric nervous system*. N Engl J Med, 1996. **334**(17): p. 1106-15.
179. Rao, S.S., et al., *Psychological and physical stress induce differential effects on human colonic motility*. Am J Gastroenterol, 1998. **93**(6): p. 985-90.
180. Enck, P., et al., *Stress effects on gastrointestinal transit in the rat*. Gut, 1989. **30**(4): p. 455-9.
181. Barclay, G.R. and L.A. Turnberg, *Effect of psychological stress on salt and water transport in the human jejunum*. Gastroenterology, 1987. **93**(1): p. 91-7.
182. Wallon, C., et al., *Corticotropin-releasing hormone (CRH) regulates macromolecular permeability via mast cells in normal human colonic biopsies in vitro*. Gut, 2008. **57**(1): p. 50-8.
183. Wik, M., et al., *Corticotropin-releasing hormone antagonists possess anti-inflammatory effects in the mouse ileum*. Gastroenterology, 2002. **123**(2): p. 505-15.
184. Reber, S.O., et al., *Chronic intermittent psychosocial stress (social defeat/overcrowding) in mice increases the severity of an acute DSS-induced colitis and impairs regeneration*. Endocrinology, 2006. **147**(10): p. 4968-76.
185. Reber, S.O., et al., *Aggravation of DSS-induced colitis after chronic subordinate colony (CSC) housing is partially mediated by adrenal mechanisms*. Stress, 2008. **11**(3): p. 225-34.
186. Matsunaga, H., et al., *Physiological stress exacerbates murine colitis by enhancing proinflammatory cytokine expression that is dependent on IL-18*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2011. **301**(3): p. G555-64.
187. Schwarz, S.P. and E.B. Blanchard, *Evaluation of a psychological treatment for inflammatory bowel disease*. Behav Res Ther, 1991. **29**(2): p. 167-77.

188. Jantschek, G., et al., *Effect of psychotherapy on the course of Crohn's disease. Results of the German prospective multicenter psychotherapy treatment study on Crohn's disease. German Study Group on Psychosocial Intervention in Crohn's Disease.* Scand J Gastroenterol, 1998. **33**(12): p. 1289-96.
189. Keller, W., et al., *Effect of psychotherapy and relaxation on the psychosocial and somatic course of Crohn's disease: main results of the German Prospective Multicenter Psychotherapy Treatment study on Crohn's Disease.* J Psychosom Res, 2004. **56**(6): p. 687-96.
190. Persson, P.G., A. Ahlbom, and G. HELLERS, *Diet and inflammatory bowel disease: a case-control study.* Epidemiology, 1992. **3**(1): p. 47-52.
191. Russel, M.G., et al., *Modern life' in the epidemiology of inflammatory bowel disease: a case-control study with special emphasis on nutritional factors.* Eur J Gastroenterol Hepatol, 1998. **10**(3): p. 243-9.
192. Shoda, R., et al., *Epidemiologic analysis of Crohn disease in Japan: increased dietary intake of n-6 polyunsaturated fatty acids and animal protein relates to the increased incidence of Crohn disease in Japan.* Am J Clin Nutr, 1996. **63**(5): p. 741-5.
193. Geerling, B.J., et al., *Diet as a risk factor for the development of ulcerative colitis.* Am J Gastroenterol, 2000. **95**(4): p. 1008-13.
194. Endres, S., et al., *Dietary supplementation with n-3 fatty acids suppresses interleukin-2 production and mononuclear cell proliferation.* J Leukoc Biol, 1993. **54**(6): p. 599-603.
195. Meydani, S.N., et al., *Oral (n-3) fatty acid supplementation suppresses cytokine production and lymphocyte proliferation: comparison between young and older women.* J Nutr, 1991. **121**(4): p. 547-55.
196. Endres, S., et al., *The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells.* N Engl J Med, 1989. **320**(5): p. 265-71.
197. Kim, Y.I., *Short-chain fatty acids in ulcerative colitis.* Nutr Rev, 1998. **56**(1 Pt 1): p. 17-24.
198. Belluzzi, A., et al., *Effect of an enteric-coated fish-oil preparation on relapses in Crohn's disease.* N Engl J Med, 1996. **334**(24): p. 1557-60.
199. Bergstrand, O. and G. HELLERS, *Breast-feeding during infancy in patients who later develop Crohn's disease.* Scand J Gastroenterol, 1983. **18**(7): p. 903-6.
200. Acheson, E.D. and S.C. True Love, *Early weaning in the aetiology of ulcerative colitis. A study of feeding in infancy in cases and controls.* Br Med J, 1961. **2**(5257): p. 929-33.
201. Hennet, T., A. Weiss, and L. Borsig, *Decoding breast milk oligosaccharides.* Swiss Med Wkly, 2014. **144**: p. w13927.
202. Penttila, I.A., *Milk-derived transforming growth factor-beta and the infant immune response.* J Pediatr, 2010. **156**(2 Suppl): p. S21-5.
203. Vidal, K. and A. Donnet-Hughes, *CD14: a soluble pattern recognition receptor in milk.* Adv Exp Med Biol, 2008. **606**: p. 195-216.

204. Cleary, T.G., *Human milk protective mechanisms*. Adv Exp Med Biol, 2004. **554**: p. 145-54.
205. Bergmann, H., et al., *Probiotics in human milk and probiotic supplementation in infant nutrition: a workshop report*. Br J Nutr, 2014. **112**(7): p. 1119-28.
206. Tanabe, S., *Short peptide modules for enhancing intestinal barrier function*. Curr Pharm Des, 2012. **18**(6): p. 776-81.
207. Kotler, B.M., J.E. Kerstetter, and K.L. Insogna, *Claudins, dietary milk proteins, and intestinal barrier regulation*. Nutr Rev, 2013. **71**(1): p. 60-5.
208. Binder, J.H., et al., *Intolerance to milk in ulcerative colitis. A preliminary report*. Am J Dig Dis, 1966. **11**(11): p. 858-64.
209. Lerner, A., et al., *Serum antibodies to cow's milk proteins in pediatric inflammatory bowel disease: Crohn's disease vs. ulcerative colitis*. Acta Paediatr Scand, 1989. **78**(1): p. 81-6.
210. Harries, A.D., A. Baird, and J. Rhodes, *Non-smoking: a feature of ulcerative colitis*. Br Med J (Clin Res Ed), 1982. **284**(6317): p. 706.
211. Rampton, D.S., *Smoking and ulcerative colitis*. Lancet, 1984. **1**(8369): p. 168.
212. Srivasta, E.D., et al., *Smoking and ulcerative colitis: a community study*. Int J Colorectal Dis, 1993. **8**(2): p. 71-4.
213. Franceschi, S., et al., *Nonspecific inflammatory bowel disease and smoking*. Am J Epidemiol, 1987. **125**(3): p. 445-52.
214. Benoni, C. and A. Nilsson, *Smoking habits in patients with inflammatory bowel disease. A case-control study*. Scand J Gastroenterol, 1987. **22**(9): p. 1130-6.
215. Benoni, C. and A. Nilsson, *Smoking habits in patients with inflammatory bowel disease*. Scand J Gastroenterol, 1984. **19**(6): p. 824-30.
216. Cottone, M., et al., *Smoking habits and recurrence in Crohn's disease*. Gastroenterology, 1994. **106**(3): p. 643-8.
217. Sher, M.E., et al., *The influence of cigarette smoking on cytokine levels in patients with inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 1999. **5**(2): p. 73-8.
218. Motley, R.J., et al., *Smoking, eicosanoids and ulcerative colitis*. J Pharm Pharmacol, 1990. **42**(4): p. 288-9.
219. van Dijk, A.P., et al., *Transdermal nicotine inhibits interleukin 2 synthesis by mononuclear cells derived from healthy volunteers*. Eur J Clin Invest, 1998. **28**(8): p. 664-71.
220. Rutgeerts, P., et al., *Appendectomy protects against ulcerative colitis*. Gastroenterology, 1994. **106**(5): p. 1251-3.
221. Mizoguchi, A., et al., *Role of appendix in the development of inflammatory bowel disease in TCR-alpha mutant mice*. J Exp Med, 1996. **184**(2): p. 707-15.
222. Duggan, A.E., et al., *Appendicectomy, childhood hygiene, Helicobacter pylori status, and risk of inflammatory bowel disease: a case control study*. Gut, 1998. **43**(4): p. 494-8.
223. Ekblom, A., *Appendicectomy and childhood hygiene: different sides of the same coin?* Gut, 1998. **43**(4): p. 451.

224. Radford-Smith, G.L., et al., *Protective role of appendectomy on onset and severity of ulcerative colitis and Crohn's disease*. Gut, 2002. **51**(6): p. 808-13.
225. Cosnes, J., et al., *Effects of appendectomy on the course of ulcerative colitis*. Gut, 2002. **51**(6): p. 803-7.
226. Cosnes, J., et al., *Prior appendectomy and the phenotype and course of Crohn's disease*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(8): p. 1235-42.
227. Mahida, Y.R., *Microbial-gut interactions in health and disease. Epithelial cell responses*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2004. **18**(2): p. 241-53.
228. Booth, C. and C.S. Potten, *Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells*. J Clin Invest, 2000. **105**(11): p. 1493-9.
229. Pacha, J., V. Lisa, and I. Miksik, *Effect of cellular differentiation on 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in the intestine*. Steroids, 2002. **67**(2): p. 119-26.
230. Watanabe, S., et al., *Conditioned mesenchymal stem cells produce pleiotropic gut trophic factors*. J Gastroenterol, 2014. **49**(2): p. 270-82.
231. Liao, Y. and B. Lonnerdal, *Beta-catenin/TCF4 transactivates miR-30e during intestinal cell differentiation*. Cell Mol Life Sci, 2010. **67**(17): p. 2969-78.
232. Koo, B.K., et al., *Notch signaling promotes the generation of EphrinB1-positive intestinal epithelial cells*. Gastroenterology, 2009. **137**(1): p. 145-55, 155 e1-3.
233. Crosnier, C., D. Stamatakis, and J. Lewis, *Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control*. Nat Rev Genet, 2006. **7**(5): p. 349-59.
234. Melmed, G., et al., *Human intestinal epithelial cells are broadly unresponsive to Toll-like receptor 2-dependent bacterial ligands: implications for host-microbial interactions in the gut*. J Immunol, 2003. **170**(3): p. 1406-15.
235. Abreu, M.T., et al., *TLR signaling at the intestinal epithelial interface*. J Endotoxin Res, 2003. **9**(5): p. 322-30.
236. Abreu, M.T., et al., *Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide*. J Immunol, 2001. **167**(3): p. 1609-16.
237. Schneeberger, E.E. and R.D. Lynch, *The tight junction: a multifunctional complex*. Am J Physiol Cell Physiol, 2004. **286**(6): p. C1213-28.
238. Abreu, M.T., *Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(2): p. 131-44.
239. Hershberg, R.M., *The epithelial cell cytoskeleton and intracellular trafficking. V. Polarized compartmentalization of antigen processing and Toll-like receptor signaling in intestinal epithelial cells*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002. **283**(4): p. G833-9.
240. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 499-511.
241. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Toll-like receptor control of the adaptive immune responses*. Nat Immunol, 2004. **5**(10): p. 987-95.

242. Bocker, U., et al., *Responsiveness of intestinal epithelial cell lines to lipopolysaccharide is correlated with Toll-like receptor 4 but not Toll-like receptor 2 or CD14 expression*. Int J Colorectal Dis, 2003. **18**(1): p. 25-32.
243. Suzuki, M., T. Hisamatsu, and D.K. Podolsky, *Gamma interferon augments the intracellular pathway for lipopolysaccharide (LPS) recognition in human intestinal epithelial cells through coordinated up-regulation of LPS uptake and expression of the intracellular Toll-like receptor 4-MD-2 complex*. Infect Immun, 2003. **71**(6): p. 3503-11.
244. Abreu, M.T., et al., *TLR4 and MD-2 expression is regulated by immune-mediated signals in human intestinal epithelial cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(23): p. 20431-7.
245. Bambou, J.C., et al., *In vitro and ex vivo activation of the TLR5 signaling pathway in intestinal epithelial cells by a commensal Escherichia coli strain*. J Biol Chem, 2004. **279**(41): p. 42984-92.
246. Nandakumar, N.S., et al., *Effect of Vibrio cholerae on chemokine gene expression in HT29 cells and its modulation by Lactobacillus GG*. Scand J Immunol, 2009. **69**(3): p. 181-7.
247. Tallant, T., et al., *Flagellin acting via TLR5 is the major activator of key signaling pathways leading to NF-kappa B and proinflammatory gene program activation in intestinal epithelial cells*. BMC Microbiol, 2004. **4**: p. 33.
248. Ewaschuk, J.B., et al., *Surface expression of Toll-like receptor 9 is upregulated on intestinal epithelial cells in response to pathogenic bacterial DNA*. Infect Immun, 2007. **75**(5): p. 2572-9.
249. Akhtar, M., et al., *Bacterial DNA evokes epithelial IL-8 production by a MAPK-dependent, NF-kappaB-independent pathway*. FASEB J, 2003. **17**(10): p. 1319-21.
250. Steenholdt, C., et al., *Expression and function of toll-like receptor 8 and Tollip in colonic epithelial cells from patients with inflammatory bowel disease*. Scand J Gastroenterol, 2009. **44**(2): p. 195-204.
251. Pedersen, G., et al., *Expression of Toll-like receptor 9 and response to bacterial CpG oligodeoxynucleotides in human intestinal epithelium*. Clin Exp Immunol, 2005. **141**(2): p. 298-306.
252. Rumio, C., et al., *Degranulation of paneth cells via toll-like receptor 9*. Am J Pathol, 2004. **165**(2): p. 373-81.
253. Chuang, T. and R.J. Ulevitch, *Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1518**(1-2): p. 157-61.
254. Jijon, H.B., et al., *MAP kinases contribute to IL-8 secretion by intestinal epithelial cells via a posttranscriptional mechanism*. Am J Physiol Cell Physiol, 2002. **283**(1): p. C31-41.
255. Haller, D., et al., *IKK beta and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt participate in non-pathogenic Gram-negative enteric bacteria-induced RelA phosphorylation and NF-kappa B activation in both primary and intestinal epithelial cell lines*. J Biol Chem, 2002. **277**(41): p. 38168-78.

256. Vora, P., et al., *Beta-defensin-2 expression is regulated by TLR signaling in intestinal epithelial cells*. J Immunol, 2004. **173**(9): p. 5398-405.
257. Lee, J., et al., *Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(12): p. 1327-36.
258. Otte, J.M., E. Cario, and D.K. Podolsky, *Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells*. Gastroenterology, 2004. **126**(4): p. 1054-70.
259. Girardin, S.E., et al., *Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan*. Science, 2003. **300**(5625): p. 1584-7.
260. Girardin, S.E., et al., *Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection*. J Biol Chem, 2003. **278**(11): p. 8869-72.
261. Strober, W., et al., *Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(1): p. 9-20.
262. Rosenstiel, P., et al., *TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells*. Gastroenterology, 2003. **124**(4): p. 1001-9.
263. Berrebi, D., et al., *Card15 gene overexpression in mononuclear and epithelial cells of the inflamed Crohn's disease colon*. Gut, 2003. **52**(6): p. 840-6.
264. Stockinger, S., et al., *IFN regulatory factor 3-dependent induction of type I IFNs by intracellular bacteria is mediated by a TLR- and Nod2-independent mechanism*. J Immunol, 2004. **173**(12): p. 7416-25.
265. Ogura, Y., et al., *Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB*. J Biol Chem, 2001. **276**(7): p. 4812-8.
266. Kobayashi, K.S., et al., *Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract*. Science, 2005. **307**(5710): p. 731-4.
267. Wilson, C.L., et al., *Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense*. Science, 1999. **286**(5437): p. 113-7.
268. Garabedian, E.M., et al., *Examining the role of Paneth cells in the small intestine by lineage ablation in transgenic mice*. J Biol Chem, 1997. **272**(38): p. 23729-40.
269. Knoop, K.A., M.J. Miller, and R.D. Newberry, *Transepithelial antigen delivery in the small intestine: different paths, different outcomes*. Curr Opin Gastroenterol, 2013. **29**(2): p. 112-8.
270. Niess, J.H., et al., *CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance*. Science, 2005. **307**(5707): p. 254-8.
271. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
272. Hart, A.L., et al., *Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria*. Gut, 2004. **53**(11): p. 1602-9.
273. Steinman, R.M. and M.C. Nussenzweig, *Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(1): p. 351-8.

274. Bettelli, E., et al., *Induction and effector functions of T(H)17 cells*. Nature, 2008. **453**(7198): p. 1051-7.
275. Yang, X.O., et al., *T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma*. Immunity, 2008. **28**(1): p. 29-39.
276. Zhang, F., G. Meng, and W. Strober, *Interactions among the transcription factors Runx1, RORgammat and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17-producing T cells*. Nat Immunol, 2008. **9**(11): p. 1297-306.
277. Manel, N., D. Unutmaz, and D.R. Littman, *The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgammat*. Nat Immunol, 2008. **9**(6): p. 641-9.
278. Granger, D.N. and P. Kubes, *The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion*. J Leukoc Biol, 1994. **55**(5): p. 662-75.
279. Soderholm, J.D., et al., *Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of Crohn's disease*. Gut, 2002. **50**(3): p. 307-13.
280. Irvine, E.J. and J.K. Marshall, *Increased intestinal permeability precedes the onset of Crohn's disease in a subject with familial risk*. Gastroenterology, 2000. **119**(6): p. 1740-4.
281. Buhner, S., et al., *Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation?* Gut, 2006. **55**(3): p. 342-7.
282. Heller, F., et al., *Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution*. Gastroenterology, 2005. **129**(2): p. 550-64.
283. Sun, Y., et al., *Enteric neurones modulate the colonic permeability response to luminal bile acids in rat colon in vivo*. Gut, 2004. **53**(3): p. 362-7.
284. Ma, T.Y., et al., *TNF-alpha-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF-kappa B activation*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004. **286**(3): p. G367-76.
285. Musch, M.W., et al., *T cell activation causes diarrhea by increasing intestinal permeability and inhibiting epithelial Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase*. J Clin Invest, 2002. **110**(11): p. 1739-47.
286. Cario, E. and D.K. Podolsky, *Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease*. Infect Immun, 2000. **68**(12): p. 7010-7.
287. Rhee, S.H., et al., *Pathophysiological role of Toll-like receptor 5 engagement by bacterial flagellin in colonic inflammation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(38): p. 13610-5.
288. Hart, A.L., et al., *Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases*. Gastroenterology, 2005. **129**(1): p. 50-65.
289. Baumgart, D.C., et al., *Patients with active inflammatory bowel disease lack immature peripheral blood plasmacytoid and myeloid dendritic cells*. Gut, 2005. **54**(2): p. 228-36.



290. Papadakis, K.A., et al., *Dominant role for TL1A/DR3 pathway in IL-12 plus IL-18-induced IFN-gamma production by peripheral blood and mucosal CCR9+ T lymphocytes*. J Immunol, 2005. **174**(8): p. 4985-90.
291. Cruickshank, S.M., et al., *Colonic epithelial cell mediated suppression of CD4 T cell activation*. Gut, 2004. **53**(5): p. 678-84.
292. van de Wal, Y., et al., *Delineation of a CD1d-restricted antigen presentation pathway associated with human and mouse intestinal epithelial cells*. Gastroenterology, 2003. **124**(5): p. 1420-31.
293. Van den Brande, J.M., et al., *Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease*. Gastroenterology, 2003. **124**(7): p. 1774-85.
294. Ina, K., et al., *Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance*. J Immunol, 1999. **163**(2): p. 1081-90.
295. Martin, B., et al., *Suppression of CD4+ T lymphocyte effector functions by CD4+CD25+ cells in vivo*. J Immunol, 2004. **172**(6): p. 3391-8.
296. Fuss, I.J., et al., *Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis*. J Clin Invest, 2004. **113**(10): p. 1490-7.
297. Goebel, S., et al., *VEGF-A stimulation of leukocyte adhesion to colonic microvascular endothelium: implications for inflammatory bowel disease*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006. **290**(4): p. G648-54.
298. Charo, I.F. and R.M. Ransohoff, *The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation*. N Engl J Med, 2006. **354**(6): p. 610-21.
299. Kirkegaard, T., et al., *Expression and localisation of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in fistulae of patients with Crohn's disease*. Gut, 2004. **53**(5): p. 701-9.
300. Theiss, A.L., et al., *Tumor necrosis factor (TNF) alpha increases collagen accumulation and proliferation in intestinal myofibroblasts via TNF receptor 2*. J Biol Chem, 2005. **280**(43): p. 36099-109.
301. Leeb, S.N., et al., *Reduced migration of fibroblasts in inflammatory bowel disease: role of inflammatory mediators and focal adhesion kinase*. Gastroenterology, 2003. **125**(5): p. 1341-54.
302. Keshavarzian, A., et al., *Increases in free radicals and cytoskeletal protein oxidation and nitration in the colon of patients with inflammatory bowel disease*. Gut, 2003. **52**(5): p. 720-8.
303. Sparberg, M., J. Fennessy, and J.B. Kirsner, *Ulcerative proctitis and mild ulcerative colitis: A study of 220 patients*. Medicine (Baltimore), 1966. **45**(5): p. 391-412.
304. Gabay, C. and I. Kushner, *Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation*. N Engl J Med, 1999. **340**(6): p. 448-54.
305. Kotler, D.P., *Cachexia*. Ann Intern Med, 2000. **133**(8): p. 622-34.

306. Dinarello, C.A., *Cytokines as endogenous pyrogens*. J Infect Dis, 1999. **179 Suppl 2**: p. S294-304.
307. Gasche, C., et al., *Anemia in Crohn's disease. Importance of inadequate erythropoietin production and iron deficiency*. Dig Dis Sci, 1994. **39**(9): p. 1930-4.
308. Dyer, N.H. and A.M. Dawson, *Malnutrition and malabsorption in Crohn's disease with reference to the effect of surgery*. Br J Surg, 1973. **60**(2): p. 134-40.
309. Dyer, N.H., et al., *Anaemia in Crohn's disease*. Q J Med, 1972. **41**(164): p. 419-36.
310. Means, R.T., Jr., *Erythropoietin in the treatment of anemia in chronic infectious, inflammatory, and malignant diseases*. Curr Opin Hematol, 1995. **2**(3): p. 210-3.
311. Schreiber, S., et al., *Recombinant erythropoietin for the treatment of anemia in inflammatory bowel disease*. N Engl J Med, 1996. **334**(10): p. 619-23.
312. Koury, M.J. and M.C. Bondurant, *The molecular mechanism of erythropoietin action*. Eur J Biochem, 1992. **210**(3): p. 649-63.
313. Gumaste, V., et al., *Coombs-positive autoimmune hemolytic anemia in ulcerative colitis*. Dig Dis Sci, 1989. **34**(9): p. 1457-61.
314. Bell, D.W., et al., *Ulcerative colitis complicated by autoimmune hemolytic anemia*. South Med J, 1981. **74**(3): p. 359-61.
315. Altman, A.R., C. Maltz, and H.D. Janowitz, *Autoimmune hemolytic anemia in ulcerative colitis: report of three cases, review of the literature, and evaluation of modes of therapy*. Dig Dis Sci, 1979. **24**(4): p. 282-5.
316. Heits, F., et al., *Elevated serum thrombopoietin and interleukin-6 concentrations in thrombocytosis associated with inflammatory bowel disease*. J Interferon Cytokine Res, 1999. **19**(7): p. 757-60.
317. Loftus, E.V., Jr., et al., *Risk of lymphoma in inflammatory bowel disease*. Am J Gastroenterol, 2000. **95**(9): p. 2308-12.
318. Connell, W.R., et al., *Long-term neoplasia risk after azathioprine treatment in inflammatory bowel disease*. Lancet, 1994. **343**(8908): p. 1249-52.
319. Caspi, O., et al., *The association of inflammatory bowel disease and leukemia--coincidence or not?* Leuk Lymphoma, 1995. **17**(3-4): p. 255-62.
320. Gupta, R.B., et al., *Histologic inflammation is a risk factor for progression to colorectal neoplasia in ulcerative colitis: a cohort study*. Gastroenterology, 2007. **133**(4): p. 1099-105; quiz 1340-1.
321. Itzkowitz, S.H. and N. Harpaz, *Diagnosis and management of dysplasia in patients with inflammatory bowel diseases*. Gastroenterology, 2004. **126**(6): p. 1634-48.
322. Rutter, M., et al., *Severity of inflammation is a risk factor for colorectal neoplasia in ulcerative colitis*. Gastroenterology, 2004. **126**(2): p. 451-9.
323. Li, Q., S. Withoff, and I.M. Verma, *Inflammation-associated cancer: NF-kappaB is the lynchpin*. Trends Immunol, 2005. **26**(6): p. 318-25.
324. Baschant, U., N.E. Lane, and J. Tuckermann, *The multiple facets of glucocorticoid action in rheumatoid arthritis*. Nat Rev Rheumatol, 2012. **8**(11): p. 645-55.

325. Ford, A.C., et al., *Glucocorticosteroid therapy in inflammatory bowel disease: systematic review and meta-analysis*. Am J Gastroenterol, 2011. **106**(4): p. 590-9; quiz 600.
326. Faubion, W.A., Jr., et al., *The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: a population-based study*. Gastroenterology, 2001. **121**(2): p. 255-60.
327. Chan, M.T., et al., *Difficult-to-control asthma: clinical characteristics of steroid-insensitive asthma*. J Allergy Clin Immunol, 1998. **101**(5): p. 594-601.
328. Duffy, D.L., et al., *Genetics of asthma and hay fever in Australian twins*. Am Rev Respir Dis, 1990. **142**(6 Pt 1): p. 1351-8.
329. Lee, R.W., et al., *Steroid refractory CD4+ T cells in patients with sight-threatening uveitis*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009. **50**(9): p. 4273-8.
330. Maranville, J.C., et al., *In vitro sensitivity assays and clinical response to glucocorticoids in patients with inflammatory bowel disease*. J Crohns Colitis, 2014. **8**(11): p. 1539-47.
331. Manz, M., et al., *Therapy of steroid-resistant inflammatory bowel disease*. Digestion, 2012. **86 Suppl 1**: p. 11-5.
332. Kuenzig, M.E., et al., *Budesonide for maintenance of remission in Crohn's disease*. Cochrane Database Syst Rev, 2014. **8**: p. CD002913.
333. Steinhart, A.H., et al., *Corticosteroids for maintenance of remission in Crohn's disease*. Cochrane Database Syst Rev, 2003(4): p. CD000301.
334. Benchimol, E.I., et al., *Budesonide for maintenance of remission in Crohn's disease*. Cochrane Database Syst Rev, 2009(1): p. CD002913.
335. Schoon, E.J., *Budesonide: a useful tool in the maintenance treatment of Crohn's disease?* Neth J Med, 2007. **65**(9): p. 316-7.
336. Rutgeerts, P., S. Vermeire, and G. Van Assche, *Mucosal healing in inflammatory bowel disease: impossible ideal or therapeutic target?* Gut, 2007. **56**(4): p. 453-5.
337. Gonvers, J.J., et al., *Maintenance of remission in Crohn's disease*. Digestion, 2005. **71**(1): p. 41-8.
338. Brookes, M.J. and J.R. Green, *Maintenance of remission in Crohn's disease: current and emerging therapeutic options*. Drugs, 2004. **64**(10): p. 1069-89.
339. Yang, Y.X. and G.R. Lichtenstein, *Corticosteroids in Crohn's disease*. Am J Gastroenterol, 2002. **97**(4): p. 803-23.
340. Coste, A., et al., *LRH-1-mediated glucocorticoid synthesis in enterocytes protects against inflammatory bowel disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(32): p. 13098-103.
341. Suzuki, K., et al., *Effects of crowding and heat stress on intestinal flora, body weight gain, and feed efficiency of growing rats and chicks*. Nihon Juigaku Zasshi, 1983. **45**(3): p. 331-8.
342. Ocon, B., et al., *The glucocorticoid budesonide has protective and deleterious effects in experimental colitis in mice*. Biochem Pharmacol, 2016. **116**: p. 73-88.

343. Bradesi, S., et al., *Repeated exposure to water avoidance stress in rats: a new model for sustained visceral hyperalgesia*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2005. **289**(1): p. G42-53.
344. Ait-Belgnaoui, A., et al., *Acute stress-induced hypersensitivity to colonic distension depends upon increase in paracellular permeability: role of myosin light chain kinase*. *Pain*, 2005. **113**(1-2): p. 141-7.
345. Mazzon, E. and S. Cuzzocrea, *Role of TNF-alpha in ileum tight junction alteration in mouse model of restraint stress*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008. **294**(5): p. G1268-80.
346. Matsuo, K., et al., *Acute stress-induced colonic tissue HSP70 expression requires commensal bacterial components and intrinsic glucocorticoid*. *Brain Behav Immun*, 2009. **23**(1): p. 108-15.
347. Chinenov, Y. and I. Rogatsky, *Glucocorticoids and the innate immune system: crosstalk with the toll-like receptor signaling network*. *Mol Cell Endocrinol*, 2007. **275**(1-2): p. 30-42.
348. Das, I., et al., *Glucocorticoids alleviate intestinal ER stress by enhancing protein folding and degradation of misfolded proteins*. *J Exp Med*, 2013. **210**(6): p. 1201-16.
349. Barclay, G.R. and L.A. Turnberg, *Effect of cold-induced pain on salt and water transport in the human jejunum*. *Gastroenterology*, 1988. **94**(4): p. 994-8.
350. Saunders, P.R., et al., *Acute stressors stimulate ion secretion and increase epithelial permeability in rat intestine*. *Am J Physiol*, 1994. **267**(5 Pt 1): p. G794-9.
351. Soderholm, J.D., et al., *Neonatal maternal separation predisposes adult rats to colonic barrier dysfunction in response to mild stress*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002. **283**(6): p. G1257-63.
352. Turnbull, A.V. and C. Rivier, *Corticotropin-releasing factor (CRF) and endocrine responses to stress: CRF receptors, binding protein, and related peptides*. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1997. **215**(1): p. 1-10.
353. Santos, J., et al., *Corticotropin-releasing hormone mimics stress-induced colonic epithelial pathophysiology in the rat*. *Am J Physiol*, 1999. **277**(2 Pt 1): p. G391-9.
354. Sandle, G.I. and H.J. Binder, *Corticosteroids and intestinal ion transport*. *Gastroenterology*, 1987. **93**(1): p. 188-96.
355. Barreau, F., et al., *Neonatal maternal deprivation triggers long term alterations in colonic epithelial barrier and mucosal immunity in rats*. *Gut*, 2004. **53**(4): p. 501-6.
356. Veenema, A.H., et al., *Early life stress enhances the vulnerability to chronic psychosocial stress and experimental colitis in adult mice*. *Endocrinology*, 2008. **149**(6): p. 2727-36.
357. Wilson, L.M. and A.L. Baldwin, *Environmental stress causes mast cell degranulation, endothelial and epithelial changes, and edema in the rat intestinal mucosa*. *Microcirculation*, 1999. **6**(3): p. 189-98.
358. Jorge, E., et al., *Functional changes induced by psychological stress are not enough to cause intestinal inflammation in Sprague-Dawley rats*. *Neurogastroenterol Motil*, 2010. **22**(8): p. e241-50.

359. Soderholm, J.D. and M.H. Perdue, *Stress and gastrointestinal tract. II. Stress and intestinal barrier function*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **280**(1): p. G7-G13.
360. Finnie, I.A., et al., *Stimulation of colonic mucin synthesis by corticosteroids and nicotine*. Clin Sci (Lond), 1996. **91**(3): p. 359-64.
361. Meddings, J.B. and M.G. Swain, *Environmental stress-induced gastrointestinal permeability is mediated by endogenous glucocorticoids in the rat*. Gastroenterology, 2000. **119**(4): p. 1019-28.
362. Spitz, J., et al., *The effect of dexamethasone administration on rat intestinal permeability: the role of bacterial adherence*. Gastroenterology, 1994. **106**(1): p. 35-41.
363. Spitz, J.C., et al., *Characteristics of the intestinal epithelial barrier during dietary manipulation and glucocorticoid stress*. Crit Care Med, 1996. **24**(4): p. 635-41.
364. Bailey, M.T., et al., *Stressor exposure disrupts commensal microbial populations in the intestines and leads to increased colonization by Citrobacter rodentium*. Infect Immun, 2010. **78**(4): p. 1509-19.
365. Galand, G., *Brush border membrane sucrase-isomaltase, maltase-glucoamylase and trehalase in mammals. Comparative development, effects of glucocorticoids, molecular mechanisms, and phylogenetic implications*. Comp Biochem Physiol B, 1989. **94**(1): p. 1-11.
366. Jacomino, M., P. Shukla, and S.J. Henning, *Use of amphotropic retroviral vectors for gene transfer in human colon carcinoma cells*. Hum Gene Ther, 1997. **8**(7): p. 835-41.
367. Yaylaoglu, M.B., et al., *Diverse patterns of cell-specific gene expression in response to glucocorticoid in the developing small intestine*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006. **291**(6): p. G1041-50.
368. Aszterbaum, M., et al., *Glucocorticoids accelerate fetal maturation of the epidermal permeability barrier in the rat*. J Clin Invest, 1993. **91**(6): p. 2703-8.
369. Sheu, H.M., et al., *Modulation of epidermal terminal differentiation in patients after long-term topical corticosteroids*. J Dermatol, 1991. **18**(8): p. 454-64.
370. Bayo, P., et al., *Glucocorticoid receptor is required for skin barrier competence*. Endocrinology, 2008. **149**(3): p. 1377-88.
371. Kao, J.S., et al., *Short-term glucocorticoid treatment compromises both permeability barrier homeostasis and stratum corneum integrity: inhibition of epidermal lipid synthesis accounts for functional abnormalities*. J Invest Dermatol, 2003. **120**(3): p. 456-64.
372. Sidler, D., et al., *Colon cancer cells produce immunoregulatory glucocorticoids*. Oncogene, 2011. **30**(21): p. 2411-9.
373. Pascussi, J.M., et al., *Transcriptional analysis of the orphan nuclear receptor constitutive androstane receptor (NR1I3) gene promoter: identification of a distal glucocorticoid response element*. Mol Endocrinol, 2003. **17**(1): p. 42-55.
374. Saitou, M., et al., *Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands*. Mol Biol Cell, 2000. **11**(12): p. 4131-42.

375. Bamforth, S.D., et al., *A dominant mutant of occludin disrupts tight junction structure and function*. J Cell Sci, 1999. **112 ( Pt 12)**: p. 1879-88.
376. Balda, M.S., et al., *Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein*. J Cell Biol, 1996. **134(4)**: p. 1031-49.
377. Felinski, E.A., et al., *Glucocorticoids induce transactivation of tight junction genes occludin and claudin-5 in retinal endothelial cells via a novel cis-element*. Exp Eye Res, 2008. **86(6)**: p. 867-78.
378. Forster, C., *Tight junctions and the modulation of barrier function in disease*. Histochem Cell Biol, 2008. **130(1)**: p. 55-70.
379. Burek, M. and C.Y. Forster, *Cloning and characterization of the murine claudin-5 promoter*. Mol Cell Endocrinol, 2009. **298(1-2)**: p. 19-24.
380. Gavard, J., *Breaking the VE-cadherin bonds*. FEBS Lett, 2009. **583(1)**: p. 1-6.
381. Blecharz, K.G., D. Drenckhahn, and C.Y. Forster, *Glucocorticoids increase VE-cadherin expression and cause cytoskeletal rearrangements in murine brain endothelial cEND cells*. J Cereb Blood Flow Metab, 2008. **28(6)**: p. 1139-49.
382. Salvador, E., S. Shityakov, and C. Forster, *Glucocorticoids and endothelial cell barrier function*. Cell Tissue Res, 2014. **355(3)**: p. 597-605.
383. Pitzalis, C., N. Pipitone, and M. Perretti, *Regulation of leukocyte-endothelial interactions by glucocorticoids*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **966**: p. 108-18.
384. Cronstein, B.N., et al., *A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89(21)**: p. 9991-5.
385. Pitzalis, C., et al., *Corticosteroids inhibit lymphocyte binding to endothelium and intercellular adhesion: an additional mechanism for their anti-inflammatory and immunosuppressive effect*. J Immunol, 1997. **158(10)**: p. 5007-16.
386. Anacker, C., et al., *The glucocorticoid receptor: pivot of depression and of antidepressant treatment?* Psychoneuroendocrinology, 2011. **36(3)**: p. 415-25.
387. Schacke, H., W.D. Docke, and K. Asadullah, *Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids*. Pharmacol Ther, 2002. **96(1)**: p. 23-43.
388. Torriglia, A., F. Valamanesh, and F. Behar-Cohen, *On the retinal toxicity of intraocular glucocorticoids*. Biochem Pharmacol, 2010. **80(12)**: p. 1878-86.
389. Small, G.R., et al., *Preventing local regeneration of glucocorticoids by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 enhances angiogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102(34)**: p. 12165-70.
390. Shikatani, E.A., et al., *Inhibition of proliferation, migration and proteolysis contribute to corticosterone-mediated inhibition of angiogenesis*. PLoS One, 2012. **7(10)**: p. e46625.
391. Moser, M., et al., *Glucocorticoids down-regulate dendritic cell function in vitro and in vivo*. Eur J Immunol, 1995. **25(10)**: p. 2818-24.

392. Kim, K.D., et al., *Inhibition of glucocorticoid-mediated, caspase-independent dendritic cell death by CD40 activation*. J Leukoc Biol, 2001. **69**(3): p. 426-34.
393. Cumberbatch, M., R.J. Dearman, and I. Kimber, *Inhibition by dexamethasone of Langerhans cell migration: influence of epidermal cytokine signals*. Immunopharmacology, 1999. **41**(3): p. 235-43.
394. Kitajima, T., et al., *A novel mechanism of glucocorticoid-induced immune suppression: the inhibition of T cell-mediated terminal maturation of a murine dendritic cell line*. J Clin Invest, 1996. **98**(1): p. 142-7.
395. Matyszak, M.K., et al., *Differential effects of corticosteroids during different stages of dendritic cell maturation*. Eur J Immunol, 2000. **30**(4): p. 1233-42.
396. Rutella, S., S. Danese, and G. Leone, *Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age*. Blood, 2006. **108**(5): p. 1435-40.
397. Chamorro, S., et al., *TLR triggering on tolerogenic dendritic cells results in TLR2 up-regulation and a reduced proinflammatory immune program*. J Immunol, 2009. **183**(5): p. 2984-94.
398. Pedersen, A.E., et al., *Dexamethasone/1alpha-25-dihydroxyvitamin D3-treated dendritic cells suppress colitis in the SCID T-cell transfer model*. Immunology, 2009. **127**(3): p. 354-64.
399. Ogawa, S., et al., *Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors*. Cell, 2005. **122**(5): p. 707-21.
400. Varga, G., et al., *Glucocorticoids induce an activated, anti-inflammatory monocyte subset in mice that resembles myeloid-derived suppressor cells*. J Leukoc Biol, 2008. **84**(3): p. 644-50.
401. Stroncek, D.F., et al., *Administration of G-CSF plus dexamethasone produces greater granulocyte concentrate yields while causing no more donor toxicity than G-CSF alone*. Transfusion, 2001. **41**(8): p. 1037-44.
402. Purton, J.F., et al., *Intrathymic T cell development and selection proceeds normally in the absence of glucocorticoid receptor signaling*. Immunity, 2000. **13**(2): p. 179-86.
403. Brewer, J.A., et al., *Thymocyte apoptosis induced by T cell activation is mediated by glucocorticoids in vivo*. J Immunol, 2002. **169**(4): p. 1837-43.
404. Stephens, G.L., J.D. Ashwell, and L. Ignatowicz, *Mutually antagonistic signals regulate selection of the T cell repertoire*. Int Immunol, 2003. **15**(5): p. 623-32.
405. Vacchio, M.S., J.Y. Lee, and J.D. Ashwell, *Thymus-derived glucocorticoids set the thresholds for thymocyte selection by inhibiting TCR-mediated thymocyte activation*. J Immunol, 1999. **163**(3): p. 1327-33.
406. Lowenberg, M., et al., *Rapid immunosuppressive effects of glucocorticoids mediated through Lck and Fyn*. Blood, 2005. **106**(5): p. 1703-10.
407. Lowenberg, M., et al., *Glucocorticoids cause rapid dissociation of a T-cell-receptor-associated protein complex containing LCK and FYN*. EMBO Rep, 2006. **7**(10): p. 1023-9.
408. Brewer, J.A., et al., *T-cell glucocorticoid receptor is required to suppress COX-2-mediated lethal immune activation*. Nat Med, 2003. **9**(10): p. 1318-22.

409. Baschant, U. and J. Tuckermann, *The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2010. **120**(2-3): p. 69-75.
410. Chen, X., et al., *Differential response of murine CD4+CD25+ and CD4+CD25- T cells to dexamethasone-induced cell death*. Eur J Immunol, 2004. **34**(3): p. 859-69.
411. Kang, Y., et al., *Cutting edge: Immunosuppressant as adjuvant for tolerogenic immunization*. J Immunol, 2008. **180**(8): p. 5172-6.
412. Noti, M., D. Sidler, and T. Brunner, *Extra-adrenal glucocorticoid synthesis in the intestinal epithelium: more than a drop in the ocean?* Semin Immunopathol, 2009. **31**(2): p. 237-48.
413. Boivin, M.A., et al., *Mechanism of glucocorticoid regulation of the intestinal tight junction barrier*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **292**(2): p. G590-8.
414. Fischer, A., et al., *Glucocorticoids regulate barrier function and claudin expression in intestinal epithelial cells via MKP-1*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2014. **306**(3): p. G218-28.