

Modulación diferencial de organoides intestinales de ratón con factores luminales fecales de niños obesos, alérgicos y asmáticos



UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacología

Programa de Doctorado en Medicina Clínica y Salud Pública



**Modulación diferencial de organoides intestinales de ratón
con factores luminales fecales de niños obesos, alérgicos
y asmáticos**

Tesis Doctoral para aspirar al Grado de Doctor presentada por:

Claudio Samir Córdova Torres

Bajo la dirección de las Doctoras:

Olga Martínez Augustin

Carolina Gómez Llorente

Granada, 2024

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Claudio Samir Córdova Torres
ISBN: 978-84-1195-447-1
URI: <https://hdl.handle.net/10481/95002>

La beca doctoral fue cofinanciada por la Asociación Banco de Libros de Tíjola, Almería, la Asociación Colaboración y Esfuerzo (ACOES) y la Universidad de Granada.

Agradecimientos

Considero que es muy difícil expresar en palabras la gratitud que siento hacia cada persona que formó parte de mi camino durante la elaboración de esta tesis. Cada uno me brindó algo especial, que me motivó, alentó y dejó una lección de vida.

En primer lugar, deseo agradecer a mis directoras de tesis, la Dra. Olga Augustin y la Dra. Carolina Llorente, por su orientación experta, paciencia y apoyo constante a lo largo de este arduo proceso. Sus valiosas sugerencias y comentarios han sido fundamentales para dar forma a esta investigación. También quiero mencionar al Dr. Fermín Sánchez de Medina, quien formó parte de mi formación. Todos ellos demostraron su formalidad como catedráticos y también su lado humano, sabiendo estar presentes para escuchar a la persona, no solo al estudiante. Diría Toñi Moreno: son unas personas "MARAVILLOSAS".

Agradezco a Dios por el día que asistí al pueblo de Tíjola para compartir mi "experiencia de vida". Si ese día no hubiera existido, quizás hoy no estaría escribiendo esta tesis. Agradezco a Eugenio García López, a quien considero mi padrino de tesis, por haber estado atento a mí deseo de continuar estudiando después de finalizar el máster. En solo cuatro meses, logró que el pueblo de Tíjola financiara mis estudios de doctorado en la UGR. Por esta razón, esta tesis tiene un valor muy especial para mí, ya que es la tesis de todo un pueblo, no solo mía.

Agradezco a ACOES Granada, una fundación que ha sido mi familia durante estos años. Me han apoyado incondicionalmente durante mis estudios, haciéndome sentir como en casa. Hay muchos nombres que quisiera mencionar, pero son demasiados. Agradezco al Padre Patricio, Antonio M, Luis Pedro C, Rosendo, Ana, Raquel, Isabel, Rosa, Jose, Marina, Silvia, Yesenia, Juanjo, y a todos los demás.

Gracias a mis colegas, tanto del grupo de "Farma" como del de "Cardio". He aprendido mucho de ustedes, especialmente durante las charlas en las que escuchaba atentamente.

Mireia, muchas gracias por tu paciencia y por ser una gran mentora. Todo lo que sé hoy es gracias a ti; eres la "madre" o, como diría Diego, una "reina".

Diego, gracias por ayudarme cuando lo necesité, por enseñarme y por las locuras que hacíamos en el laboratorio. Gracias por las risas, tu risa escandalosa y tu actitud positiva.

Alba, admiro tu calma, tu alegría y tu disposición para los juegos de mesa y el Nintendo. Tienes una personalidad contagiosa, y cuando es hora de trabajar, te enfocas por completo y muestras tus habilidades en bioinformática.

Ana Álvarez, agradezco tu apoyo constante; eres la disponibilidad y colaboración personificada.

Juanjo y Guille, valoro nuestras charlas en la Cabina, donde compartimos alegrías y tristezas con los cultivos celulares. Admiro lo listos que son.

Cristina, siempre eras la persona a la que podía pedir un abrazo. Tu papel como mujer de ciencia es admirable, y tu sensibilidad y empatía hacia los demás te hacen especial.

Javi, gracias por tu disposición para ayudarme y por nuestras conversaciones sobre muchos temas. Aprendí mucho de ti.

Sofía, tu sonrisa única siempre alegraba mi día. Aprendí de tu buena actitud durante las largas horas de experimentos.

Niceto, siempre dando el 110%, te agradezco mucho por tu apoyo personal y por tu ayuda en la organización del laboratorio.

Stefan, gracias por tus palabras de ánimo, por las sugerencias informáticas y por las enseñanzas personales y académicas.

Mi gratitud se extiende a mis amigos catrachos, quienes han sido un apoyo incondicional durante estos años. Agradezco sus palabras de aliento, comprensión y paciencia en los momentos difíciles. Su presencia, aunque a kilómetros de distancia, ha sido fundamental para mantenerme motivado y enfocado en mi objetivo.

Finalmente, dedico este trabajo a mis padres y hermanos. Su amor, sacrificio y fe en mí han sido la fuerza impulsora detrás de cada logro en mi vida. Este éxito es tanto suyo como mío, y estoy eternamente agradecido por su inquebrantable apoyo.

ÍNDICE

Índice General

Declaración de autores	i
Agradecimientos	v
Índice General	ix
Índice de tablas y figuras	xii
Resumen	xv
1 Introducción	3
1.1 Prevalencia del asma y la obesidad.....	3
1.2 Las vías respiratorias	4
1.3 Sistema Gastrointestinal	6
1.4 Asma	8
1.4.1 Clasificación del asma y sus fenotipos.....	10
1.4.2 Factores de riesgo.....	11
1.4.3 Diagnóstico.....	12
1.4.4 Tratamientos.....	14
1.4.5 Fisiopatología: mecanismos inmunológicos del asma	15
1.5 La obesidad.....	18
1.5.1 Factores de riesgo para el desarrollo de la obesidad en niños y adolescentes. 19	
1.5.2 Prevención y tratamiento.....	19
1.5.2.1 Dieta	19
1.5.2.2 Actividad física y conducta	20
1.5.2.3 Farmacoterapia	20
1.5.2.4 Cirugía	20
1.5.2.5 Psicoterapia.....	21
1.5.3 La obesidad y su vínculo con el sistema inmunológico	21
1.6 Relación entre la obesidad y el asma	23
1.7 Microbiota: aspectos generales.....	24
1.7.1 Función de la microbiota intestinal	25
1.7.2 La obesidad y su relación con la microbiota intestinal	26
1.7.3 El asma y su relación con la microbiota intestinal.....	27
1.7.4 Disbiosis	28
1.8 Organoides	29
1.8.1 Organoides intestinales	30
1.8.2 Aplicación de los organoides en la investigación biomédica	30
1.8.3 Aplicación de los organoides en la investigación biomédica	31
1.8.4 Limitaciones y perspectivas del cultivo de organoides.	32
1.9 Extracto de aguas fecales	33

1.10	Vías de señalización.....	34
1.10.1	Fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3K)	34
1.10.1.1	PI3K- α / β / γ / δ	36
1.10.1.2	Inhibidor Wortmannin (Wm).....	36
1.10.2	Factor nuclear kappa B (NF κ B).....	37
1.10.2.1	Inhibidor Bay 11-7082	38
1.10.3	Receptor para productos finales de glicación avanzada (RAGE)	38
1.10.3.1	FPS-ZM1 inhibidor específico de RAGE	39
1.10.4	Tecnologías útiles en el estudio de interacción entre extractos de aguas fecales y organoides intestinales.....	39
1.10.4.1	Análisis de datos de RNA-seq.....	39
1.10.4.2	PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).....	40
1.10.4.3	Análisis proteómico	41
2	Objetivos	43
3	Materiales y métodos	47
3.1	Reactivos	47
3.2	Descripción de la cohorte	47
3.3	Determinación de parámetros clínicos, bioquímicos y antropométricos.....	48
3.4	Determinación de biomarcadores inflamatorios.....	49
3.5	Análisis de D lactato fecal	49
3.6	Preparación de las aguas fecales	49
3.7	Aislamiento de criptas y cultivo de organoides de ratón	50
3.7.1	Estudio de inhibición de vías de señalización	51
3.8	Estudio de expresión génica	51
3.8.1	Extracción de RNA	51
3.8.2	Análisis de la expresión génica mediante qPCR	51
3.8.3	Análisis de expresión génica mediante RNA-seq	52
3.9	Análisis estadístico.....	53
4	Resultados	57
4.1	Estudio del efecto de aguas fecales de niños normopeso y obesos en organoides de yeyuno de ratón. Caracterización de la relación de este efecto con parámetros macroscópicos y bioquímicos.	57
4.1.1	Caracterización de la cohorte.....	57
4.1.2	RAGE, IP3K y NF κ B median la inducción de la expresión de genes relacionados con la función de barrera intestinal por aguas fecales de niños alérgicos obesos	64
4.1.3	Las aguas fecales de niños alérgicos obesos inducen la expresión de genes de la cadena respiratoria mitocondrial	65
4.2	Evaluación del efecto de aguas fecales de niños con asma alérgico grave sobre la expresión de génica en organoides de yeyuno de ratón.	66
4.2.1	Caracterización de la cohorte. Datos macroscópicos y bioquímicos.....	66
4.2.2	Las aguas fecales de niños con asma grave inducen la expresión de genes proinflamatorios.	68

4.2.3	Las aguas fecales de niños con asma grave regulan genes relacionados con la función de barrera en organoides, inhibiendo los relacionados con la proliferación celular	71
5	Discusión	78
6	Conclusiones	86
7	Referencias	90
8	Anexos	112
8.1	Anexo 1. Tabla 1. Genes sobreexpresados e inhibidos indican alteraciones en procesos biológicos a nivel de la división celular y la expresión génica.	112
8.2	Anexo 2. Tabla 2. Genes sobreexpresados indican alteraciones en procesos biológicos a nivel de la inmunidad.	122
8.3	Anexo 3. Tabla 3. Genes inhibidos indican alteraciones en procesos biológicos a nivel de la división celular.	126
8.4	Anexo 4. Tabla 4. Genes inhibidos en organoides de yeyuno de ratón por heces de niños alérgicos en comparación con las de niños sanos. Los resultados indican alteraciones en el reactoma a nivel de la glucólisis y el metabolismo lipídico.	130
8.5	Anexo 5. Tabla 5. Genes inhibidos indican alteraciones en procesos biológicos a nivel del metabolismo glucídico y lipídico	134

Índice de tablas y figuras

Tablas

Tabla 1. Tendencias mundiales de obesidad en niños, adolescentes y adultos por género 2020-2035.....	4
Tabla 2. Sistemas de inhalación recomendados de acuerdo a la edad.	15
Tabla 3. Secuencia de cebadores adquiridos de la empresa Sigma Aldrich utilizados para el análisis mediante RT-qPCR de la expresión de genes.	52
Tabla 4. Secuencia de cebadores adquiridos de la empresa Bio-Rad utilizados para el análisis mediante RT-qPCR de la expresión de genes.....	52
Tabla 5. D-lactato fecal, parámetros macroscópicos y parámetros plasmáticos en niños asmáticos normopeso (A, n=9) y asmáticos-obesos (AO, n=19)..	58
Tabla 6. Correlaciones entre parámetros medidos en organoides intestinales después de la adición de heces de niños asmáticos normopeso.	62
Tabla 7. Correlaciones entre parámetros medidos en organoides intestinales después de la adición de heces de niños asmáticos obesos.....	63
Tabla 8. Principales datos macroscópicos y microscópicos de todos los niños con asma (GEMA=2) incluidos en nuestro estudio, independientemente de su peso.....	67
Tabla 9. Principales datos macroscópicos y microscópicos de los niños con asma grave (GEMA=2) cuyas heces fueron utilizadas para el análisis mediante RNA-seq.....	68

Figuras

Figura 1. Tracto respiratorio humano, zona alveolar y componentes celulares.	5
Figura 2. Células inmunitarias del pulmón y su localización tisular..	6
Figura 3. Corte transversal de intestino delgado.....	7
Figura 4. Organización del epitelio intestinal.....	8
Figura 5. Componentes implicados en el asma	9
Figura 6. Esquema de clasificación del asma según endotipos y fenotipos.....	11
Figura 7. Diferencias entre una vía área saludable y una afectada por asma.....	12
Figura 8. Principales vías inmunológicas implicadas en la respuesta tipo 2 en el asma	18
Figura 9. Respuesta inflamatoria entre el tejido adiposo blanco y las vías respiratorias, en pacientes obesos-asmáticos con fenotipo eosinofílico y no eosinofílico	23
Figura 10. Características fisiológicas y morfológicas entre el intestino y el pulmón.....	26
Figura 11. Esquema sobre los factores que influyen en la colonización y la composición microbiana.....	29
Figura 12. Morfología de un organoide intestinal de ratón.	31
Figura 13. Aplicación de los organoides en la investigación biomédica..	32
Figura 14. Prototipo de microsistemas.	33
Figura 15. Esquema simplificado de una vía de señalización..	35
Figura 16. Flujo de trabajo de secuenciación de próxima generación.....	40
Figura 17. Descripción de la cohorte.....	48
Figura 18. Efecto de homogenados fecales de niños sobre la expresión en organoides de yeyuno de ratón de genes relacionados con la función de la barrera intestinal. (A) Genes relacionados con la inflamación. (B) Mucinas, Factores Trefoil (TFF) y <i>Reg3g</i> . (C) Genes relacionados con la permeabilidad. Se agregaron homogenados fecales de niños sanos (H), asmáticos normopeso (A) y asmáticos obesos (AO) al medio de cultivo celular de organoides de yeyuno de ratón.....	59
Figura 19. Efecto de los homogenados fecales de los niños en la expresión de <i>Cnr1</i> . Homogenados fecales de niños sanos (H), niños asmáticos normopeso (A) y niños asmáticos con obesidad (AO) se añadieron al medio de cultivo de organoides de yeyuno de ratón.	60

Figura 20. Gráficos radiales para correlaciones estadísticamente significativas entre <i>Tnf</i> (A), D-lactato fecal (B), Asma (C) IMC (D) y parámetros analizados en niños prepúberes asmáticos normopeso (A) y asmáticos obesos (AO).	61
Figura 21. Efecto de los inhibidores de la transducción de señales. Homogenados fecales de niños asmáticos obesos (AO) se añadieron al medio de cultivo de organoides de yeyuno de ratón junto con inhibidores de las vías de transducción de señales de AKT (wortmanina), NFκB (BAY11-7082) y RAGE (FPS-ZM1).....	65
Figura 22. Efecto de homogenados fecales de niños en la expresión de genes relacionados con las mitocondrias. Homogenados fecales de niños sanos (H), asmáticos normopeso (A) y asmáticos obesos (AO) se añadieron al medio de cultivo de organoides de yeyuno de ratón....	66
Figura 23. Principales genes relacionados con la inmunidad regulados en organoides de yeyuno de ratón, tras la adición de homogenados de heces de niños asmáticos con asma grave (GEMA=2), en comparación con la adición de homogenados de heces de niños sanos..	70
Figura 24. Genes relacionados con la inmunidad regulados en organoides de yeyuno de ratón tras la adición de homogenados de heces de niños asmáticos con asma grave (GEMA=2) en comparación con la adición de homogenados de heces de niños sanos.....	71
Figura 25. Genes relacionados con la función de barrera intestinal regulados en organoides de yeyuno de ratón, tras la adición de homogenados de heces de niños asmáticos con asma grave (GEMA=2), en comparación con la adición de homogenados de heces de niños sanos.	72
Figura 26. Genes relacionados con función de barrera intestinal determinados en organoides de yeyuno de ratón, tras la adición de homogenados de heces de niños asmáticos con asma grave (GEMA=2), en comparación con la adición de homogenados de heces de niños sanos. 72	
Figura 27. Genes relacionados con la proliferación y el ciclo celular regulados en organoides de yeyuno de ratón, tras la adición de homogenados de heces de niños asmáticos con asma grave (GEMA=2), en comparación con la adición de homogenados de heces de niños sano...	74
Figura 28. Genes relacionados con el metabolismo glucídico y lipídico regulados en organoides de yeyuno de ratón, tras la adición de homogenados de heces de niños asmáticos con asma grave (GEMA=2), en comparación con la adición de homogenados de heces de niños sanos..	75

Resumen

El asma es una condición multifactorial que puede estar asociada con la obesidad. Los fenotipos del asma en pacientes delgados y obesos son diferentes, y las firmas proinflamatorias están aún más elevadas en estos últimos. Tanto la obesidad como el asma están asociados con alteraciones en la función de la barrera intestinal y la inmunidad, y con la composición de la microbiota intestinal y el consumo de alimentos. En este estudio, establecimos un modelo organoide para probar la hipótesis de que el contenido intestinal de niños delgados, obesos, alérgicos y asmáticos regula diferencialmente la expresión de genes epiteliales intestinales. Se utilizó un modelo de organoides intestinales de yeyuno de ratón. Como control un grupo de niños sanos y normopeso. El contenido intestinal de niños asmáticos con obesidad indujo diferencialmente la expresión de genes de respuesta inflamatoria y mitocondrial (Tnf-factor de necrosis tumoral, Cd14, Muc13-mucina 13, Tff2-factor Trefoil 2 y Tff3, Cldn1-claudina 1 y 5, Reg3g-miembro 3 gamma de la familia regeneradora, mt-Nd1-NADH deshidrogenasa 1 y 6, y mt-Cyb-citocromo b mitocondrial) a través de las vías de transducción de señales RAGE-receptor específico del producto final de glicación avanzada, NF- κ B-factor nuclear kappa b y AKT quinasa. Los homogeneizados fecales de niños asmáticos normopeso y obesos inducen un fenotipo diferencial en los organoides intestinales, en el cual la presencia de obesidad juega un papel importante.

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1 **Introducción**

1.1 **Prevalencia del asma y la obesidad**

La obesidad y el asma son dos condiciones crónicas y complejas ¹. La Fundación Mundial de la Obesidad estima que un 20% de la población masculina de entre 5 y 19 años a nivel mundial padecerá sobrepeso u obesidad en 2035, mientras que en la población femenina, se situaría en torno al 18% (Tabla 1) ². A pesar de haber sido previamente vista como un problema exclusivo de los países con altos ingresos, el sobrepeso y la obesidad infantil están experimentando un marcado aumento en naciones de ingresos medianos y bajos ³.

Aproximadamente 300 millones de personas a nivel mundial tienen diagnóstico de asma y se prevé, que para 2025 esta prevalencia llegue a los 400 millones de pacientes. Un informe del 2016, estima que la prevalencia del asma en niños de 5 a 11 años y de 12 a 17 años es del 9,6% y el 10,5%, respectivamente ⁴. En España, la prevalencia de niños asmáticos oscila en alrededor del 10% ⁵.

El asma ha sido considerada una enfermedad del primer mundo, debido a una mayor prevalencia en niños que viven en ambientes domésticos altamente higiénicos, libres de bacterias o residuos orgánicos que impiden la exposición a los mismos a tempranas edades de la vida (hipótesis higienista) ⁶. Sin embargo el 80% de las muertes por asma, tienen lugar en países de ingresos medios y bajos ⁷. Entre las comorbilidades asociadas al asma destacan: alergia alimentaria en alrededor del 25%, rinitis alérgica en el 60%, dermatitis atópica en el 45% e infecciones recurrentes del tracto respiratorio en el 60%. Por otra parte las comorbilidades atópicas y las infecciones recurrentes de las vías respiratorias se asocian con un aumento de la morbilidad por asma ⁸. Si bien, la incidencia y la prevalencia del asma son más altas en niños, la morbilidad y la mortalidad son más altas en los adultos.

El asma es más prevalente en los niños de 4 a 14 años, en comparación con las niñas. Sin embargo, después de la pubertad, el asma se vuelve más frecuente y grave en las mujeres. Aunque se sabe que, más de la mitad de los casos de asma en adultos, comienzan en la infancia precoz antes de los 5-6 años ⁹. Si bien la distribución de la prevalencia del asma es uniforme entre las edades, se sabe poco acerca de la influencia de la edad y el sexo en la prevalencia del asma grave en estos pacientes ¹⁰. La alta prevalencia del asma y su progresión en el tiempo, es un problema serio, no solo de salud, sino también en términos económicos. Se estima que los costos de la sanidad en cuanto a hospitalización, cuidados intensivos y tratamiento por asma, podría oscilar en un rango de entre el 1% y 2% del total destinado a la sanidad en países industrializados ^{11,12}. No obstante, se ha estimado que el coste medio total en atención médica de un niño o adolescente con obesidad oscila entre 148.196 € y 149.206 € ¹³. La obesidad y el asma tienen una relación significativa debido a varios mecanismos biológicos incluyendo: aspectos mecánicos, inflamatorios, metabólicos, genéticos, hormonales, estrategias de tratamiento, cambios en la composición microbiana del intestino, y de las vías respiratorias ¹⁴. Por lo cual una relación de ambas condiciones, elevaría el costo a la sanidad

pública por paciente. Mediante la prevención de la obesidad y un manejo adecuado del asma, podrían reducirse los costos sanitarios.

Tabla 1. Tendencias mundiales de obesidad en niños, adolescentes y adultos por género 2020-2035.

	<i>Niños 2020</i>	<i>Niños 2025</i>	<i>Niños 2030</i>	<i>Niños 2035</i>
Número de personas con obesidad (millones)	103	140	175	208
Proporción de todos los niños	10%	14%	17%	20%
	<i>Niñas 2020</i>	<i>Niñas 2025</i>	<i>Niñas 2030</i>	<i>Niñas 2035</i>
Número de personas con obesidad (millones)	72	101	135	175
Proporción de todas las niñas	8%	10%	14%	18%

*Niños y adolescentes (de 5 a 19 años)

1.2 Las vías respiratorias

La función principal del tejido pulmonar, es el intercambio de gases entre el cuerpo y su entorno y depende de una anatomía especializada que involucra células epiteliales, endoteliales, leucocitos residentes en tejidos específicos y varios tipos de células mesenquimales que brindan soporte estructural. El tracto respiratorio humano se divide en: tracto respiratorio superior, que incluye la cavidad nasal, la faringe y la laringe. El tracto respiratorio inferior, conformado por las vías respiratorias conductoras (tráquea y bronquios), las vías respiratorias pequeñas (bronquiolos) y la zona respiratoria (los alvéolos) ¹⁵⁻¹⁷. El aire fluye desde la cavidad nasal hacia las vías respiratorias conductoras, involucrando la tráquea y los bronquios, que se bifurcan en el árbol bronquial ramificado. La tráquea y las vías respiratorias humanas están compuestas por un epitelio pseudoestratificado en el lado luminal, con una lámina basal revestida de mesénquima, cartílago, músculo liso y vasos sanguíneos. La mucosa y los cilios que recubren las vías respiratorias imponen limitaciones físicas adicionales al capturar e invertir la trayectoria de los patógenos inhalados (partículas, virus, bacterias y hongos). Además, una variedad heterogénea de células epiteliales, se distribuyen a lo largo de las vías respiratorias, entre ellas están: **1) Las células de club o secretoras**, son células progenitoras, secretoras de proteínas (mucinas), no ciliadas, con microvellosidades cortas, que producen proteínas antiinflamatorias e inmunomoduladoras ¹⁸⁻²⁰. **2) Células columnares ciliadas**, gracias a los cilios que laten continuamente en un movimiento ondulante rítmico, barren el moco de los pulmones, llevando consigo los desechos y los patógenos que se han adherido a él ^{21,22}. **3) Células basales**, son las células madre progenitoras dentro de las vías respiratorias, con capacidad de autorenovarse, que dan lugar a múltiples tipos de células epiteliales diferenciadas de las vías respiratorias ^{19,23,24}. **4) Células calciformes**, regulan la respuesta inmune innata, pero su función principal en las vías respiratorias, es secretar mucinas en la superficie interna del tracto respiratorio, formando así una capa líquida (denominada moco) que protege el epitelio ^{25,26}. Fibroblastos y células neuroendocrinas pulmonares decoran las vías respiratorias proximales, mientras que las células alveolares tipo 1 y tipo 2 pueblan el epitelio distal (Figura 1). Las vías respiratorias terminan en bronquiolos

terminales, que luego desembocan en unidades respiratorias compuestas que incluyen los bronquiolos respiratorios, el conducto alveolar y el saco alveolar, donde se produce el intercambio de gases ^{16,27-29}. Las vías respiratorias sirven como conducto para los gases de la atmósfera a los alvéolos, también tienen un papel crucial al filtrar el aire inhalado en busca de partículas sólidas y su respectiva eliminación, a este proceso se lo conoce como aclaramiento mucociliar. La comunicación recíproca entre las células epiteliales y las células inmunes es vital para restaurar la integridad y funcionalidad de la barrera en las vías respiratorias y otras superficies mucosas. Las principales poblaciones de células inmunitarias en los pulmones incluyen: macrófagos y células dendríticas como células innatas predominantes, y linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ como células inmunitarias adaptativas predominantes. Los macrófagos alveolares (MA) comprenden la mayoría de los macrófagos pulmonares. Además de ser fagocíticos, los macrófagos están a la vanguardia de la inmunidad innata y son indispensables en el mantenimiento de la homeostasis tisular y reparación tisular ³⁰⁻³².

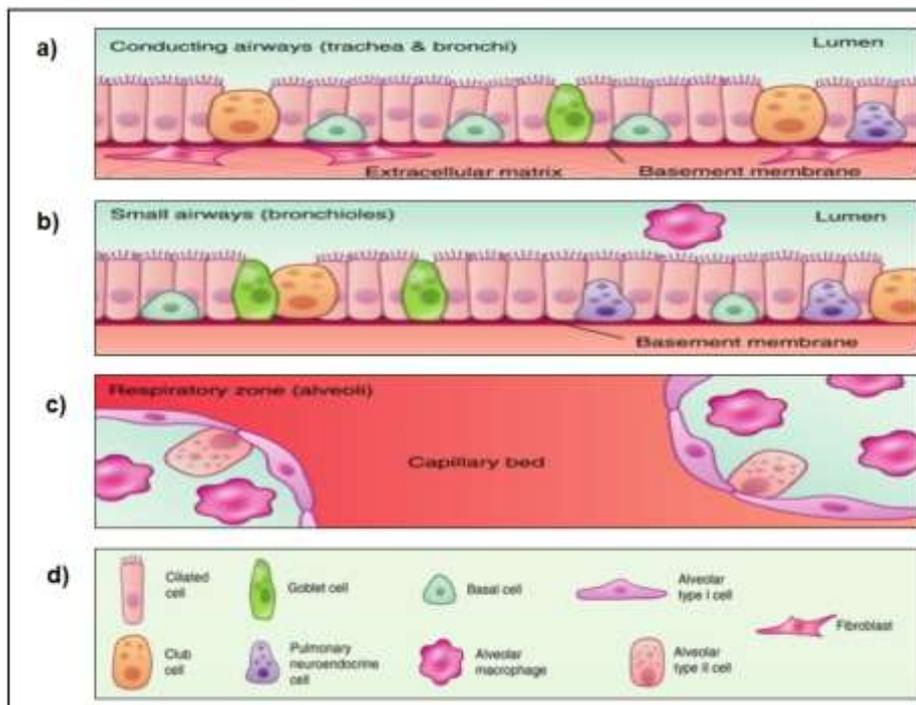


Figura 1. Tracto respiratorio humano, zona alveolar y componentes celulares. a) Tracto respiratorio humano superior. b) Tracto respiratorio humano inferior. c) Zona respiratoria alveolar. d) Componentes celulares presentes en el epitelio respiratorio (a, b y c) ²⁸.

Los macrófagos sésiles permanecen adheridos a la capa epitelial de los alvéolos y trabajan para atenuar las respuestas inmunitarias, proporcionando muchas de las señales reguladoras que previenen la lesión pulmonar durante una respuesta inflamatoria al antígeno, mientras que los macrófagos alveolares no sésiles vigilan continuamente el espacio aéreo e inician respuestas inflamatorias a patógenos (Figura 2). El pulmón humano experimenta una exposición continua y directa a antígenos ambientales y microbianos, tanto inocuos como

patógenos, a través de la inhalación y la aspiración orofaríngea ^{31,33}. En consecuencia, las infecciones agudas y crónicas de las vías respiratorias inferiores, siguen siendo la principal causa de enfermedades respiratorias (asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, infecciones respiratorias agudas, fibrosis pulmonar, bronquiolitis, tuberculosis, cáncer de pulmón, etc.) ^{32,34}. Más de dos mil millones de personas están expuestas regularmente a los efectos tóxicos de la contaminación del aire en interiores y exteriores, que es responsable de 3,5 millones de muertes prematuras cada año ^{34,35}.

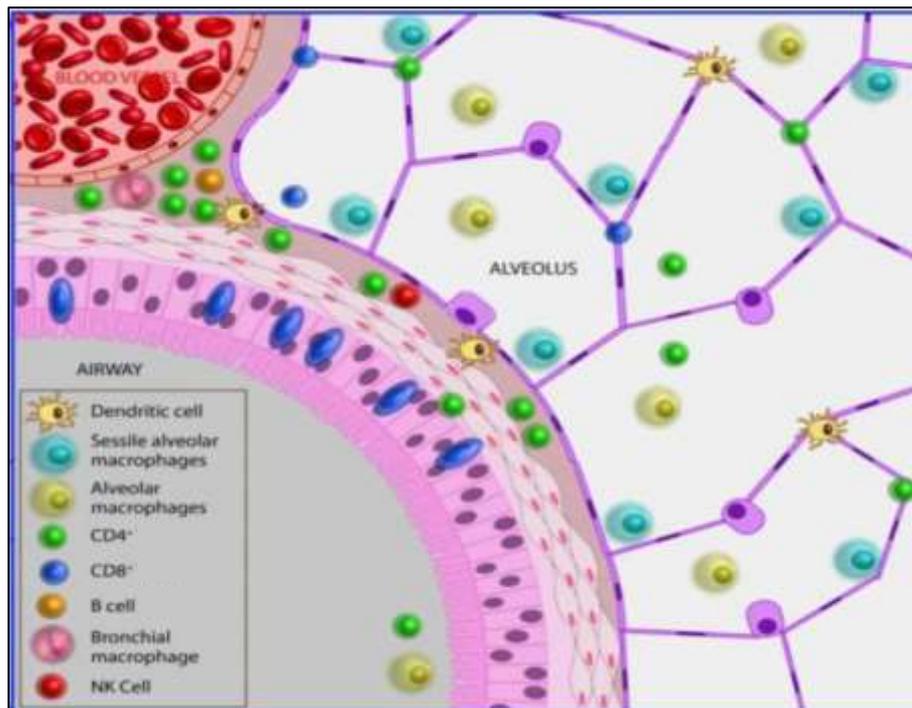


Figura 2. Células inmunitarias del pulmón y su localización tisular. Las células innatas más abundantes que se encuentran en el pulmón humano son los macrófagos alveolares (MA), las células inmunitarias adaptativas más numerosas del pulmón, se encuentran predominantemente en las vías respiratorias y alrededor de ellas y también pueden persistir en el parénquima ³¹.

1.3 Sistema Gastrointestinal

El sistema gastrointestinal (GI) tiene una serie de funciones sofisticadas, autónomas y coordinadas como: la digestión, la absorción, la excreción y protección inmunológica. El estómago y el intestino delgado son los principales responsables de la digestión y la absorción, un proceso que incorpora mecanismos tanto físicos como químicos. El intestino grueso se ocupa principalmente de la desecación y compactación de los desechos, con almacenamiento en el colon sigmoide y el recto antes de la eliminación ^{36,37}. Después de la digestión y absorción del tracto gastrointestinal, las moléculas de nutrientes, principalmente glucosa, ácidos grasos y aminoácidos, deben transportarse a varias células para su almacenamiento. Estos depósitos

de almacenamiento incluyen adipocitos, hepatocitos, músculo esquelético y hueso, todos los cuales absorben nutrientes para ser utilizados por el organismo en ausencia de alimento ³⁸.

Detallamos más en profundidad sobre el intestino delgado y el colon. El intestino delgado se puede subdividir en duodeno, yeyuno e íleon ³⁹. Se compone de cuatro capas: la mucosa es la capa más interna, la submucosa es una capa de tejido conectivo que sostiene la mucosa; la muscularis externa es la pared muscular que rodea la submucosa; y la adventicia o serosa es la capa más externa del tubo gastrointestinal ⁴⁰. Organización histológica del intestino delgado (Figura 3).

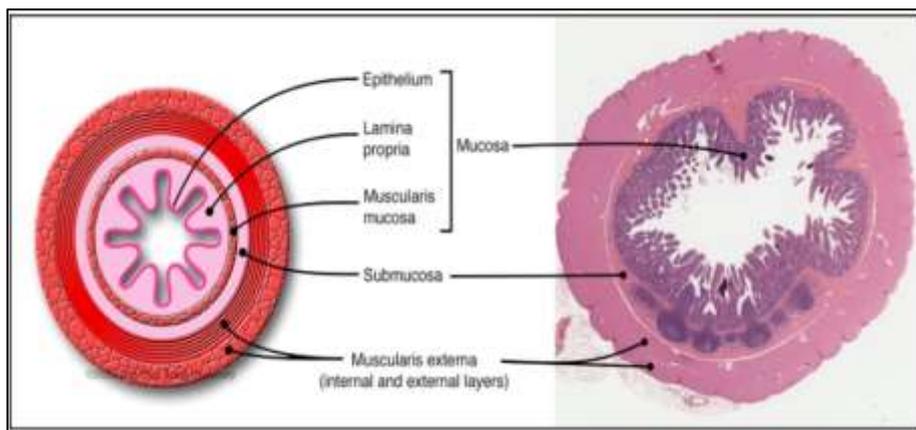


Figura 3. Corte transversal de intestino delgado ⁴¹.

El epitelio intestinal está conformado por cuatro tipos de células diferenciadas: enterocitos (el tipo de célula más abundante, que absorbe agua y nutrientes), células caliciformes (el segundo tipo de célula principal y secretor de moco), células enteroendocrinas o enterocromafines (secreciones intestinales, hormonas) y células de Paneth (que secretan sustancias antibacterianas). Los enterocitos, las células caliciformes y las células enteroendocrinas migran hacia arriba a lo largo del eje cripta-vellosidad, mientras que las células de Paneth se mueven hacia abajo y quedan confinadas en la parte inferior de las criptas ⁴². Por su parte, el colon no posee vellosidades, pero tiene un epitelio de superficie plana, mientras que las células de Paneth están ausentes ³⁹. En la Figura 4 se muestran los diferentes componentes celulares que conforman la barrera intestinal y las diferentes células inmunes intraepiteliales.

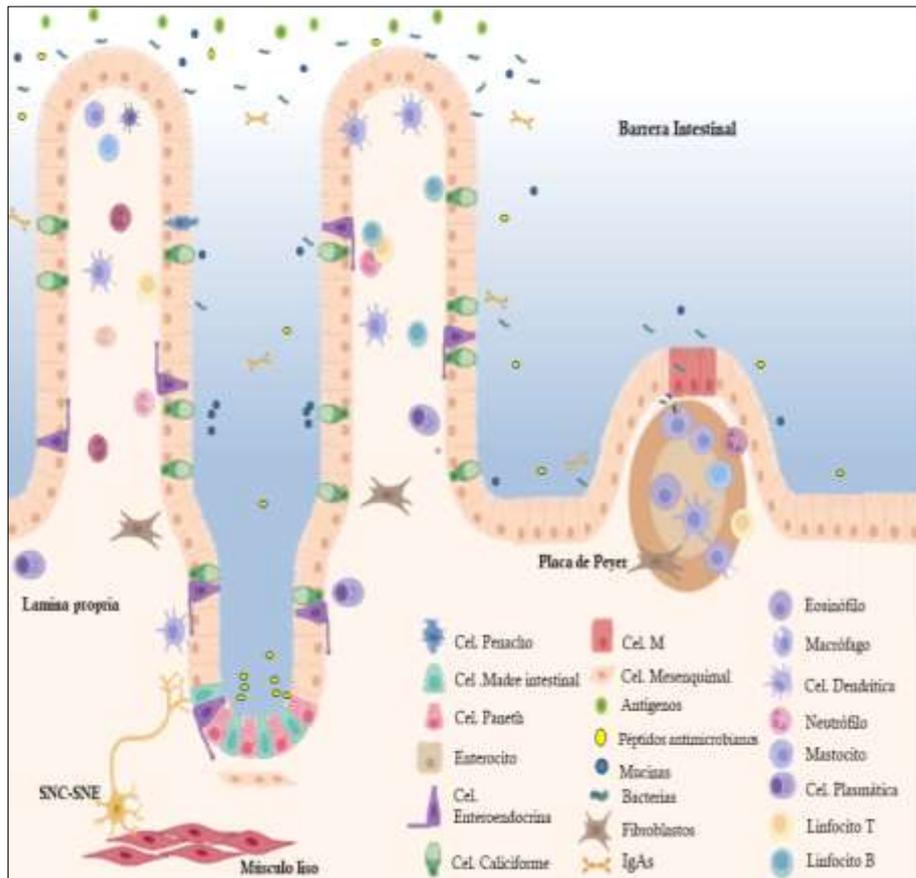


Figura 4. Organización del epitelio intestinal. Una capa de células epiteliales y subepiteliales componen la mucosa intestinal, además de células de Paneth, células madre intestinales, células amplificadoras en tránsito, células calciformes, células enteroendocrinas, enterocitos, tejido conectivo, capas musculares y un sistema nervioso entérico. A la luz de la barrera epitelial se encuentra una capa de agua sin remover, el glucocáliz y otra capa que contiene microbiota, mucinas, IgA secretora, y péptidos antimicrobianos secretados por las células de Paneth. Otro componente importante es la lámina propia que está compuesta de tejido linfoide difuso, que contiene en su interior células plasmáticas, macrófagos, células dendríticas, linfocitos de la lámina propia, neutrófilos y las placas de Peyer que contienen células M. (CEI: célula epitelial intestinal, sIgA: IgA secretora, SNC: sistema nervioso central, SNE: sistema nervioso entérico, SI: sistema inmunológico, CEC: células enteroendocrinas ^{45,46}).

1.4 Asma

El asma es una enfermedad respiratoria crónica, generalmente asociada con la inflamación de las vías respiratorias y la hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR) a una multitud de estímulos. Estas anomalías tienden a persistir incluso si no hay síntomas y suelen afectar a individuos de todas las edades ^{43,44}. El asma conlleva a la inflamación crónica de las vías respiratorias, condicionada en parte por factores genéticos y ambientales, en la que intervienen diversas células y mediadores de la inflamación.

El asma se manifiesta con obstrucción del flujo de aire, sibilancias, edema de la mucosa, hipersecreción, dificultad para respirar, vasodilatación, opresión en el pecho y tos nocturna, reversible de manera espontánea o con tratamiento ^{47,48}. Sin embargo, muchos

pacientes no recuerdan los síntomas de la infancia que podrían reflejar una recaída, más que una iniciación de asma. Es importante destacar que se desconoce si la remisión clínica de los síntomas, equivale a la desaparición de la patología subyacente. De hecho, la hiperreactividad de las vías respiratorias y la inflamación de las vías respiratorias podrían permanecer a pesar de la ausencia de síntomas evidentes. Por lo tanto, los síntomas del asma que comienzan a manifestarse en la adultez, pueden haberse originado en la niñez ⁴⁴.

Por esa razón, es importante prestar atención al momento en que se producen los síntomas en el niño ⁴⁸:

- A la noche o a la mañana temprano.
- Mientras hace ejercicio físico o después.
- Durante algunas estaciones.
- Luego de reír o llorar.
- Cuando se expone a desencadenantes comunes del asma.

Los epitelios que sufren una remodelación estructural durante un proceso asmático, producen una exacerbación de las células inmunitarias y las moléculas secretadas por las mismas, ocasionando así, las manifestaciones clínicas antes mencionadas (Figura 5).

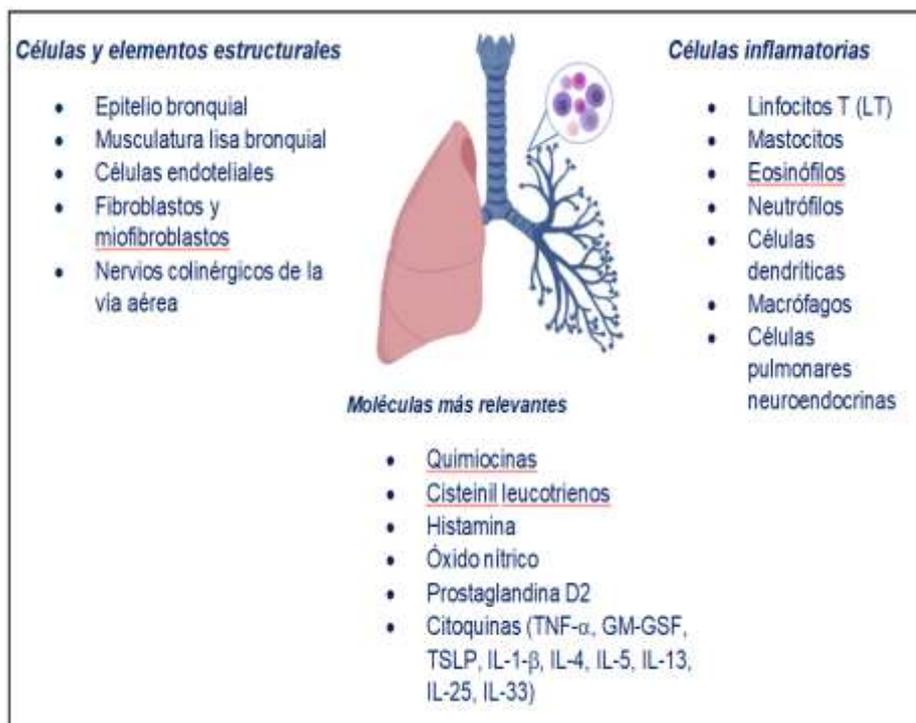


Figura 5. Componentes implicados en el asma ⁴⁹.

1.4.1 Clasificación del asma y sus fenotipos

Los fenotipos son características observables que resultan de una combinación de influencias hereditarias y ambientales, que pueden incorporar datos clínicos, fisiológicos, de laboratorio y/o moleculares^{50,51}. La clasificación de los fenotipos del asma es compleja, debido a la heterogeneidad de la enfermedad y a la posibilidad de que un solo paciente, pertenezca a dos o más fenotipos^{52,53}. Por lo cual, caracterizar fenotipos discretos es esencial para mejorar y personalizar la atención del asma⁵⁴. Los parámetros incluidos en el análisis de fenotipo en pacientes con asma tanto pediátricos como adultos son: edad de inicio, sexo, índice de masa corporal (IMC), atopia, obstrucción bronquial e hiperreactividad bronquial, respuesta corticosa y biomarcadores como eosinófilos en sangre, esputo u otros marcadores de inflamación inducida por eosinófilos (tipo2) y recuentos de neutrófilos (no tipo 2)^{55,56}.

El asma infantil puede presentarse con un patrón leve, moderado o grave⁵⁷. Sin embargo en el asma grave se presentan dos endotipos principales: Th2-alto (Eosinofílico) y Th2-bajo (no eosinofílico). El asma alérgica, es el fenotipo más común en el 50 y 80% de los pacientes. Desencadena una respuesta inmunitaria compleja que comienza con la activación y diferenciación de las células T helper tipo 2 (Th2)(asma alta), específicas de alérgenos, que controlan la producción de inmunoglobulina E (IgE), interleucinas (IL) 4, IL-5 e IL-13 e IL-9, células linfoides innatas del grupo 2 (ILC2), la activación de los mastocitos dependientes de IgE, moco, fracción de óxido nítrico exhalado (FENO), reclutamiento de eosinófilos en el pulmón y, finalmente, la inflamación persistente de las vías respiratorias^{50,58}. Los principales fenotipos Th2 altos incluyen (a) asma alérgica de inicio temprana (b) asma eosinofílica de inicio tardío y (c) enfermedad respiratoria exacerbada por aspirina (EREA). Un segundo fenotipo es el asma no alérgica (no Th2, asma baja), se caracteriza por inflamación neutrofílica o paucigranulocítica y falta de respuesta a los corticosteroides. En el asma Th2 baja se observa una activación de las células Th1 y/o Th17⁵⁰.

Los pacientes obesos suelen tener un peor control del asma, frecuentes hospitalizaciones y con respecto a la terapia de control no responden tan bien como los pacientes delgados con asma. En los pacientes obesos podrían presentarse tres fenotipos de asma asociados a obesidad: a) asma de aparición temprana b) asma de aparición tardía c) asma y obesidad asociados a irritantes/contaminantes^{59,60}. El fenotipo de inicio temprano afecta en su mayoría a niños menores 12 años, donde el aumento de peso empeora el asma preexistente. Los niños en su mayoría son alérgicos, y presentan una grave obstrucción de las vías respiratorias, hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR) e inflamación con predominio de eosinófilos⁶¹. El asma de aparición tardía surge como consecuencia de la obesidad, se caracteriza por un predominio en mujeres, mayor uso de medicación, falta de atopia, bajos niveles séricos de IgE, aumento del estrés oxidativo e infiltración de neutrófilos, mediados por IL-17, y unas vías respiratorias más sensibles y propensas al colapso debido a la pérdida de elasticidad pulmonar^{60,62,63}. Por su parte el asma y obesidad asociados a irritantes/contaminantes ocurre al exponerse de forma única o múltiple a altas concentraciones de un irritante, aunque concentraciones bajas también podrían desencadenar este tipo de

asma. Los agentes desencadenantes pueden ser ambientales, químicos, ocupacionales, climáticos y físicos ⁶⁴.

En la actualidad, se han desarrollado nuevos enfoques para entender los diferentes fenotipos del asma, los cuales se identifican a partir de información médica obtenida de exámenes, pruebas de laboratorio, imágenes médicas y otros procedimientos complementarios. Estos métodos han permitido identificar diferentes formas de inflamación y también han revelado nuevos fenotipos y endotipos del asma (Figura 6), que anteriormente no se habían explorado en detalle ⁶⁵.

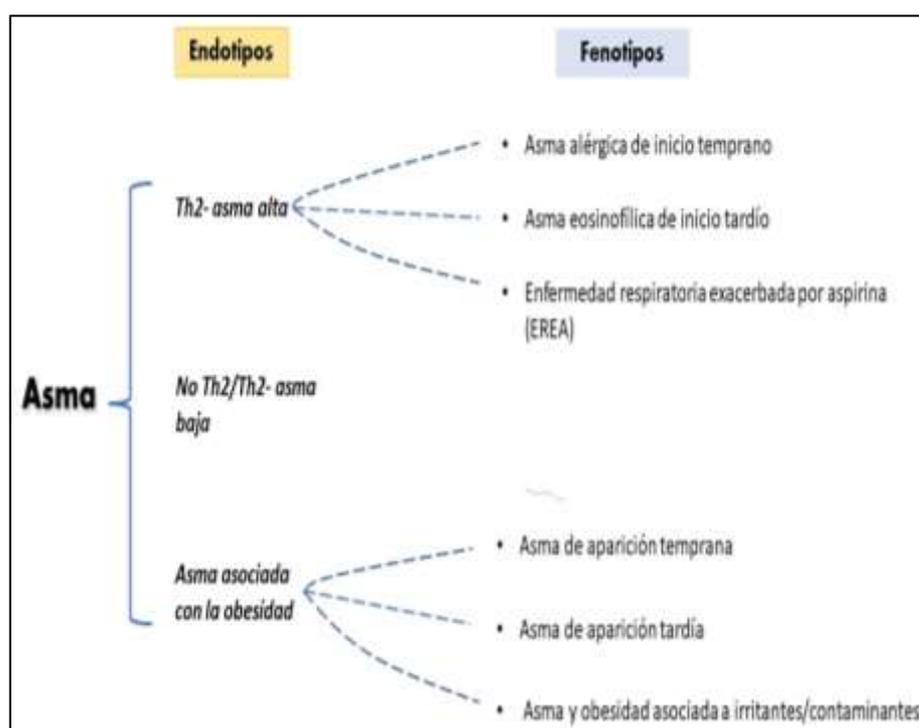


Figura 6. Esquema de clasificación del asma según endotipos y fenotipos ⁶⁶.

1.4.2 Factores de riesgo

Los antecedentes familiares de asma sugieren que existe una alta probabilidad de que el asma sea heredada. Múltiples genes están implicados e interactúan entre ellos, variantes genéticas en el cromosoma 17q21 regulan la expresión de los genes *ORMDL3* y *GSDMB*, relacionados con el riesgo de asma de inicio en la niñez. Si uno o ambos progenitores padecen asma, es un factor importante para su desarrollo, ya que, entre el 70 y 80% de los pacientes se confirma el factor hereditario ^{52,67}. Por otro lado, la caracterización de los predictores epigenéticos tempranos del asma, podrían ser de utilidad en la regulación del inicio y la susceptibilidad a esta enfermedad ⁶⁸. Dichos factores son muy diversos y van desde contaminantes del aire interior y exterior, pesticidas, fármacos, hongos, virus respiratorios, factores ambientales como los alérgenos, tabaco, bacterias, además del estilo de vida, la dieta

(obesidad), actividad física, estrés y lactancia materna. Todos ellos tienen el potencial de inducir cambios epigenéticos y aumentar el riesgo de desarrollar asma en lactantes, incluso durante el desarrollo fetal. Generando una obstrucción del flujo de aire en las vías respiratorias (Figura 7) ^{1,69,70}.

El asma a su vez, se considera un factor de riesgo de enfermedades como rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica, eccema, bronquitis crónica, bronquiectasias, tuberculosis etc. Además, se ha asociado el riesgo con la crianza de mascotas, el tipo de parto, el número de hermanos y el nivel socioeconómico ^{71,72}.

El asma se asocia a menudo con diversas comorbilidades que pueden influir en su expresión clínica. Entre las más frecuentes se encuentran: la rinitis, la sinusitis, la enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE), la apnea obstructiva del sueño (AOS), trastornos hormonales y psicopatologías. Se han identificado otras condiciones que podrían aumentar el riesgo de desarrollar asma, incluso cuando no parecen tener una conexión directa con esta enfermedad. Estas condiciones incluyen: infecciones respiratorias, depresión, hipertensión, diabetes, enfermedades cardíacas, cáncer y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) ^{73,74}.

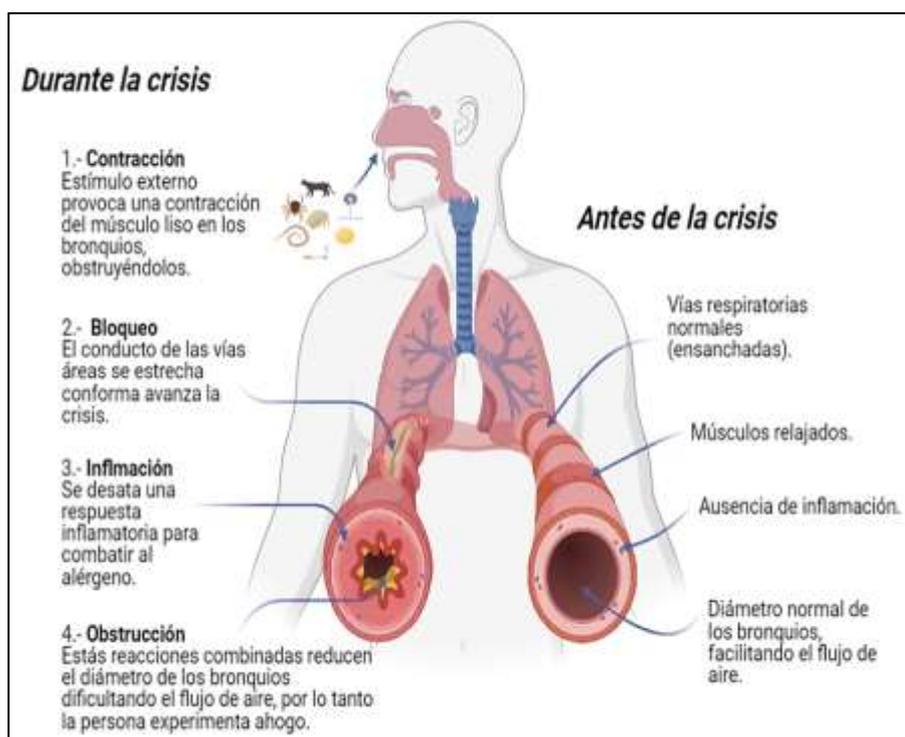


Figura 7. Diferencias entre una vía aérea saludable y una afectada por asma ⁷⁵.

1.4.3 Diagnóstico

El diagnóstico de asma en bebés y niños de edad preescolar es un desafío para los médicos ^{71,72}. El asma aguda es una emergencia médica de diagnóstico principalmente clínico y debe ser diagnosticada y tratada con prontitud ⁷². Los desafíos del diagnóstico de asma en

los niños pueden estar relacionados con muchos factores que involucran la evaluación del historial médico, el examen físico, las pruebas de laboratorio confirmatorias y los ensayos de tratamiento. El diagnóstico basado en ensayos de tratamiento de corta duración debe limitarse a los niños pequeños que no pueden cooperar con ciertas pruebas ⁷⁶. La inflamación crónica es la característica más común del asma, afecta del 4% al 5% de los niños asmáticos ⁷⁷. Sin embargo, las mediciones de la inflamación aún no son un factor importante en el diagnóstico y seguimiento del asma. Las mediciones realizadas mediante broncoscopia con análisis de muestras de biopsia y lavado broncoalveolar, son procedimientos demasiado invasivos para el uso rutinario en niños ⁷⁸. Por lo tanto, el diagnóstico de asma debe basarse en espirometría, conocimiento de la frecuencia, duración, inflamación eosinofílica de la vía aérea, atopia, adherencia al tratamiento, factores psicológicos, ambientales y diferenciación de los síntomas respiratorios causados por infecciones respiratorias, virales o bacterianas que pueden simular el asma. Debido a la sintomatología tan inespecífica en los pacientes con un posible diagnóstico de asma, se ha informado del diagnóstico erróneo de afecciones no asmáticas, como asma, en hasta el 12-30% de los pacientes ^{4,50,76,79-81}.

La espirometría se utiliza para el diagnóstico inicial y el manejo continuo del asma ⁵¹. Es un procedimiento que mide la tasa de cambio de los volúmenes pulmonares (volumen espiratorio forzado en uno y seis segundos (FEV 1) (FEV 6) y valores de capacidad vital forzada (FVC)) ⁸². El valor normal es $\geq 70\%$ o de acuerdo con el límite inferior de normalidad, mientras que un patrón obstructivo después de la broncodilatación, se caracteriza por un valor del índice FEV1/FVC o FEV1/FEV6 menor $< 70\%$, así pues, FEV1/ FVC menores de lo previsto permiten diferenciar entre afecciones restrictivas y obstructivas ⁸³.

La prueba broncodilatadora o de broncoprovocación (PBD) evalúa la reversibilidad de la obstrucción bronquial, es sencilla, barata y útil en neumología, con utilidad diagnóstica, pronóstica y terapéutica. La reversibilidad es una característica del asma, sin embargo, la ausencia de reversibilidad no descarta el diagnóstico de asma ⁵³. FEV1 se evalúa y si el descenso es $>20\%$ respecto al control, el test es positivo ^{54,56}.

En el asma se detecta un aumento de eosinófilos en la sangre, en el esputo y en la mucosa respiratoria, en respuesta a la inflamación mediada por células (Th2). Los niveles de eosinófilos en sangre pueden usarse para caracterizar a los pacientes con asma grave e inflamación eosinofílica y guiar el uso de agentes biológicos en el tratamiento ⁵⁸. Un umbral de eosinófilos en sangre de 150 células / μL identifica a los pacientes con asma eosinofílica grave ⁸⁴.

Para llevar a cabo la diferenciación entre asmáticos alérgicos y no alérgicos se determina la inmunoglobulina E (IgE), con el fin de evaluar la sensibilización alérgica. La IgE específica positiva con síntomas clínicos característicos, es distintiva para los asmáticos alérgicos, mientras que un nivel bajo o IgE específica negativa sin síntomas clínicos se define como fenotipo de asma no alérgico. Sin embargo, otros factores no alérgicos desencadenan la vía de la IgE, por lo que se ha discutido la contribución real de la alergia mediada por IgE en el asma ⁶⁰.

La prueba cutánea positiva permite hacer el diagnóstico frente alérgico con el fin de detectar si el paciente tiene IgE específica contra un alérgeno desencadenante de los síntomas alérgicos. La prueba reproduce la reacción de hipersensibilidad en la piel, que solo ocurrirá si el paciente tiene esa IgE específica frente al alérgeno que se está probando ^{63,64}.

El índice predictivo (IPA) es una herramienta de diagnóstico que descarta la probabilidad de asma en niños pequeños con sibilancias. Con valores predictivos positivos de 93,9% y 86,5%. Y valores predictivos negativos de 91,6% y 84,2% ^{65,78}.

1.4.4 Tratamientos

El objetivo del tratamiento en la actualidad es alcanzar el control del asma durante el mayor tiempo posible mediante estrategias de información, medidas farmacológicas y seguimiento ⁸⁵. El tratamiento del asma infantil es sencillo y complejo. Sencillo porque las clases terapéuticas son pocas, pero eficaces para la mayoría de los niños. Es complejo porque el asma es multifactorial, en particular en lo que respecta a sus factores desencadenantes ⁸⁶. El pilar del tratamiento del asma por vía inhalatoria siguen siendo los broncodilatadores y corticosteroides, porque estos medicamentos revierten la broncoconstricción y disminuyen la inflamación de las vías respiratorias ⁶⁶. El éxito de la terapia inhalatoria depende de la calidad con que sea realizada, siendo la técnica inhalatoria un tema importante al igual que las características del fármaco administrado, el sistema de inhalación, la edad del paciente y su condición respiratoria ⁸⁷.

Un sistema de administración óptima para el tratamiento del asma en niños, requiere para su correcto uso, entrenamiento de todo paciente y cuidador que administre la medicación, así como reforzamiento continuo, revisión periódica y corrección de errores frecuentes, para mejorar la adherencia al tratamiento y controlar mejor la enfermedad ⁸⁸. Son los progenitores quienes deben asegurar la observancia terapéutica de su hijo. Los programas de educación terapéutica para los niños asmáticos y sus progenitores, tienen como finalidad desarrollar en los niños con asma moderada o grave, unas competencias que permitan una autogestión razonada de sus síntomas y mejorar la adhesión a los tratamientos. La educación terapéutica debe estar estructurada y organizada. Debe ser accesible para los pacientes, tanto en el hospital como en el ámbito de la atención primaria ⁸⁹.

La mayoría de los niños con asma responden bien a las terapias estándar, sin embargo, una proporción significativa del 4.5% tiene un asma grave que es resistente a las terapias convencionales y requieren de una medicación adicional para mantener el control de los síntomas ^{4,90}. Actualmente, están aprobados tres fármacos biológicos para niños (de 6 a 18 años). Estos son: el omalizumab y más recientemente, mepolizumab y Dupilumab. Basados en anticuerpos monoclonales, creados mediante tecnología del DNA recombinante y que actúan como antiinmunoglobulina E (IgE), anti-IL-5 y anti-IL-4/anti-IL13 ^{91,92}. Afortunadamente, un estudio realizado por Ross et al., muestra por primera vez, que aproximadamente la mitad del asma grave infantil, se resuelve durante la adolescencia. Esto debido al aumento de andrógenos, asociados con una disminución de la inflamación en el asma. Y un aumento de

testosterona que promueve la relajación del músculo liso de las vías respiratorias. Por tanto ambos sexos podrían verse beneficiados por el aumento en los niveles de andrógenos en la adolescencia ⁷⁷. En la Tabla 2 se muestran los tipos de inhaladores según su forma de uso y años de edad ⁴⁹.

Una mejor comprensión de la etiología y los mecanismos de la enfermedad conducirá a un manejo óptimo y al desarrollo de una medicina personalizada para el asma, el cual se convierte en un desafío importante para el mañana ^{93,94}. Dentro de las opciones enfocadas a un tratamiento individualizado, surge el tratamiento con inmunoterapia específica con alérgenos (SIT) y la alternativa de los biomarcadores, que pueden constituir dianas terapéuticas o factores de pronóstico ^{90,95}. Los avances de la medicina han logrado un buen control de síntomas, con consecuente mejoría en la calidad de vida de los pacientes, aunque no se ha encontrado un tratamiento que sea curativo. A pesar, de los múltiples esfuerzos de diferentes entidades de salud mundiales, el asma sigue siendo una de las principales causas de ausentismo escolar y hospitalización en niños ⁷².

Tabla 2. Sistemas de inhalación recomendados de acuerdo a la edad.

Edad	Inhalador recomendado
Niños < 4 años	Inhalador presurizado con cámara espaciadora de pequeño tamaño y mascarilla facial.
De 4 a 6 años	Inhalador presurizado con cámara espaciadora con/sin mascarilla.
> 6 años	Inhalador de polvo seco.
	Inhalador presurizado activado por inspiración. Inhalador presurizado con cámara

1.4.5 Fisiopatología: mecanismos inmunológicos del asma

La inflamación aguda y crónica en el asma está mediada por la compleja interacción entre el sistema inmunológico innato y adaptativo ⁶⁶. El patrón inflamatorio característico del asma, incluye un daño en la mucosa de las vías respiratorias y un aumento del número de mastocitos, eosinófilos activados, células natural killer (NK) y linfocitos Th2, que liberan mediadores que ocasionan los síntomas de la enfermedad ^{85,92}. Sin embargo, aproximadamente el 50% de los pacientes, diagnosticados con asma leve o grave, albergan una respuesta tipo Th2 en sus vías respiratorias, que induce la producción de citoquinas inflamatorias ⁹⁶.

La Figura 8 resume las vías inmunológicas implicadas en la respuesta tipo 2 en el asma. El inicio de la sensibilización al alérgeno se produce en la superficie de las mucosas de las vías aéreas. Aquí entran en juego la IL-25 e IL33 que, en respuesta al daño en los epitelios, aumenta la permeabilidad, permitiendo el acceso de los alérgenos y su captura por las células dendríticas (CD). No es hasta una segunda o tercera exposición al alérgeno, cuando se generan mecanismos de defensa, que intentarán controlar la agresión o generar una respuesta

exagerada. La IL-25, IL-33 y la linfopoyetina del estroma tímico (TSLP), derivadas del epitelio y de la epidermis, juegan un papel fundamental en el inicio de la inflamación alérgica en el asma y la dermatitis atópica, influyen en el estado de activación/maduración de las CD, que tras alcanzar los tejidos linfáticos de drenaje activan y diferencian células T CD4 + vírgenes a células Th2 secretoras. Además, pueden estimular células linfoides innatas grupo 2 (ILC2) para liberar citoquinas de tipo Th2. La IL-4, IL-5, IL-9 y la IL-13 son las principales citoquinas involucradas^{5,6,97-99}. La producción y liberación de citoquinas y quimiocinas como IL-3, IL-4, IL-5, IL-13, Ligando-5 de quimiocinas CC y factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), reclutan células inflamatorias como neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos T y macrófagos al sitio de inflamación. Lo que genera hipersecreción de moco, inflamación de la vía aérea, hiperreactividad y remodelación de las vías respiratorias¹⁰⁰⁻¹⁰². Esto provoca que el flujo de aire disminuya y los pacientes presenten tos, disnea, sibilancias y opresión torácica, manifestaciones de la respuesta asmática temprana⁹⁸. En la fase tardía la IL-4 desempeña un papel importante en la activación y producción de IgE por los linfocitos B⁹⁶.

La IgE secretada se une al FcεRI en los mastocitos y basófilos, sensibilizando al paciente frente al alérgeno, pero sin desarrollo de sintomatología (Fase temprana). Al estar expuesto al alérgeno por segunda vez, se induce la desgranulación celular y la liberación de histamina, triptasa, cisteína-leucotrienos y factores activadores de plaquetas, que estimulan el reclutamiento de células inflamatorias como eosinófilos, macrófagos, neutrófilos y linfocitos (fase tardía)^{98,100}. Los productos liberados por estos leucocitos activos, asientan las bases de la hiperreactividad y remodelación de las vías aéreas, que al causar daño en las capas epiteliales, favorecen la broncoconstricción y la deposición de la matriz extracelular. La persistencia del proceso inflamatorio y la continua estimulación con el alérgeno generan cambios persistentes en la estructura de las vías aéreas, como hiperplasia de células caliciformes, fibrosis subepitelial y deposición de colágeno en el músculo liso, lo que lleva al paciente a la fase crónica del asma⁹⁸.

El aumento de IL-4 e IL-13 pueden amplificar la respuesta Th17, inducir la metaplasia de células caliciformes, aumentar la producción de moco y MUC5AC, mientras que disminuye el MUC5B, lo que modifica la proporción de mucina formadora de gel en las vías respiratorias⁶⁶. Sin embargo, en modelos murinos de asma, la neutralización de IL-4 o IL-13 resulta en un aumento de células Th17 e inflamación neutrofílica, mientras que la neutralización de la IL-13 y la IL-17 evita la inflamación tanto eosinofílica como neutrofílica y la aparición de hiperrespuesta bronquial⁵.

La IL-5 en el tejido bronquial, es un regulador crítico de los eosinófilos y es esencial para la maduración, activación y quimioatracción de eosinófilos de la circulación sistémica en el parénquima pulmonar. La gravedad del asma se ha asociado durante mucho tiempo con la inflamación eosinofílica y a la neutrofilia⁹⁶. Los eosinófilos pueden liberar proteínas derivadas de los gránulos, las más citotóxicas son la proteína catiónica de eosinófilos y la proteína básica principal. Estas proteínas se liberan durante la activación de los eosinófilos, y aunque también pueden ser liberadas por otros procesos, su presencia en los líquidos o tejidos corporales se

acepta como un marcador de activación eosinofílica. Pueden titularse en sangre, esputo y líquido de lavado broncoalveolar o inmunohistoquímica en muestras de biopsia ¹⁰³.

Además, células Th1, Th17 y T citotóxicas también contribuyen a la inflamación pulmonar en el asma neutrofílica, al liberar diversas citoquinas como INF- γ , TNF- α , IL-17, IL-21 e IL-22, induciendo la apoptosis de células del epitelio aéreo ^{98,104,105}. La expresión de las quimiocinas CCL-11 y CCL-24 por los macrófagos intersticiales pulmonares participan en la quimiotaxis de eosinófilos de sangre periférica en la patogenia del asma ¹⁰⁶.

La producción y liberación de TSLP por las células epiteliales de las vías respiratorias, se activa a través de diversas señales de peligro, como lesiones mecánicas, agentes relacionados con infecciones y alérgenos, lo que respalda su función como una alarmina que indica el compromiso de la integridad epitelial. TSLP aumenta en las vías respiratorias asmáticas y se correlaciona con la expresión de quimiocinas, una respuesta Th2 y la gravedad de la enfermedad ¹⁰⁷.

La IL-9, es producida principalmente por células Th9, en niños con asma alérgica altera la producción de IFN- γ y promueve sinérgicamente la secreción de IgE inducida por IL-4 ¹⁰⁸. IL-2 es un factor de crecimiento y supervivencia de células T que promueve la diferenciación del fenotipo de células T de memoria y la proliferación de células T CD4 +, Th2 ¹⁰⁹. La IL-6 puede ser sintetizada y secretada por muchos tipos de células, incluidos monocitos, células T, fibroblastos y células endoteliales. Es un factor activo que contribuye a la patogénesis del asma y su concentración se encuentra elevada en pacientes asmáticos, es necesaria para la hipersecreción de moco por las células epiteliales de las vías respiratorias y promueve la producción de IL-1. Estudios recientes consideran que la IL-6 puede ser un modulador clave de la respuesta inmunitaria general, así como de la función de las células no inmunes ^{110,111}. La IL-6 puede unirse al IL-6R soluble, aumentado después de la exposición al alérgeno en pacientes asmáticos, favoreciendo la expansión de las células Th2 ¹¹².

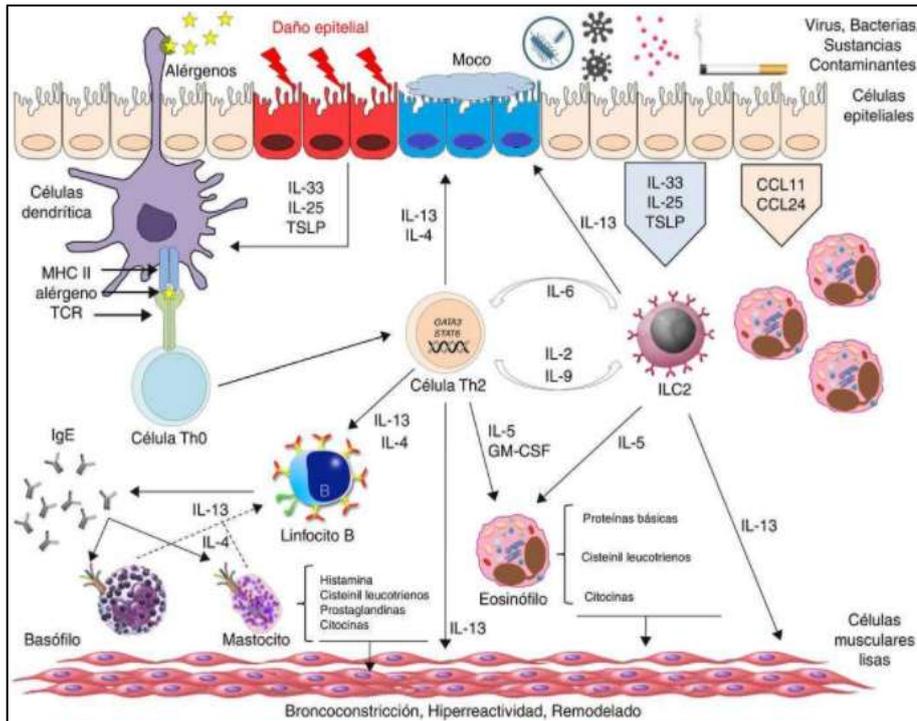


Figura 8. Principales vías inmunológicas implicadas en la respuesta tipo 2 en el asma ⁵.

1.5 La obesidad

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa que, puede ser perjudicial para la salud ¹¹³. Es lamentable, que en algunos países del mundo, la obesidad entre niños y adolescentes, supere la obesidad en adultos ^{114,115} ya que, una vez establecida la obesidad es difícil de tratar. El exceso de peso corporal en la juventud, aumenta el riesgo de inicio temprano de enfermedades no transmisibles relacionadas y obesidad adulta. La obesidad infantil se asocia con numerosas afecciones cardiovasculares y metabólicas que incluyen: dislipidemia, hígado graso no alcohólico, hipertensión, resistencia a la insulina ^{116,117}. Además de implicaciones para la autoestima, la salud mental y la educación a largo plazo. Generando como resultado una calidad y esperanza de vida reducida ^{3,118}.

El índice de masa corporal (IMC), que es el peso en kilogramos dividido por la altura en metros al cuadrado $[\text{peso (kg)}] / [\text{altura (m)}]^2$, se utiliza para identificar la obesidad. Aunque, el IMC no se usa en niños y adolescentes de 2 a 18 años, en su lugar, se recomienda utilizar una escala de percentiles basada en el sexo y la edad del niño. En esta población, un peso normal es un IMC entre el percentil 5 y el 85, el sobrepeso se define como un IMC en el percentil 85 al 94, y la obesidad es un IMC en el percentil 95 o superior ^{119,120}. La circunferencia de la cintura (CC), el índice cintura-cadera (WHR) y el índice cintura-altura (WHtR) se utilizan comúnmente para detectar la obesidad central, y se ha sugerido que el IMC, CC y WHtR pueden identificar el riesgo de padecer trastornos metabólicos y accidentes cardiovasculares en niños y adolescentes ^{121,122}.

1.5.1 Factores de riesgo para el desarrollo de la obesidad en niños y adolescentes.

El elevado consumo de ácidos grasos saturados, azúcares, sal y un bajo consumo de proteínas y fibra, pueden aumentar el peso corporal y contribuir al estrés oxidativo y al incremento de la inflamación crónica de bajo grado ¹²³⁻¹²⁵. Entre otras causas tenemos la falta de actividad física y el incremento de actividades sedentarias que representan en la actualidad, el estilo de vida de gran parte de la población infantil. Este desequilibrio entre ingesta y gasto energético sostenido por períodos prolongados de tiempo, ha sido reconocido como la principal causa de la elevada y creciente prevalencia de obesidad ¹²⁶. Factores genéticos, epigenéticos, biológicos, agentes ambientales (fármacos obesogénicos), toxinas, estrés, infecciones, privación de sueño; Además de los factores socioambientales, incluida la familia, la escuela, la comunidad, las políticas nacionales, exposición al marketing y la crianza, pueden desempeñar un papel fundamental en el desarrollo de la obesidad infantil ^{114,118,125,127,128}. La obesidad materna y el aumento de peso durante el embarazo también son factores de riesgo de obesidad infantil. Las asociaciones pueden atribuirse a efectos causales del entorno intrauterino o factores ambientales genéticos, posnatales, diabetes gestacional materna y alimentación con fórmula ^{118,129}. La exposición al tabaquismo materno, sigue estando asociado con la obesidad infantil a la edad de 9 a 10 años ¹³⁰.

1.5.2 Prevención y tratamiento

La prevención del sobrepeso y la obesidad en los adolescentes se ha convertido en una prioridad de salud pública, debido a su creciente prevalencia en todo el mundo ¹³¹. Hasta la fecha, no se ha encontrado un tratamiento totalmente eficaz a largo plazo para la obesidad, y la comunidad científica intenta encontrar nuevas soluciones. Actualmente, el tratamiento de la obesidad es multidisciplinario, e incluye dieta, intervenciones en el estilo de vida y, en casos seleccionados, farmacoterapia y cirugía bariátrica ^{132,133}.

1.5.2.1 Dieta

Las estrategias de prevención de la obesidad buscan modificar el entorno obesogénico del niño centrándose en la nutrición de 3 períodos críticos: 1) prenatal y posnatal 2) primera infancia 3) edad escolar y adolescencia. El objetivo principal de estas estrategias se enfoca en la nutrición del niño, desde su estancia en el vientre materno hasta la adolescencia. Por lo tanto, es primordial crear un cambio en la conducta alimentaria desde la infancia, de lo contrario, podrían crearse hábitos alimenticios nocivos en la infancia, adolescencia y edad adulta. Propiciando así el camino a padecer obesidad, enfermedades cardiometabólicas, entre otras ¹²⁸.

1.5.2.2 Actividad física y conducta

Las intervenciones de cambio de comportamiento se consideran la línea de tratamiento del sobrepeso y la obesidad infantil³. Estudios realizados en el entorno escolar, han demostrado los efectos beneficiosos del ejercicio en niños y adolescentes. La actividad física diaria, en combinación con una ingesta calórica reducida y un comportamiento sedentario bajo, pueden lograr y mantener una pérdida de peso significativa en los adolescentes^{131,134}. La actividad física que combina ejercicios aeróbicos y anaeróbicos, con una duración de al menos 180 minutos de ejercicio a la semana, o en su caso tres sesiones de 60 minutos de intensidad moderada, han demostrado ser efectivos en la pérdida de peso en niños y adolescentes. Los programas de reducción de peso, que tienen en cuenta la participación familiar son más efectivos¹³⁵.

1.5.2.3 Farmacoterapia

La farmacoterapia contra la obesidad y aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), debe ser administrada por médicos que tengan experiencia en el uso de agentes contra la obesidad, y sean conscientes del potencial de posibles reacciones adversas. La farmacoterapia para niños o adolescentes con obesidad debe recomendarse, solo después de que un programa de modificación intensiva del estilo de vida, no haya logrado limitar el aumento de peso o mejorar las comorbilidades. No se recomienda el uso de medicamentos en niños y adolescentes <16 años¹³⁴. Se han estudiado varios fármacos que comprenden metformina, agonistas del receptor del péptido 1 similar al glucagón, naltrexona-bupropión, fentermina-topiramato y lorcaserina como agentes antiobesidad pediátricos. Los resultados de los ensayos clínicos llevados a cabo por Grandone et al., mostraron un efecto modesto pero significativo de estos medicamentos en la pérdida de peso¹³². La terapia con medicamentos debe adaptarse al paciente individual, dependiendo de las necesidades, contraindicaciones y costo. Los medicamentos deben evaluarse regularmente y debe considerarse un medicamento diferente, si no se pierde al menos el 5% del peso corporal a los 3 meses de terapia¹³².

1.5.2.4 Cirugía

La cirugía metabólica y bariátrica en adolescentes (12-18 años), es al menos tan efectiva y bien tolerada como en adultos. Debe considerarse en personas con obesidad severa. Roux-en-Y bypass gástrico (BGYR) ha sido considerado como el estándar de oro para el tratamiento quirúrgico de la obesidad severa en adultos y adolescentes. Dando como resultado una pérdida de peso significativa y sostenida por alteraciones en el apetito, la saciedad y la regulación del equilibrio energético. La gastrectomía vertical en manga (VSG) implica la extirpación de alrededor del 80% del estómago, se ha convertido en la operación más recomendada en adolescentes debido a la pérdida de peso y una tasa de complicaciones significativamente menor. La banda gástrica ajustable laparoscópica (LAGB),

no está aprobada por la FDA en pacientes menores de 18 años y se ha encontrado que tiene una alta tasa de falla ^{116,119,133,136}.

1.5.2.5 Psicoterapia

Estudios clínicos psicológicos, han indicado que los niños y adolescentes con obesidad, suelen tener problemas psicológicos que actúan como factores causales o de mantenimiento de la obesidad y, por lo tanto, afectan significativamente el resultado del tratamiento. Dentro de los problemas psicosociales y emocionales tenemos, el deterioro de la conciencia de sí mismos, baja autoestima, bajos niveles de felicidad y satisfacción, inferioridad, hiperactividad, ansiedad y depresión. Además, problemas de comportamiento, poca capacidad para vivir de forma independiente, habilidades laborales deficientes, capacidad de ejercicio limitada y un equilibrio corporal y una función autónoma deficiente, junto con una falta de adaptabilidad social. Los niños y adolescentes que reciben tratamiento por obesidad, tienen muchos problemas psicológicos subyacentes. Estas dificultades se correlacionan positivamente con el grado de obesidad. Por lo tanto, el tratamiento clínico de estos problemas requiere no solo el uso de medicamentos, una mejor nutrición y ejercicio saludable, sino también abordar los problemas psicológicos subyacentes ^{117,137}.

1.5.3 La obesidad y su vínculo con el sistema inmunológico

La obesidad produce cambios profundos en la función inmunológica y tiene importantes implicaciones no solo para las defensas del huésped, sino también para enfermedades inmunes como el asma. La obesidad altera la función de los macrófagos en el pulmón y parece tener efectos importantes sobre la función de los linfocitos ¹³⁸.

En el ser humano coexisten dos tejidos adiposos con funciones diferentes: el tejido adiposo blanco (WAT) y el tejido adiposo marrón (BAT). WAT representa la gran mayoría del tejido adiposo del organismo. El tejido adiposo almacena energía en forma de triglicéridos y colesterol como una única gota de lípido grande, mientras que el BAT está involucrado en la termogénesis y la quema de grasa. WAT está compuesto por muchos tipos de células, siendo los adipocitos los más abundantes ¹³⁹. Se considera un órgano endocrino que secreta activamente citoquinas, también conocidas como adipocinas. Las adipocinas juegan un papel importante en el control del metabolismo humano ¹⁴⁰. En la Figura 9 se resume la respuesta inflamatoria entre el tejido adiposo blanco y las vías respiratorias, en pacientes obesos-asmáticos con fenotipo eosinofílico y no eosinofílico.

El tejido adiposo disfuncional en individuos obesos, presenta una inflamación sistémica de bajo grado, que se caracteriza por la elevación en los niveles circulantes de citoquinas inflamatorias, así como por el aumento de la infiltración de macrófagos en tejidos periféricos. Los macrófagos del tejido adiposo se pueden dividir en dos fenotipos principales: los macrófagos M1 y M2. Los M1 producen citoquinas proinflamatorias que favorecen la

resistencia a la insulina y los M2 producen citoquinas antiinflamatorias, estas participan en el mantenimiento de la homeostasis tisular y son típicos del tejido adiposo de individuos delgados¹⁴¹. Este contexto inflamatorio no induce lesión o pérdida de la funcionalidad en el tejido infiltrado, lo cual constituye un rasgo distintivo de un estado de inflamación sistémica de bajo grado¹⁴² que, en individuos obesos cursa con secreción activa de hormonas y péptidos tales como: IL6, IL8, IL10, leptina, resistina, proteína C reactiva (PCR), inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI 1), haptoglobina, proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), proteína de unión al retinol 4, la eotaxina, el factor de necrosis tumoral (TNF- α), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β 1) y disminución de la adiponectina^{139,143,144}. Los niveles elevados de IL-6 se han correlacionado con un IMC más alto, un aumento en los leucocitos sanguíneos totales y los neutrófilos sanguíneos, una función pulmonar más baja y exacerbaciones del asma más frecuentes^{145,146}.

La leptina en la circulación, regula la ingesta de alimentos y la homeostasis del gasto energético. Además de estimular la producción de mediadores proinflamatorios, a partir del tejido adiposo como: TNF- α , IL-6, IL-12, MCP-1 e INF- γ . Se ha propuesto que existe la posibilidad de que la leptina, relacionada con la estimulación en la producción de citoquinas proinflamatorias, participe como un mecanismo regulador del asma. Si bien se conoce que en el asma las interleucinas IL-4 e IL-5 son mediadores importantes en la inflamación, existe escasa información acerca del papel de la leptina en esta enfermedad¹⁴⁷⁻¹⁴⁹.

La adiponectina es un péptido secretado en su mayoría por WAT, se encuentra disminuido en personas obesas y juega un papel central en las enfermedades asociadas con la obesidad. Tiene efectos sensibilizantes a la insulina, antiaterogénicos, antiinflamatorios y, en ciertos entornos, también disminuye el peso corporal, ya que se ha observado que sus niveles aumentan con la reducción de peso¹⁵⁰. La adiponectina, induce la producción del mediador antiinflamatorio IL-10, que inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias, incluidas IL-1, IL-2, IL-6, IFN- γ y TNF- α ¹⁵¹. Otros estudios sugieren que la adiponectina podría tener efectos pro y anti inflamatorios, asociados a las isoformas LMW (bajo peso molecular) antiinflamatorios y HMW (alto peso molecular) proinflamatorios¹⁴⁹.

El inflamasoma 3 (NLRP3), es un sensor intracelular que detecta partículas microbianas y señales de peligro endógenas. Representa un componente clave de las respuestas inmunitarias innatas en las vías respiratorias y conduce a la liberación dependiente de la caspasa 1 de las citoquinas proinflamatorias, IL-1 β e IL-18. La activación de NLRP3 está críticamente involucrada en la patogénesis del asma. De hecho, aunque NLRP3 facilita la eliminación de patógenos en las vías respiratorias, la activación persistente de NLRP3 por irritantes inhalados y / o alérgenos ambientales inocuos puede provocar una inflamación pulmonar manifiesta y una exacerbación de las manifestaciones del asma¹⁵².

Se sabe, que existe una asociación entre el asma y la obesidad, reflejada en la producción de algunas citoquinas proinflamatorias por parte del tejido adiposo en asmáticos obesos que podría tener consecuencias clínicas y de función pulmonar para estos pacientes¹⁴⁹. Se ha planteado la hipótesis, de que los efectos reguladores resultantes de las vías inmunomoduladoras subyacentes a ambas enfermedades, son uno de los mecanismos por los que la obesidad aumenta el riesgo y la gravedad del asma. Esta sinergia entre ambas patologías, genera broncoespasmos más severos, mayor tiempo de recuperación, uso prolongado de medicamentos y una calidad de vida disminuida⁷⁸. El sexo femenino se asocia con mayor frecuencia con la obesidad, lo que duplica el riesgo de desarrollar asma. Esto impulsa la hipótesis de que las hormonas sexuales femeninas pueden influir. De hecho, la incidencia del asma es más alta en las niñas prepúberes que en los niños, y esto sigue siendo así durante los años reproductivos¹⁵⁵.

Los pacientes obesos tienen un mayor riesgo de hospitalización prolongada y reingreso por asma en comparación con los pacientes delgados¹⁴⁴. El tratamiento del asma en la obesidad puede ser un desafío, ya que la obesidad se asocia con una mala respuesta a los medicamentos de control estándar¹⁴⁵. Los esteroides son menos efectivos en sujetos obesos que en sujetos delgados con asma¹⁴⁶. La reducción de peso es beneficiosa en el asma asociada a obesidad, pero tiene efectos limitados en pacientes obesos con enfermedad de inicio temprano y niveles elevados de IgE sérica¹⁴⁸.

1.7 Microbiota: aspectos generales

El término microbiota hace referencia a una comunidad compleja y dinámica de microorganismos vivos, que residen en varios sitios del cuerpo (intestino, piel, boca, vías respiratorias y vagina). La microbiota en cada individuo o población puede no ser la misma. El microbioma conformado por las bacterias, hongos, virus, arqueas y microbios eucariotes, tienen el potencial de afectar nuestra fisiología de varias maneras, incluida la función metabólica, la inflamación de las vías respiratorias, la homeostasis de los tejidos y el desarrollo del sistema inmunológico^{120,156-158}. La microbiota residente en el intestino humano es una de las comunidades más densamente pobladas¹⁵⁹. En el intestino grueso de los mamíferos la cifra de microorganismos se eleva a 10^{12} - 10^{14} . El ecosistema microbiano del intestino (microbiota intestinal) incluye muchas especies nativas que colonizan de manera transitorio o permanentemente el tracto gastrointestinal (GI), jugando un papel importante en la biología humana¹⁶⁰⁻¹⁶³. De hecho, la microbiota normal o comensal ejerce efectos profundos sobre el sistema inmunológico de las mucosas y puede ser determinante en la fisiología de las enfermedades^{79,164,165}.

Factores como el nacimiento, la alimentación, la genética del huésped, los hermanos, el sexo, el estrés y la farmacoterapia podrían afectar sustancialmente al microbioma¹⁶⁶. En la primera infancia, la configuración de la microbiota intestinal es muy variable y alberga un número limitado de bacterias, con predominio de *Bifidobacterium* coincidiendo con la leche materna como componente principal de la dieta. La complejidad de la microbiota aumenta

gradualmente en la primera infancia hasta que alcanza una configuración adulta aproximadamente a los 3 años de edad ¹⁶⁷. Las especies primarias que colonizan el intestino neonatal y del lactante, influyen en el desarrollo posterior del microbioma a través de la colonización competitiva persistente, el secuestro de recursos, la modulación de la inmunidad del huésped o el desarrollo fisiológico ¹⁶⁸. Aunque, una vez establecido el microbioma, permanece bastante estable a lo largo de la mediana edad, y solo ocurren cambios transitorios ¹⁶⁶.

En las últimas décadas, se han desarrollado técnicas moleculares dirigidas al gen del RNAr 16S y otros marcadores genéticos para caracterizar y analizar comunidades bacterianas. Estos métodos se han utilizado para revelar las funciones importantes que desempeñan los microbios en el tracto GI ¹⁶⁹. A nivel taxonómico, aproximadamente el 90% de las bacterias intestinales pertenecen a 5 filos; Firmicutes, Bacteroidetes y Actinobacteria, y la porción restante pertenece a Proteobacteria y Tenericutes ^{170,171}. Esta comunidad microbiana intestinal “central” comprende hasta 14 géneros bacterianos y 150 “especies” bacterianas, muchas de las cuales aún no se han cultivado ¹⁷². En el intestino delgado y grueso podemos encontrar un mayor predominio de las familias *Lactobacillaceae*, *Enterobacteriaceae* y *Streptococcaceae*, *Clostridiaceae*, *Bacteroidaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Fusobacteriaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Peptococcaceae*, *Prevotellaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminocoleaceae* ¹⁵⁷. Gómez-Llorente et al., llevaron a cabo un estudio multiómico que incluía niños asmáticos normopeso, sobrepeso y obesos. En este estudio se determinó la composición microbiana intestinal y un análisis de microbiomas de composición (ANCOM), el que reveló varios taxones de mayor abundancia relativa a nivel de familia, destacando *Coriobacteriaceae*, *Streptococcaceae*, *Peptostreptococcaceae* y *Erysipelotrichaceae* en los niños obesos, mientras que presentaron una menor abundancia relativa miembros de la familia no clasificados del orden *Clostridiales* y RF32, pertenecientes a las clases *Clostridia* y *Alphaproteobacteria*, respectivamente ¹⁷³.

1.7.1 Función de la microbiota intestinal

La microbiota intestinal participa en la maduración del sistema inmune, inhibición del crecimiento excesivo de patógenos, proliferación celular, vascularización, señalización neurológica, densidad ósea, biogénesis de energía, biosíntesis de vitaminas, neurotransmisores, metabolismo de sales biliares, modulación de fármacos y eliminación de toxinas exógenas ^{167,174}.

El microbioma intestinal se considera un órgano endocrino, que contribuye a la regulación del metabolismo del huésped, actuando de forma paracrina o endocrina. Destacamos los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), la secreción de péptidos intestinales, la regulación de lípidos bioactivos, los productos del metabolismo de aminoácidos y el metabolismo de la glucosa etc ^{161,167,171}. Los microbios intestinales pueden interactuar con múltiples órganos y sistemas en el cuerpo, incluido el pulmón ^{156,175}. Durante mucho tiempo se consideró que los pulmones sanos eran estériles. Pero hoy en día, se intenta comprender la

interacción cruzada entre los microbios intestinales y los pulmones, denominado "eje intestino-pulmón" (Figura 10), vital en la respuesta inmunitaria y la homeostasis en las vías respiratorias^{165,176}. El asma infantil y el desarrollo de atopia y sibilancias recurrentes, se ha relacionado con la disbiosis entre la microbiota pulmonar e intestinal, lo que sugiere, que las bacterias podrían contribuir al inicio de estas patologías y la alteración de las respuestas inmunitarias^{165,168,172}.

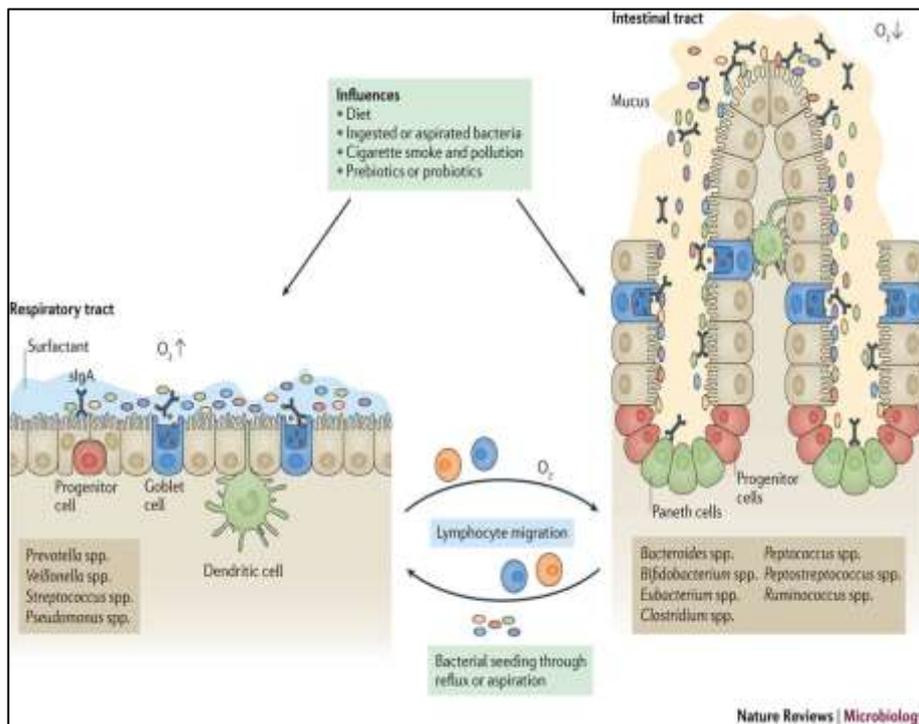


Figura 10. Características fisiológicas y morfológicas entre el intestino y el pulmón. Los epitelios del tracto intestinal y respiratorio tienen diferencias funcionales, sin embargo, conservan similitudes anatómicas. Ambos se derivan del endodermo y consisten en células epiteliales columnares con proyecciones de microvellosidades (intestino) o cilios (tracto respiratorio). Ambos secretan moco a través de células caliciformes así como inmunoglobulina A secretora (slgA). Los alvéolos consisten en células epiteliales escamosas que secretan surfactante o funcionan en el intercambio de gases. La luz intestinal es un ambiente pobre en oxígeno, con movimiento unidireccional (boca a ano), digiere y absorbe nutrientes. Por el contrario, el tracto respiratorio y los alvéolos son ricos en oxígeno y el movimiento es bidireccional (inhalación y exhalación). La temperatura en el intestino es relativamente uniforme a 37 ° C, mientras que la temperatura en el tracto respiratorio difiere según la proximidad a la faringe. Las células dendríticas en los intestinos y el tracto respiratorio, y los macrófagos en los pulmones, toman muestras de antígenos en la luz. Los linfocitos de los tejidos linfoides asociados afectan la inmunidad sistémica. Las bacterias del intestino pueden viajar a los pulmones a través de la aspiración de vómito o reflujo esofágico¹⁷².

1.7.2 La obesidad y su relación con la microbiota intestinal

La microbiota intestinal juega un papel vital en el establecimiento y desarrollo de la obesidad. En individuos obesos aumenta la capacidad en el proceso de fermentación y captación de energía de la dieta. Una alta proporción de Firmicutes a Bacteroides-Prevotella en personas obesas mejora los genes microbianos involucrados en la degradación de polisacáridos y aumenta el nivel de AGCC. En la obesidad se han logrado identificar algunas

cepas bacterianas como: *Porphyromonas*, *Campylobacter*, *Bacteroides*, *Staphylococcus*, *Parabacteroides*, *Dialister* y *Ruminococcus*. Por otro lado, se registró baja proporción de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium*, *Akkermansia*, *Methanobrevibacter* y *Coprococcus* ¹⁷⁷.

El impacto del microbioma intestinal sobre la salud y la enfermedad, especialmente su respuesta a la dieta, ha despertado interés en los últimos años. Se sabe, que el microbioma influye en las actividades relacionadas con el procesamiento de componentes de la dieta del huésped, que de otro modo serían indigeribles, lo que conlleva, a generar cambios en las comunidades bacterianas tanto en su pertenencia, como en su diversidad. Se ha demostrado que estas comunidades de bacterias intestinales son resistentes a los cambios en la dieta, recuperando su estructura una vez que el huésped reanuda una dieta previamente consumida ¹⁷⁸⁻¹⁸⁰. Turnbaugh *et al.*, llevaron a cabo un experimentos con ratones libres de gérmenes (GF), a los que inocularon con comunidades microbianas fecales humanas adultas. Los ratones humanizados fueron alimentados con distintas dietas, donde, el cambio de una dieta baja en grasas y rica en polisacáridos vegetales, a una dieta "occidental" alta en grasas y azúcares cambió la estructura de la microbiota en un solo día, cambió la representación de las vías metabólicas en el microbioma y alteró la expresión génica del microbioma. Además, se observó que los ratones alimentados con la dieta occidental, tenían una mayor adiposidad ¹⁷⁸. La alteración de la microbiota intestinal por una dieta alta en grasas (HFD) se ha relacionado con el desarrollo de la obesidad y aumento en la adipogénesis ^{181,182}. En la actualidad no se puede demostrar que una sola especie juegue un factor clave en la obesidad pediátrica ¹⁸⁰. Una microbiota intestinal en niños, con una relación de más bacterias del filo Firmicutes y menos bacterias del filo Bacteroides está relacionada con la obesidad infantil ^{183,184}.

1.7.3 El asma y su relación con la microbiota intestinal

Los microbios intestinales, a pesar de su separación anatómica con el pulmón, desempeñan un papel importante en el asma. Existe una extensa bibliografía que documenta el papel de los microbios intestinales en la salud y se sabe que las perturbaciones en la microbiota intestinal tienen consecuencias fisiológicas indirectas en sitios anatómicos remotos. Esta diafonía entre el intestino y los pulmones se ha denominado eje intestino-pulmón, que enfatiza la interconexión entre la función intestinal y pulmonar ^{156,185}.

El microbioma humano, se desarrolla desde el nacimiento, con influencia tanto de la microbiota materna como del medio ambiente y varía entre individuos ¹⁸⁶. Algunos ejemplos son el modo de parto de los recién nacidos, la dieta, suplementos dietéticos, lactancia materna, alimentación con fórmula, antibióticos, fármacos, infecciones y agentes microbianos. Evidencia reciente sugiere además que la variación genética humana también influye en la microbiota intestinal ¹⁶². Una dieta rica en nutrientes aumentada con fibras dietéticas se asocia con una microbiota intestinal más diversificada, por lo tanto, el vínculo "Dieta-Microbiota-Inmunidad" juega un papel fundamental en la salud y en la composición de la microbiota intestinal. El aumento de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) por el microbioma intestinal, conduce a

una disminución del pH en el intestino, lo que reduce las especies patógenas ^{156,187}. Los AGCC (acetato, butirato y propionato) mejoran la salud intestinal a través de una serie de efectos locales, que van desde el mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal, la producción de moco, transcripción de genes, la diferenciación de Treg y el control de la inflamación ^{187,188}.

La cesárea confiere un riesgo hasta 20% mayor de padecer asma, lo que está probablemente relacionado con la adquisición del microbioma al nacer (*Bacteroides* sp, *Escherichia-Shigella* y *Clostridium difficile*)¹⁶⁷. La colonización temprana con *Streptococcus pneumoniae*, *M. catarrhalis* y/o *H. influenzae* al mes predice sibilancias posteriores, hospitalización y finalmente, el diagnóstico de asma a los 5 años de edad ¹⁸⁵.

1.7.4 Disbiosis

La disbiosis es el desequilibrio en la composición y función microbiana, se asocia con enfermedades que van desde trastornos gastroenterológicos localizados hasta enfermedades inflamatorias, neurológicas, respiratorias (asma), metabólicas (obesidad), hepáticas, cardiovasculares e incluido el cáncer. Por lo tanto, preservar la estabilidad en la composición y función del microbioma intestinal es necesario para la salud del huésped ¹⁷⁸.

Existen distintos factores que pueden cambiar la composición y función de la microbiota intestinal durante los primeros cien días de vida, y provocar disbiosis microbiana (Figura 11). Dentro de estos factores tenemos: la genética del huésped, la dieta, la edad, el modo de nacimiento, los antibióticos, etc ¹⁷⁷. En la disbiosis microbiana del eje intestino-pulmón, se altera la homeostasis con desbalance a respuestas proinflamatorias Th2/IgE, que en individuos susceptibles genéticamente, predisponen a alergia y asma ¹⁸⁹. Se sabe que la disbiosis del microbioma intestinal está relacionada con las características del asma, eso incluye su gravedad y los fenotipos definidos por los niveles séricos de IgE.

Actualmente se llevan a cabo investigaciones enfocadas en restaurar la disbiosis microbiana mediante el uso de probióticos, prebióticos y trasplante de microbiota fecal (TMF) ¹⁷⁷. Los efectos terapéuticos y profilácticos de algunos probióticos y prebióticos podrían estar mediados, por la modificación de la microbiota o su función. Los microorganismos probióticos podrían ejercer su acción: modulando la función inmunológica, la producción de ácidos orgánicos, compuestos antimicrobianos, la interacción con la microbiota residente, la interacción con el huésped, la mejora de la integridad de la barrera intestinal y la formación de enzimas. Los prebióticos son sustratos que son utilizados de forma selectiva por los microorganismos del huésped. Sus efectos incluyen defensa contra patógenos, modulación inmune, absorción de minerales, función intestinal, efectos metabólicos y saciedad ^{190,191}. Otra estrategia terapéutica es el TMF, que consiste en el trasplante de heces de un donante sano en el tracto gastrointestinal de otro paciente receptor, con el propósito de restaurar directamente la microbiota intestinal, normalizar la homeostasis bacteriana y obtener un beneficio terapéutico

¹⁹².

1.8 Organoides

Históricamente la investigación biológica ha dependido del uso de modelos animales o cultivos de líneas celulares bidimensionales 2D. Estos modelos han ampliado el conocimiento detallado de muchas enfermedades, sin embargo, se ha encontrado como obstáculo, el extrapolar los resultados a modelos humanos, ya que existen procesos biológicos que son específicos del cuerpo humano y no pueden modelarse en otros animales ¹⁹³. De igual manera el estudio de tejidos y órganos en animales y humanos se ve obstaculizado por la accesibilidad de las muestras y las cuestiones éticas ^{194,195}. Los organoides humanos brindan oportunidades únicas para el estudio de enfermedades humanas y complementan los modelos animales. Los organoides humanos se han utilizado para estudiar enfermedades infecciosas, trastornos genéticos y cánceres a través de la ingeniería genética de células madre humanas, así como directamente cuando los organoides se generan a partir de muestras de biopsias de pacientes ¹⁹³.

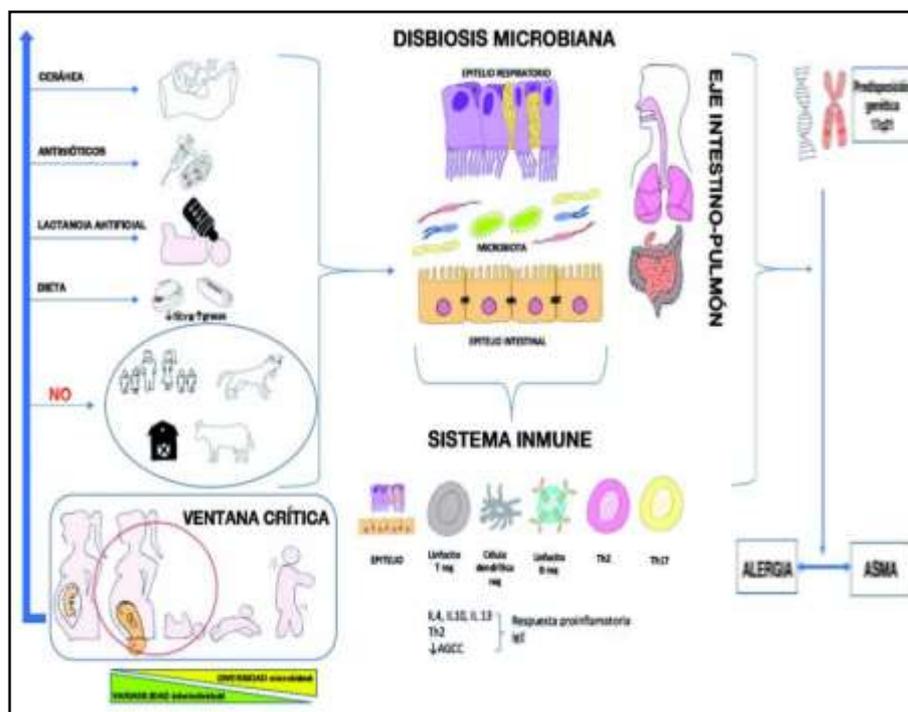


Figura 11. Esquema sobre los factores que influyen en la colonización y la composición microbiana. Factores maternos durante el embarazo: dieta, obesidad, antibioterapia. Tipo de parto: vaginal vs cesárea, prematuridad. Tipo de lactancia: materna vs fórmula. Contacto precoz con mayor número de personas. Uso de antibióticos (postnatal). Introducción de alimentos sólidos ¹⁸⁹.

Un organoide se define como una estructura 3D, cultivada in vitro, que crece a partir de células madre y, que consta de tipos de células específicas de órganos que se autoorganizan mediante la clasificación de células y compromiso de linaje espacialmente restringido. Los organoides pueden iniciarse a partir de los dos tipos principales de células madre: (1) Las células madre embrionarias pluripotentes (ESC), estas se pueden cultivar indefinidamente en el laboratorio y tienen el potencial de construir todos y cada uno de los

tejidos de nuestro cuerpo, son muy prometedoras para la aplicación terapéutica en el campo de la medicina regenerativa. También podrían utilizarse sus homologas, las células madre pluripotentes inducidas sintéticas (iPSC). (2) Las células madre adultas, multipotentes (aSC), reemplazan el tejido que se pierde debido al desgaste, los traumatismos y las enfermedades, son altamente especializadas y solo pueden producir el tejido en el que residen. Se pensó que estas células eran incapaces de desarrollarse fuera del organismo animal o humano, pero en los últimos años se han desarrollado matrices extracelulares que sirven como lámina basal para las células en cultivo. En la mayoría de los casos, se utiliza Extracto de Membrana de Sótano o Matrigel, ambos ricos en lamininas y colágenos. Adicionalmente los factores de crecimiento favorecen la mimetización de los diversos nichos de células madre de órganos, lo que ha permitido reconstituir la estructura de tejidos 3D a partir de células madre cultivadas¹⁹⁶⁻¹⁹⁸. El establecimiento de microambientes más fisiológicos, bioquímicos y biomecánicos utilizando técnicas 3D puede afectar la proliferación celular, diferenciación, morfogénesis, migración celular y supervivencia celular. Este sistema de cultivo 3D ha permitido el desarrollo de organoides del sistema nervioso, respiratorio, digestivo, genitourinario e incluso de glándulas y muchos otros tejidos¹⁹⁹⁻²⁰⁴.

1.8.1 Organoides intestinales

Los organoides intestinales han alcanzado protagonismo por su capacidad para imitar la arquitectura y la fisiología de la mucosa intestinal nativa. Este modelo *In vitro* del intestino, permite el seguimiento de la adherencia, la invasión, el tráfico intracelular, la propagación y la respuesta inmunitaria del epitelio intestinal. Los organoides intestinales pueden ser generados a partir de células madre embrionarias (ESC) o ser reprogramados por sobreexpresión de genes de pluripotencia (*c-MYC*, *OCT3/4*, *KLF4*, *SOX2*) en (iPSC) o derivarse de células madre intestinales (ISC) de la base columnar de la cripta del receptor 5+ (Lgr5+) acoplado a proteína G²⁰⁵. En presencia de factores de crecimiento adecuados, las ISC presentes en las criptas aisladas, proliferan y entran en procesos de diferenciación, recreando un epitelio complejo, que contiene todos los tipos celulares que componen el epitelio intestinal: células paneth, células enteroendocrinas, células caliciformes, enterocitos, células de penacho, células de amplificación transitoria, células Tuft y células madre intestinales (Figura 12). El epitelio generado por cultivos tridimensionales de criptas aisladas se cierra sobre sí mismo formando una esfera, en la que las células epiteliales se orientan con su lado apical hacia la luz²⁰⁶. La superficie luminal que mira hacia el interior está revestida por una monocapa de células epiteliales cilíndricas polarizadas que recapitulan la diversidad de tipos de células intestinales²⁰⁵.

1.8.2 Aplicación de los organoides en la investigación biomédica

En las ciencias de la vida, los modelos biológicos juegan un papel esencial. Los modelos celulares y de animales grandes y pequeños se utilizan ampliamente en biología del

desarrollo, genética y desarrollo terapéutico ²⁰⁷. Las aplicaciones en biología experimental implican el modelado de la fisiología, la enfermedad de los tejidos, incluidas las enfermedades malignas, hereditarias e infecciosas y modificaciones genéticas basadas en Cas9 (CRISPR-Cas9). Los biobancos de organoides derivados de pacientes se utilizan en la investigación de desarrollo de fármacos y son prometedores para el desarrollo de la medicina personalizada y regenerativa (Figura 12) ¹⁹⁷.

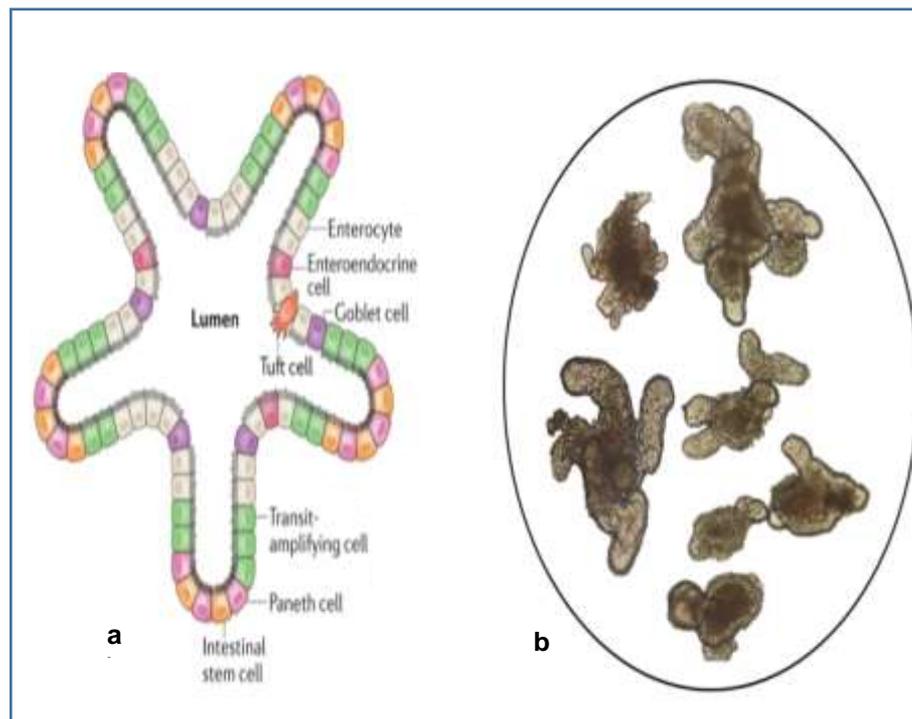


Figura 12. Morfología de un organoide intestinal de ratón. a) Células que componen el epitelio intestinal de un organoide ²⁰⁸. b) Organoides intestinales de ratón, cultivados por nuestro grupo de investigación y observados en microscopio invertido.

1.8.3 Aplicación de los organoides en la investigación biomédica

En las ciencias de la vida, los modelos biológicos juegan un papel esencial. Los modelos celulares y de animales grandes y pequeños se utilizan ampliamente en biología del desarrollo, genética y desarrollo terapéutico ²⁰⁷. Las aplicaciones en biología experimental implican el modelado de la fisiología, la enfermedad de los tejidos, incluidas las enfermedades malignas, hereditarias e infecciosas y modificaciones genéticas basadas en Cas9 (CRISPR-Cas9). Los biobancos de organoides derivados de pacientes se utilizan en la investigación de desarrollo de fármacos y son prometedores para el desarrollo de la medicina personalizada y regenerativa (Figura 13) ¹⁹⁷.

1.8.4 Limitaciones y perspectivas del cultivo de organoides.

Los modelos de organoides, tienen muchas aplicaciones beneficiosas. Sin embargo, aún se deben superar ciertas limitaciones en estos sistemas ya que, requieren mucho tiempo, trabajo, personal entrenado, son muy costosos y muy pocos integran múltiples tejidos en una sola plataforma. Además, la forma, la estructura y los patrones aún no se parecen a la situación nativa (*in vivo*). Es esencial que los tejidos reciban soporte y señales vasculares, neurales, metabólicas y hormonales de otros lugares, para la viabilidad y función normales de los tejidos ^{209,210}.

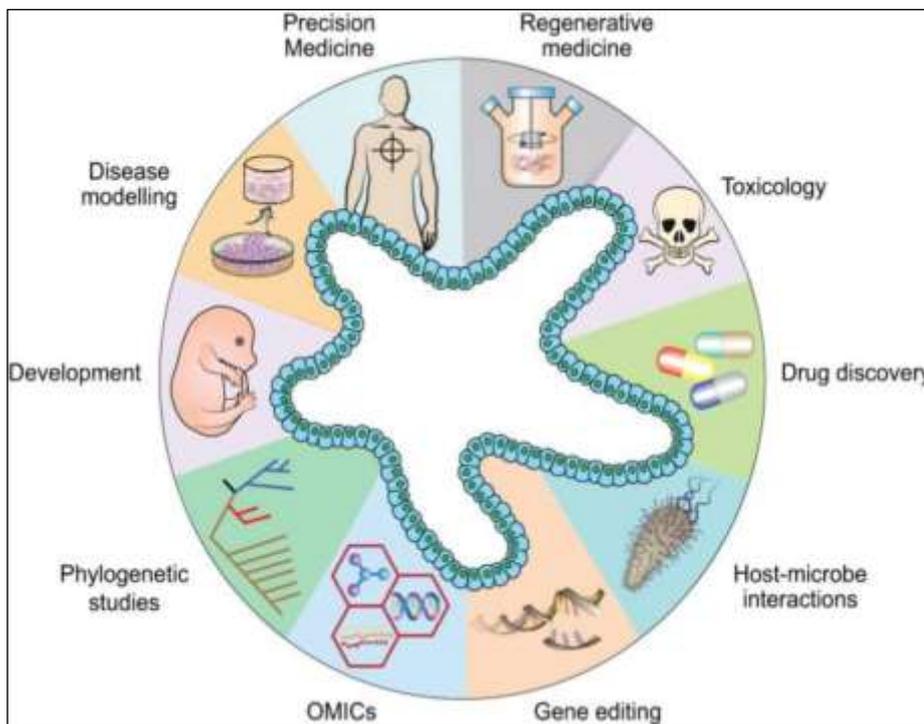


Figura 13. Aplicación de los organoides en la investigación biomédica. Los organoides en investigación pueden aplicarse a muchas áreas, incluida la biología de tejidos humanos, el estudio de los mecanismos de la enfermedad, biobancos de organoides de diversas enfermedades, medicina personalizada enfocada al tratamiento, medicina regenerativa con células que han sufrido una corrección genética, la toxicología, las interacciones huésped-microbioma, la multiómica y los estudios filogenéticos ^{194,211}.

Cuando los organoides crecen en tamaño, su maduración es limitada debido al suministro deficiente de oxígeno y la nutrición dentro de las capas más profundas del organoide, ya que tienen menos acceso a los factores de crecimiento en el medio de cultivo, debido al matrigel que mimetiza la matriz extracelular. Lo que podría afectar ensayos funcionales / bioquímicos y complicar la recolección y el pase de células (3D) en comparación con el cultivo de líneas celulares 2D. Además, los factores de crecimiento enriquecidos que rodean a los organoides, pueden comprometer los gradientes morfológicos naturales de los tejidos ^{195,211}.

Hoy en día, se sabe que los modelos organoides individuales, tienen una eficacia limitada para recapitular los muchos tipos de interacción entre múltiples tejidos, por tal razón se está avanzando en la creación de plataformas multiorganoides y su capacidad para modelar potencialmente estos fenómenos. Actualmente se están desarrollando “organoides en un chip”, incorporando tecnología microfluídica, que admite el cultivo celular y organoide, el flujo de fluidos, las pruebas de alto rendimiento y el muestreo ambiental y la biodetección (Figura 14). Estos órganos en un chip, presentan una variedad de tipos de tejidos prometedores, incluidos el cerebro, el intestino, el corazón y otros ^{210,212,213}.

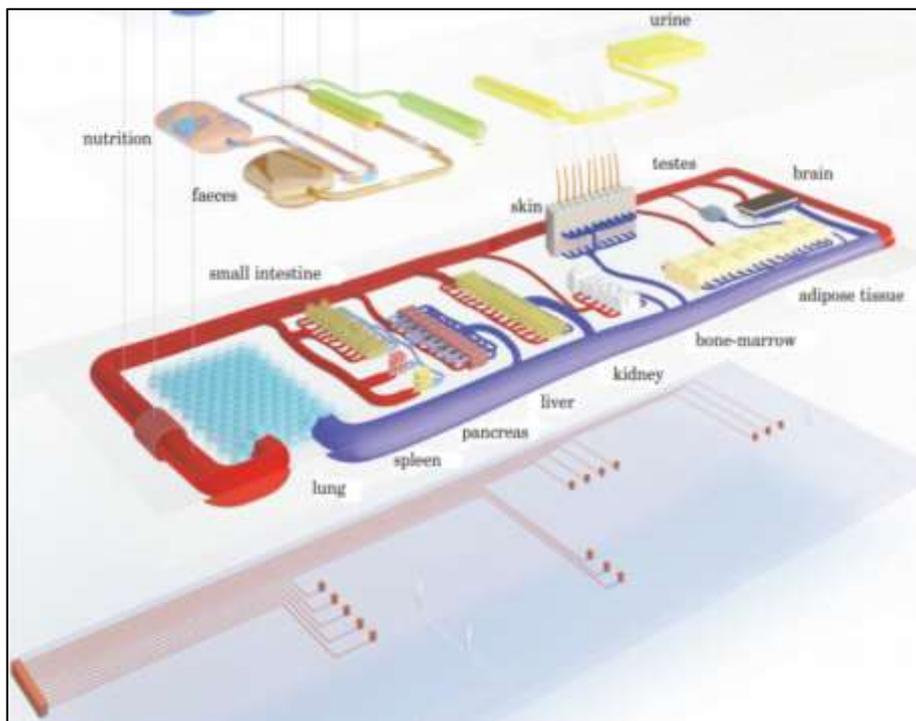


Figura 14. Prototipo de microsistemas. Recientemente introducidos para emular órganos humanos en dispositivos de "órgano en un chip" o "human on a chip" ²¹². Dichos sistemas tienen como objetivo combinar varios órganos equivalentes dentro de un entorno de metabolización similar al humano ²¹³.

La combinación de los avances en ingeniería de tejidos, los biomateriales, la biotecnología y la micro y biofabricación, permitirán el desarrollo de plataformas de organoides más complejas que modelen la fisiología y patología de enfermedades humanas, así como una mejor comprensión del efecto de fármacos a nivel sistémico ^{211,214}.

1.9 Extracto de aguas fecales

Las muestras de heces fecales han cobrado interés en la investigación debido a la información que pueden generar, debido a la interacción del huésped y la microbiota intestinal. Aunque existen limitantes ya que las heces son complejas, no homogéneas, ricas en macromoléculas y partículas no digeridas que pueden dificultar su análisis. El contenido de

metabolitos puede ser el resultado del metabolismo del huésped, de la microbiota intestinal o el co-metabolismo de ambos. Por lo tanto, el procesamiento de las muestras fecales para el análisis de metabolitos es crítico, independientemente del método de análisis. Para obtener extractos fecales adecuados, las muestras deben ser sometidas a homogeneización, sonicación, filtración, centrifugación, extracción con solvente, etc ^{215,216}. El término “extracto de aguas fecales” se refiere a la fase acuosa de las heces humanas o de animales de experimentación, que contiene una gama de componentes bioactivos como: ácidos biliares, ácidos grasos, compuestos N –nitrosos, aminas heterocíclicas, polifenoles y AGCC ²¹⁷. Los extractos de agua fecal tienen potencial como herramienta para caracterizar posibles marcadores de diagnóstico contra diferentes patologías. Esto podría ser posible al comparar los perfiles metabólicos de extractos de agua fecal de pacientes versus individuos sanos ²¹⁸.

1.10 Vías de señalización

En las vías de señalización se han descrito interacciones moleculares que de forma independiente o colectiva generan respuestas biológicas a nivel celular, que pueden estar mediadas por péptidos, factores de crecimiento, citoquinas, hormonas, agentes químicos exógenos, la diferenciación, el comportamiento celular, la proliferación, la apoptosis y sustancias que regulan el metabolismo. La respuesta dependerá de que la célula exprese el receptor específico de las moléculas señalizadoras o ligandos, siendo estos capaces de interactuar con más de un tipo de receptor celular (Figura15).

. Las proteínas receptoras detectan la señal a nivel de la membrana celular y la transmiten a moléculas transductoras internas. La señalización puede incluir: 1) receptores intracelulares o transmembrana asociados a proteínas G o a canales iónicos, que inician las señales, 2) enzimas intracelulares, que propagan y modulan las señales, 3) factores de transcripción, que dan efecto a las señales a través de la regulación de la expresión génica, 4) co-nodos y co-rreguladores transcripcionales. Podríamos decir entonces, que el proceso de señalización comienza de fuera hacia dentro, mientras que la respuesta celular de dentro a fuera. En los procesos de señalización también encontramos mecanismo de activación y desactivación molecular. Alteraciones en una inadecuada activación, desactivación o inhibición de la respuesta celular, podría reflejarse fenotípicamente en enfermedad ^{219–221}. Por consiguiente, comprender en profundidad las respuestas celulares en la señalización intracelular y su relación con algunas enfermedades, permitiría la formulación de nuevas opciones terapéuticas y diagnósticas ²²².

1.10.1 Fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3K)

PI3K es una enzima clave que produce segundos mensajeros de fosfolípidos a través de señales aguas abajo de las tirosina quinasas, los receptores acoplados a proteína G (GPCR) y las GTPasas como RAS, RAC y CDC42. PI3K tiene un papel importante en varias vías de transducción de señales, regulan varias actividades celulares, incluidas la proliferación,

la supervivencia, la apoptosis, el metabolismo, la inflamación, la autoinmunidad, la transcripción, la diferenciación y una amplia gama de otras funciones celulares, y es estimulada fisiológicamente por factores de crecimiento y factores reguladores²²³⁻²²⁶. La familia PI3K se clasifican en tres grupos según su estructura y especificidad de sustrato: **a)** PI3K de clase I (p110 α , β , γ y δ codificadas por PIK3CA, PIK3CB, PIK3CG y PIK3CD) **b)** PI3K de clase II (PI3K-C2 α , β , γ) **c)** y un solo PI3K de clase III (hVPS34)^{224,227}.

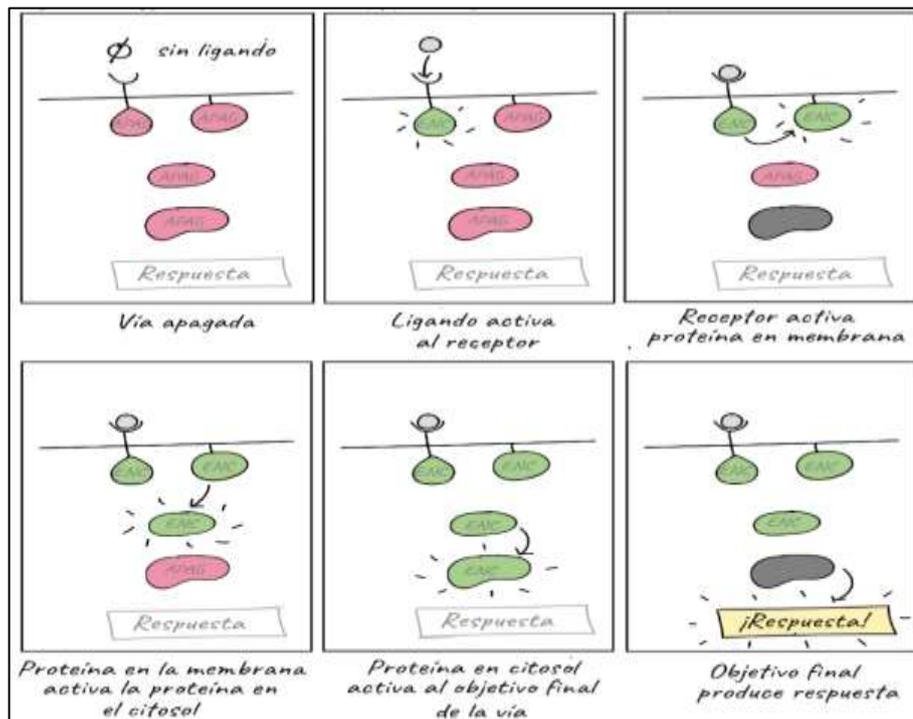


Figura 15. Esquema simplificado de una vía de señalización. La unión del ligando al receptor desencadena la activación de otras moléculas (segundo mensajero)²²⁸ dentro de la célula, lo que genera cambios en las características o comportamiento celular²²⁸.

El grupo principal de fosfatidilinositol, fosforilan la posición 3 del anillo de inositol de un lípido específico de fosfatidilinositol (PtdIns). Tras fosforilarse Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PtdIns(4,5)PIP₂), se convierte en fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PtdIns(3,4,5)PIP₃). PIP₃ se puede convertir en (3,4)PIP₂ después de la desfosforilación de la posición 5' por las 5-fosfatidas SHIP1 y SHIP2. Juntos, PIP₃ y (3,4)PIP₂ funcionan como segundos mensajeros aguas abajo de las PI3K de clase I al interactuar con los dominios de homología pleckstrin (PH) de unión a 3-fosfoinositido que se encuentran en diversas proteínas, incluidas las proteínas quinasas (AKT, BTK), proteínas adaptadoras y reguladoras de pequeñas guanosina trifosfatasa (GTPasas). La activación de Akt/PKB interviene en numerosas funciones celulares, como la angiogénesis, el metabolismo, el crecimiento, la proliferación, la supervivencia, la síntesis de proteínas, la transcripción y la apoptosis^{223,229,230}.

1.10.1.1 PI3K- α / β / γ / δ

La desactivación genética de la isoforma PI3K- α es letal desde el punto de vista embrionario en ratones. Mientras que PI3K- β muestra un fenotipo variable que va desde la letalidad embrionaria, hasta defectos en la agregación plaquetaria y la función de los neutrófilos. Por el contrario, las isoformas PI3K- δ y PI3K- γ genera ratones viables y fértiles pero con defectos en su sistema inmunológico²³¹.

PI3K- γ se expresa en los leucocitos y juega un papel importante en el reclutamiento y la activación de las células inmunitarias innatas en los sitios de inflamación. PI3K- γ está vinculado a la señalización del receptor de quimiocinas a través de receptores acoplados a proteína G (GPCR) y señalización mediada por RAS^{231,232}. PI3K γ desempeña un rol importante en la obesidad inducida por la dieta y la resistencia a la insulina. La acción de PI3K γ en la inflamación y la resistencia a la insulina inducidas por una dieta alta en grasas depende en gran medida de su papel en el control de la adiposidad, debido a la actividad de PI3K γ en un tipo de célula no hematopoyética. Sin embargo, la actividad de PI3K γ en los leucocitos es necesaria para el reclutamiento eficaz de neutrófilos en el tejido adiposo²³³. La inhibición de PI3K γ no interfiere con el metabolismo de la glucosa impulsado por la insulina pero reduce el sobrepeso y la obesidad inducida por la dieta y la resistencia a la insulina, esto mediante la reducción de macrófagos y de la expresión de marcadores de activación de macrófagos M1 presentes en el tejido adiposo²³⁴.

Por su parte PI3K δ también se expresa en los leucocitos y juega un papel clave en el receptor de antígenos, el desarrollo, la diferenciación y la función de las células B y T. Media la señalización a través de receptores de tirosina quinasas, receptores de citoquinas, integrinas, receptores de células B y T, y receptor Fc épsilon 1 (Fc ϵ R1). La síntesis del fosfolípido PIP3, regula el tráfico endosoma-lisosoma y la inducción de la autofagia, vías involucradas en la eliminación de patógenos y el procesamiento de antígenos y la supervivencia de las células inmunitarias. La inhibición selectiva de PI3K δ , γ o β tienen actividad antiinflamatoria al afectar la respuesta inmunitaria innata y adaptativa en uno o más modelos de enfermedad autoinmune, enfermedad respiratoria o inflamación alérgica, siendo generalmente más eficaz la inhibición dual γ/δ o β/δ . Por lo tanto, la inhibición de las PI3K de clase I puede ofrecer una oportunidad terapéutica contra patologías inflamatorias difíciles de tratar^{231,232}.

1.10.1.2 Inhibidor Wortmannin (Wm)

La Wortmannina es un metabolito fúngico derivado de *Fusarium oxysporum* *Penicillium wortmanni* Klocker y de *Penicillium funiculosum*. Es un potente inhibidor enzimático que se une al sitio ATP de importantes quinasas reguladoras, como la quinasa PI3K e interactúa con muchos procesos biológicos^{235,236}. Wm se ha utilizado en estudios de señalización celular que implican receptores acoplados a proteína G y

receptores de tirosina quinasas ²³⁷. Wm inhibe las quinasas PI3K de una manera no específica de isotipo al reaccionar covalentemente con una lisina en la subunidad catalítica de la enzima ²³⁸. Actualmente Wm exhibe toxicidad in vivo y por lo tanto, no es adecuado para aplicaciones terapéuticas sistémicas. Aunque Cantrell & et al., proponen generar profármacos de wortmanina latente que puedan activarse selectivamente en los tejidos diana ²³⁹.

1.10.2 Factor nuclear kappa B (NFkB)

El factor nuclear kappa B es una familia de factores de transcripción diméricos fundamentales en la regulación de las respuestas inflamatorias, mediador de la inducción de genes proinflamatorios, inmunidad innata y adaptativa, diferenciación celular, proliferación y supervivencia. El NF- κ B normalmente está en el citoplasma de forma inactiva y unido a inhibidores de κ B (I κ B), es regulado de manera estricta, por lo que su desregulación, se ha implicado en enfermedades que van desde el cáncer hasta los trastornos inflamatorios e inmunitarios. Por esa razón, dilucidar la red reguladora de NF κ B y su dinámica podría ser clave por los beneficios terapéuticos prometedores que podrían explorarse. La señalización de NF κ B responde a una serie de estímulos y, tras la interacción entre el ligando y el receptor, se activan respuestas celulares, apropiadas para la señal específica recibida. NF κ B está compuesto por 5 monómeros proteicos: NF- κ B1 (p50), NF- κ B2 (p52), RelA (p65), RelB y c-Rel, que forman homodímeros o heterodímeros que se unen al DNA de manera diferencial. La activación de NF- κ B implica dos vías de señalización: la canónica, dependiente del modulador esencial (NEMO) y la vía no canónica (o alternativa) independiente de NEMO ^{240–242}.

La activación del NF- κ B canónico es dependiente de la fosforilación del complejo IKK (quinasa I κ B). IKK consta de dos subunidades catalíticas homólogas IKK α e IKK β , y una subunidad reguladora IKK γ (también conocida como NEMO). IKK β es esencial para la activación canónica de NF- κ B en respuesta a citoquinas proinflamatorias y diversos productos microbianos, mientras que IKK α regula principalmente la activación de NF- κ B no canónico. NEMO carece de función catalítica y es necesario para la activación canónica de NF- κ B. En consecuencia, las proteínas inhibitoras I κ B se fosforilan y se someten a ubiquitinación en los residuos Lys21 y Lys22 y a la degradación por el proteosoma 26S, lo que libera el factor de transcripción κ B para translocarse al núcleo donde puede unirse a secuencias de DNA específicas (conocidas como sitios κ B o DNA κ B) presentes dentro de las regiones promotoras o potenciadoras de distintos genes diana y elevar sus niveles de transcripción ^{242,243}.

Las señales no canónicas que activan NF κ B son dependientes de la quinasa inductora de NF- κ B (NIK o MAP3K14), que induce la fosforilación de p100 a través de la activación de I κ B quinasa- α (IKK α), que a su vez induce la ubiquitinación y el procesamiento de p100, este proceso provoca la degradación de su estructura similar a I κ B C-terminal, dando como resultado la generación de NF- κ B2 p52 maduro y la translocación nuclear del complejo p52/RelB de NF- κ B activo. Este complejo activo normalmente funciona como un heterodímero

para inducir la transcripción del gen diana. Los inductores no canónicos son ligandos de un subconjunto de miembros de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR)^{241,244}.

1.10.2.1 Inhibidor Bay 11-7082

La inhibición de la señalización de NF- κ B puede ocurrir bloqueando la degradación mediada por el proteasoma o inhibiendo la fosforilación de I κ B por parte de IKK lo que mantiene a NF κ B en su forma inactiva. BAY 11-7082 inhibe el proceso de señalización aguas arriba, es un inhibidor irreversible de la fosforilación de I κ B- α , que previene la degradación de la subunidad inhibitoria NF- κ B evitando así su activación y translocación nuclear^{245,246}. Se han descrito para BAY actividades farmacológicas que incluyen efectos anticancerígenos, neuroprotectores y antiinflamatorios²⁴⁷.

1.10.3 Receptor para productos finales de glicación avanzada (RAGE)

RAGE es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas que contiene tres dominios similares a Ig, uno variable (V) y dos constantes (C1 y C2), un único dominio transmembrana y una cola citosólica corta. Por su capacidad de unión a diversas moléculas se asemeja a un receptor de reconocimiento de patrones, como los receptores tipo Toll (TLR). Debido a la presencia de múltiples dominios, isoformas de receptor y polimorfismos, RAGE puede unirse a muchos ligandos extracelulares endógenos y efectores intracelulares como: AGE (productos finales de glicación avanzada), el grupo de alta movilidad box-1 (HMGB-1 o Anfoterina), péptido β -amiloide, glicosaminoglicanos y calgranulinas S100, activando múltiples vías de señalización que dan inicio a una cascada intracelular aguas abajo mediada por múltiples mecanismos, incluida la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la activación de quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK 1/2), Janus quinasa (JAK), transductor y activador de la transcripción (STAT), Rho familia de GTPasas, proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), PI3K, AKT y factores de transcripción (AP-1 y NF- κ B). Una vez activados, los factores de transcripción migran hacia el núcleo e interactúan con el DNA generando una mayor expresión de citoquinas proinflamatorias, enzimas y oncogenes. A su vez, esta cascada genera una sobreexpresión de RAGE y sus ligandos, como AGE, S100B y HMGB1, lo que conduce a un ciclo de retroalimentación y regulación positiva de RAGE. Las interacciones entre RAGE y varias moléculas dentro del citoplasma o en la membrana celular dan lugar a respuestas que conducen a fenotipos celulares en contextos fisiológicos y patológicos. RAGE se expresa en el músculo liso vascular, fagocitos mononucleares, células epiteliales, endoteliales, alveolares pulmonares y neuronas. Estudios de inhibición in vitro e in vivo han demostrado el potencial de RAGE como diana terapéutica en cáncer, enfermedades cardiovasculares, inmunoinflamatorias, renales, metabólicas y neurodegenerativas²⁴⁸⁻²⁵¹.

1.10.3.1 FPS-ZM1 inhibidor específico de RAGE

FPS-ZM1 es un antagonista de RAGE, de alta afinidad, permeable a la barrera hematoencefálica (BBB), no tóxico, que ha demostrado efectos antiinflamatorios in vitro, debido a sus propiedades inmunomoduladoras, especialmente en el sistema periférico. Bloquea la unión de A β al dominio V de RAGE. Inhibe el estrés celular inducido por A β 40 y A β 42 en células que expresan RAGE. Las propiedades de FPS-ZM1 han sido exploradas en estudios in vitro e in vivo, por ejemplo: diabetes, nefropatías, en las neuropatías se observó un bloqueo de la señalización inflamatoria en el cerebro de ratones, reducción de la acumulación A β , mejora del rendimiento cognitivo y una reducida inflamación cerebral. En modelos de hemorragia intracerebral, redujo la disfunción en BBB y la lesión de la fibra nerviosa. En la insuficiencia cardiaca inducida por constricción aórtica transversa, FPS-ZM1 inhibió la actividad cardiaca, hipertrofia y reducción de la inflamación en los tejidos cardíacos. En un modelo de asma inducida FPS-ZM1 alteró la reactividad de las vías respiratorias, inflamación y señalización aberrante de β -catenina. FPS-ZM1 afecta la progresión del cáncer, la metástasis, la viabilidad celular, al anular el exceso de invasión causado por RAGE^{252,253}.

1.10.4 Tecnologías útiles en el estudio de interacción entre extractos de aguas fecales y organoides intestinales.

El auge de nuevas tecnologías diseñadas para mejorar el diagnóstico y la investigación molecular, crece a un ritmo exponencial y han mejorado nuestra comprensión sobre muchos procesos biológicos. Sus aplicaciones son útiles en secuenciación, multiómica, edición de genes, medicina regenerativa y personalizada, biología sintética, cultivos celulares y de tejidos. Para efectos prácticos, describiremos en detalle aquellas que han sido utilizadas para este estudio²⁵⁴.

1.10.4.1 Análisis de datos de RNA-seq

El estudio del transcriptoma de RNA ha permitido comparar e identificar diferencias en los patrones de expresión génica de diferentes tejidos y condiciones patológicas. El RNA-seq es un método de elección para estudios de expresión génica e identificación de nuevas especies de RNA, ya que ofrece menos ruido de fondo y un mayor rango dinámico de detección, revela directamente la identidad de secuencia y es útil para el análisis de genes desconocidos y nuevas isoformas de transcripción. Para llevar a cabo un experimento de RNA-seq, debe tomarse en cuenta el diseño experimental, el control de calidad, la alineación de lectura, la cuantificación de los niveles de genes, transcripciones, la visualización, la expresión diferencial de genes, el empalme alternativo, el análisis funcional, la detección de fusión de genes y el mapeo. Los RNA de la muestra de interés se fragmentan y se transcriben inversamente en DNA complementario (DNAC), que se amplifican y se someten a

secuenciación de nueva generación (NGS). Los millones de lecturas cortas generadas se mapean en un genoma de referencia y la cantidad de lecturas alineadas con cada gen (recuentos), brinda una medida digital de los niveles de expresión génica. Debido a la gran cantidad de datos que se generan, esta herramienta no está exenta de ofrecer resultados sesgados que podrían ofrecer datos de expresión erróneos. Para resolver estas interferencias, se requiere un cuidadoso control de calidad y normalización de los datos. Actualmente ha surgido la secuenciación de lectura larga de tercera generación que promete superar muchas de las limitaciones de la secuenciación de lectura corta, como resolver de manera confiable secuencias repetidas y grandes reordenamientos genómicos ²⁵⁵⁻²⁵⁸. La Figura 16 muestra una visión general del flujo de trabajo de secuenciación de próxima generación, que implica extracción de DNA, preparación de bibliotecas, seguido de secuenciación y luego análisis ²⁵⁹.

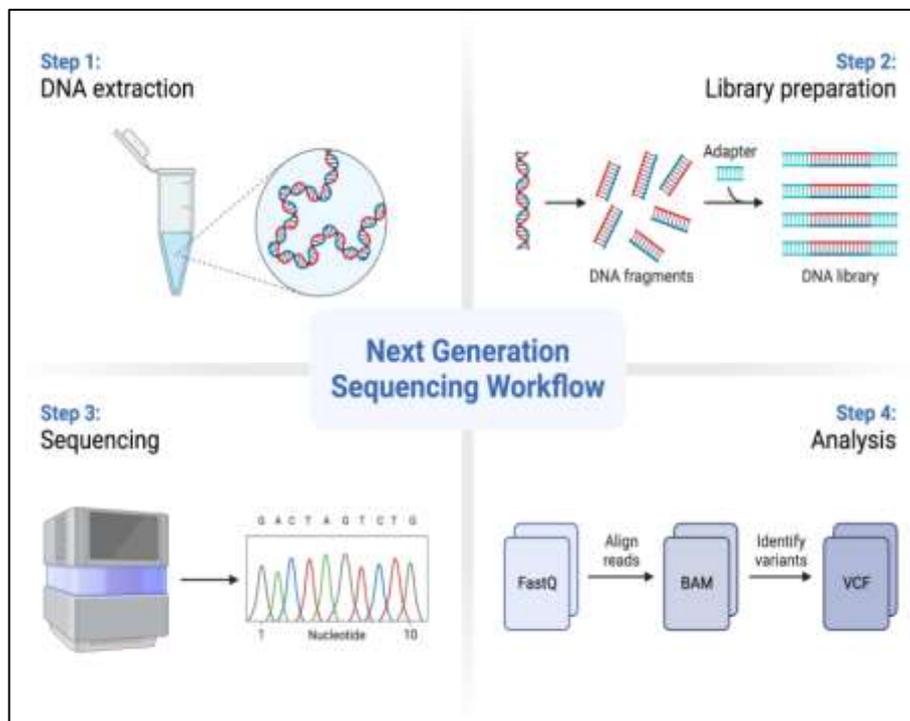


Figura 16. Flujo de trabajo de secuenciación de próxima generación ²⁵⁹.

1.10.4.2 PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

La RT-qPCR es una técnica que combina la retrotranscripción, la amplificación y la detección en un mismo paso, al correlacionar el producto de la PCR de cada uno de los ciclos con una señal de intensidad fluorescente ²⁶⁰. Se clasifica en qPCR de cuantificación absoluta y relativa, en la cuantificación absoluta, se utiliza una curva estándar de concentración de plantilla conocida y en el caso de la cuantificación relativa compara la expresión génica de una muestra con otra. El método de qPCR requiere el uso de cDNA obtenido mediante retrotranscripción (RT), que servirá como cadena molde, marcadores fluorescentes que permiten observar la amplificación,

además de la Taq polimerasa, cebadores o primers, dNTP y reactivos tamponadores. El SYBR®Green es uno de los agentes intercalantes más utilizado en este tipo de reacción, dado que el tinte fluorescente se intercala en cualquier secuencia de nucleótidos de doble cadena. Las condiciones de reacción incluyen: 1) una desnaturalización del DNA de doble cadena a 95 °C, 2) hibridación de los primers a las secuencias compatibles en el DNA cadena sencilla a 55 °C y 3) extensión de los primers por la DNA polimerasa en dirección 5' - 3' a 72 °C. Dando como resultado dos copias de la molécula original de DNA doble cadena. La investigación ha demostrado que cuando se sigue el protocolo qPCR adecuado y los cebadores se diseñan cuidadosamente, los resultados son de alto rendimiento, sensibilidad y especificidad^{261,262}.

1.10.4.3 Análisis proteómico

La proteómica es un campo que se ha visto motivado por los avances en herramientas bioinformáticas y en la necesidad de comprender la expresión de las proteínas totales presentes en células, lo que ha permitido el estudio del control postranscripcional, postraduccionales²⁶³, la estructura, expresión, funciones, modificaciones e interacciones de las proteínas. El proteoma es dinámico, complejo y fluctuante, debido a los estímulos externos y los sistemas reguladores que controlan los niveles de expresión de las proteínas. Las proteínas ejercen su efecto sobre la función biológica y sus niveles no solo dependen de los niveles de mRNA, sino también del control y la regulación del huésped. Por lo cual, estudios basados en proteómica podrían ser útiles para caracterizar un sistema biológico, para el diagnóstico, pronóstico y monitoreo del desarrollo de enfermedades. Además, juega un papel clave en el desarrollo de fármacos como moléculas diana²⁶⁴. La combinación de cultivo de organoides intestinales con proteómica cuantitativa podría ser una estrategia de elección para cuantificar los cambios globales en la expresión de proteínas, identificando así nuevas vías de señalización²⁶⁵.

Capítulo 2

OBJETIVOS

2 *Objetivos*

1. Evaluar el efecto sobre el epitelio intestinal de las aguas fecales de niños con asma alérgico con obesidad y delgados. Estudiar los efectos diferenciales sobre genes relacionados con la función de barrera del epitelio intestinal y relacionar estos efectos con parámetros macroscópicos y bioquímicos.
2. Estudiar el efecto de aguas fecales de niños con asma alérgico grave en la expresión génica del epitelio intestinal.

Capítulo 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3 *Materiales y métodos*

3.1 **Reactivos**

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

3.2 **Descripción de la cohorte**

Se incluyeron en nuestro estudio niños asmáticos prepúberes normopeso y obesos de la cohorte BIOASMA¹⁷³. Esta cohorte está formada por niños asmáticos alérgicos con edades comprendidas entre los 4 y los 13 años que fueron reclutados en la Unidad de Pediatría del Hospital Virgen de las Nieves y del Hospital Universitario San Cecilio (Granada, España). Los criterios de inclusión para la cohorte BIOASMA fueron los siguientes (1) diagnóstico clínico de asma, definido por la presencia de al menos tres episodios de tos y sibilancias; (2) edad comprendida entre 1-13 años; (3) diagnóstico de alergia tipo I basado en la clasificación de reacciones de hipersensibilidad de Gell-Coombs. Los criterios de exclusión fueron los siguientes (1) diagnóstico de una enfermedad compatible con los síntomas de asma de la clínica, como la fibrosis quística; (2) nacimiento prematuro; (3) malnutrición o presencia de otra enfermedad (diabetes mellitus tipo 2, enfermedad hepática o renal) (4) uso de glucocorticoides orales u otra medicación que pudiera influir en el microbioma gastrointestinal o en los metabolismos de la glucosa o los lípidos; y (5) estar en tratamiento de inmunoterapia. Se permitió el uso de corticoides inhalados.

La gravedad del asma se determinó según los criterios 4.4 de la Guía Española para el Manejo del Asma (GEMA) adaptados de las recomendaciones de la GINA (www.ginasthma.org). En los niños, pueden definirse dos patrones principales de asma: el asma episódica (ocasional o frecuente), basada en el número de crisis que presenta, y el asma persistente (moderada o grave)¹⁷³. La gravedad del asma fue determinada por pediatras entrenados según los síntomas, el uso de medicación de rescate, la frecuencia y gravedad de las exacerbaciones y la función pulmonar.

En nuestro estudio incluimos los niños de la cohorte BIOASMA de los cuales disponíamos de muestras de heces. Además, añadimos las heces de 4 niños sanos normopeso. En la Figura 17 se recoge la composición de la cohorte utilizada en esta Tesis Doctoral.

Los padres o tutores de los niños fueron informados sobre el estudio y el procedimiento de muestreo y se obtuvo el consentimiento por escrito. El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité Ético local de Granada (Referencia 8/15) y se llevó a cabo según los estándares dados en la Declaración de Helsinki (Edimburgo 2000 revisada), las Buenas Prácticas Clínicas de la Unión Europea (documento 111/3976 /88 de julio de 1990) y la normativa legal española vigente, que regulaba la investigación clínica en seres humanos.

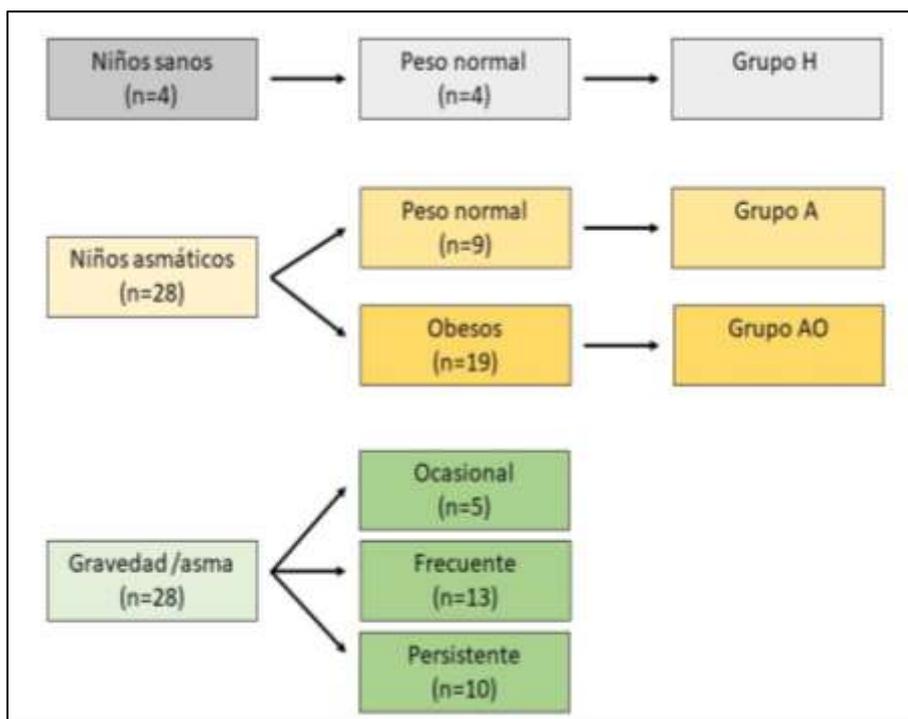


Figura 17. Descripción de la cohorte.

Los datos clínicos y las muestras biológicas fueron recogidos por personal cualificado y se codificaron según las directrices del Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía (BBSSPA). Las muestras de heces fueron recogidas por los padres o tutores de los niños, introducidas en el frasco de plástico del proveedor y conservadas a -20 °C hasta su entrega en el hospital. Todas las muestras se conservaron a -80 °C en las instalaciones de la BBSSPA hasta su análisis. Las muestras de sangre se recogieron tras 12 h de ayuno mediante venopunción en tubos recubiertos de un anticoagulante hospitalario estándar (EDTA). Las muestras de plasma se prepararon mediante centrifugación de las muestras de sangre a 1500x g durante 10 min a 4 °C, después las muestras de plasma se centrifugaron a 2500x g durante 15 min a 4 °C y se conservaron a -80 °C en las instalaciones del biobanco del BSSPA. Las muestras de plasma se utilizaron para la determinación de biomarcadores inflamatorios sanguíneos y análisis metabólicos.

3.3 Determinación de parámetros clínicos, bioquímicos y antropométricos

Pediatras formados registraron una historia clínica completa de asma alérgica mediante una entrevista clínica semiestructurada estándar. El estado alérgico se determinó mediante una prueba de IgE específica en suero positiva y una prueba de punción cutánea estándar. Además, se realizó un análisis espirométrico según los criterios de la Sociedad Torácica Americana ²³. Se realizaron tres maniobras de capacidad vital forzada (CVF) y se registró el mejor valor de CVF y volumen espiratorio forzado en 1 s (VEF1) y 25 s (VEF25). La prueba de

espirometría no se consideró un criterio de inclusión porque en los niños el FEV1 no se correlaciona bien con la magnitud de los síntomas del asma ²⁴. Del mismo modo, no se determinó la fracción de óxido nítrico exhalado porque disminuye tras el tratamiento con corticosteroides inhalados ²⁵.

El peso corporal (kg), la altura (cm) y el perímetro de la cintura se midieron mediante procedimientos estandarizados. El IMC se calculó como el peso dividido por la raíz cuadrada de la estatura (m²). La presión arterial sistólica y diastólica fue medida tres veces por el mismo examinador utilizando un esfigmomanómetro de mercurio y siguiendo las recomendaciones internacionales ²⁶.

Se determinaron glucosa e insulina en plasma en la Unidad Central de Análisis de Laboratorio de ambos hospitales siguiendo controles de calidad aceptados internacionalmente. El índice Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance (HOMA-IR) se calculó a partir de los niveles de glucosa e insulina en plasma en ayunas.

3.4 Determinación de biomarcadores inflamatorios

Las adipocinas plasmáticas (adiponectina, leptina y resistina), así como los biomarcadores inflamatorios interleucina (IL) 4, 5, 6, 8, 10, 13, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) analizaron en un sistema Luminex 200 (Luminex Corporation, Austin, TX, EE.UU.) con anticuerpos monoclonales humanos (EMD Millipore Corp, Billerica, MA, EE.UU.) Los kits utilizados fueron: MILLIplexTM HADK1MAG-61K, HSTCMAG-258K y HADK2MAG-61K.

Los niveles de proteína de unión a LPS se determinaron en muestras de plasma utilizando los kits ELISA CSB-EO9629H (CUSABIO TECHNOLOGY LLC, Houston, TX, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.5 Análisis de D lactato fecal

El D lactato fecal se determinó por métodos colorimétricos utilizando el ensayo MAK058-1KT de Sigma-Aldrich (Merck Life Science, S.L.U, Damstadt, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.6 Preparación de las aguas fecales

Se pesaron las heces de niños (grupos H, A y AO) y se mezclaron (1 g/ml) en una solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía suero bovino fetal (FBS) al 20% (v/v) y ácido etilendiaminotetraacético 2 mM (EDTA). Después de homogeneizar con vórtex durante 1 min, las muestras se sometieron a centrifugación 24.100 x g, 10 min, a temperatura ambiente (T.A). Se recogió el sobrenadante en tubos eppendorf estériles y se sonicó al 50% de amplitud durante 10 s en un dispositivo ultrasónico UP200S (Hielscher, Berlín, Alemania). Tras

una segunda centrifugación a $24.100 \times g$, 5 min, el sobrenadante fue esterilizado por filtración a través de un filtro de $0.22 \mu m$ y se almacenó a $-80^\circ C$ hasta su medición.

3.7 Aislamiento de criptas y cultivo de organoides de ratón

Los organoides se generaron a partir de segmentos de yeyuno de ratones de tipo salvaje (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). Se utilizó una dieta estándar para roedores (Harlan-Teklad 2014), y agua estéril autoclavada. Este estudio fue aprobado por el Comité de Bienestar Animal de la Universidad de Granada y se ha realizado de acuerdo con la Guía para el cuidado y uso de animales de experimentación de los Institutos Nacionales de Salud de EEUU.

Brevemente, se anestesió y diseccionó un ratón, se extrajo el yeyuno y se lavó con PBS frío. A continuación, se abre el trozo de yeyuno longitudinalmente y se corta en trozos de 2-4 mm con unas tijeras. Las piezas se transfirieron a un tubo Falcon de 15 ml y se lavaron con 10 ml de PBS frío, con agitación horizontal a $4^\circ C$ / 5min. Se retiró el PBS y se añadieron nuevamente 10 ml de PBS más $40 \mu l$ de EDTA a una concentración final de 2 mM y se incuban en agitación horizontal 30 min a $4^\circ C$. Se descartó el sobrenadante (PBS+EDTA), con cuidado de no aspirar los fragmentos de yeyuno y añadir 10 ml de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham), y se agitó manualmente durante 2 min con intensidad media, con el fin de liberar las criptas en las que se encuentran las células madre. Los fragmentos disociados se pasaron a través de un filtro de $70 \mu m$ (Falcon™ 352350, Corning®), y se cortaron las criptas. Las criptas se sedimentaron mediante centrifugación a 600 rpm durante 5 min y se suspendieron en Corning-Matrigel® (Fisher Scientific, Madrid, España) e IntestiCult™ (StemCell, Grenoble, France) con una proporción 1:1. Para mejorar la tensión superficial y la solidificación del matrigel, se preincubaron placas vacías de 24 pocillos durante 15 min a $37^\circ C$. Se sembró una gota de criptas que contenían Matrigel en cada pocillo (aproximadamente $50 \mu l$ por pocillo). Después de la polimerización, se agregaron $500 \mu l$ de IntestiCult™ suplementado con penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich). Los cultivos de organoides se mantuvieron en una incubadora humidificada a $37^\circ C$ y CO_2 al 5% y el medio se cambió tres veces por semana.

Los experimentos con organoides fueron llevados a cabo tras dos pases, y 7 días después de la siembra. En estado basal los organoides estaban embebidos en $500 \mu l$ de medio IntestiCult™, mientras que la fase experimental contenía $495 \mu l$ de medio IntestiCult™ que se estimuló con $5 \mu l$ aguas fecales a una concentración 1g/ml. Tras 24 horas de incubación, el sobrenadante se almacenó a $-80^\circ C$ para posteriores análisis y los organoides fueron procesados para la extracción de RNA y para el estudio de secuenciación de RNA (RNA-Seq).

3.7.1 Estudio de inhibición de vías de señalización

Para explorar las vías de señalización que pudieran verse afectadas, los cultivos de organoides se expusieron a: A) Wortmanina (1 μM), un inhibidor de fosforilación de fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) que inhibe la vía de señalización de AKT. B) Bay 11-7082 (10 μM), un inhibidor selectivo de la fosforilación de I κ B- α que bloquea la vía de señalización de NF- κ B. C) FPS-ZM1 (para RAGE, 10 μM), un inhibidor de alta afinidad del receptor para productos finales de glicación avanzada (RAGE). Todos los inhibidores se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO). Cada pocillo contenía organoides, más 495 μl de medio IntestiCult™ (StemCell, Grenoble, France) y se le añadió 2.5 μl / inhibidor, pasada 1h de incubación con el inhibidor a 37 ° C y CO₂ al 5%, se añadieron 5 μl de las aguas fecales, incubando una segunda vez a 37 ° C y CO₂ al 5% durante 24h. Pasada la segunda incubación, procedimos a separar el sobrenadante, el que se almacenó a -80°C, se disgregó el matrigel que contenía los organoides y se extrajo el RNA utilizando el RNeasy Mini Kit (Qiagen®, Hilden, Alemania).

3.8 Estudio de expresión génica

3.8.1 Extracción de RNA

El RNA total de cultivo de organoides se aisló utilizando el RNeasy Mini Kit (Qiagen, Barcelona, España) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración de RNA extraído de las distintas muestras de organoides se determinó usando un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific®). Considerando así mismo la relación 260/280 (DNA/proteínas) y 260/230 (DNA/solventes orgánicos) que aportan información sobre la pureza de la muestra. Luego, 1 μg de RNA se retrotranscribió en (cDNA) en un volumen de reacción final de 25 μL de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

3.8.2 Análisis de la expresión génica mediante qPCR

Se amplificaron secuencias de RNA específicas con un dispositivo Bio Rad de PCR en tiempo real CFX Connect (Bio-Rad Hercules, CA, EE. UU.). La PCR en tiempo real se realizó durante 45 ciclos, con un volumen final de reacción de 12 μl (2 μl cDNA, 2 μl de cada cebador y 6 μl de SYBER Green). Para los análisis de cuantificación relativa se utilizó el método 2- $\Delta\Delta\text{CT}$, para la cuantificación relativa se utilizaron *18s* y *Hprt* (*hipoxantina fosforribosiltransferasa*) como genes de referencia. La Tabla 3 detalla la secuencia de cebadores utilizados para el análisis qPCR que se adquirieron en Sigma Aldrich (San Luis, MO, EE. UU.) Y la Tabla 4 muestra los cebadores utilizados para qPCR, adquiridos en Bio-Rad (Hercules, California, EE. UU.).

Tabla 3. Secuencia de cebadores adquiridos de la empresa Sigma Aldrich utilizados para el análisis mediante RT-qPCR de la expresión de genes.

Gen	Hebra sentido 5' - 3'	Hebra sentido 3' - 5'
<i>18S</i>	ACACGGACAGGATTGACAGATTG	GCCAGAGTCTCGTTCGTTATCG
<i>Hprt</i>	AGGGATTTGAATCACGTTTG	TTTACTGGCAACATCAACAG
<i>Tnf</i>	CGTGGAAGTGGCAGAAGAGG	CAGGAATGAGAAGAGGCTGAGAC
<i>Nos2</i>	CATCAACCAGTATTATGGCTC	TTTCCTTTGTTACAGCTTCC
<i>Cd14</i>	GAATCTACCGACCATGGAG	AAGTTGCAGGAACAACCTTC
<i>Nt5e</i>	CTATGAGCCTCTTCAAATGG	CTGATATCTTGATCACCAGAG
<i>Cxcl9</i>	GAGGAACCCTAGTGATAAGG	GTTTGATCTCCGTTCTTCAG
<i>Cxcl10</i>	AAAAAGGTCTAAAAGGGCTC	AATTAGGACTAGCCATCCAC
<i>Muc13</i>	CTTTTTGTGTTGCTGTAACG	CAAATGGACACTCTTCACAC
<i>Tff2</i>	CTGTGGAAGATTGTCACTAC	AGATTGATGAAGTCTGGTTG
<i>Tff3</i>	CCTGGTTGCTGGGTCCTCTG	GCCACGGTTGTTACTACTGCTC
<i>Reg3g</i>	CAGAGGTGGATGGGAGTGGAG	CACAGTGATTGCCTGAGGAAGAG
<i>Claudin1</i>	CAATGCCAGGTATGAATTTG	TCACACATAGTCTTCCCAC
<i>Claudin4</i>	GACTGTGCAAAGTTACTAGC	ACCAGCAATTTGGATGTAAG
<i>Claudin5</i>	AACAGTTCCTACTGAGATCC	CTTTTTAACACGTCCCTCTG
<i>Tjp1</i>	GGGGCCTACACTGATCAAGA	TGGAGATGAGGCTTCTGCTT
<i>Cnr1</i>	AATGCCATTTAGGTGTTCTG	ATAGGTCTTAGAACCAACCC
<i>Tlr4</i>	GATCAGAAACTCAGCAAAGTC	TGTTTCAATTTACACCTGG
<i>Muc 2</i>	CCCAGAAGGGACTGTGTATG	TTGTGTTGCTCTTGGTCAG
<i>Muc 3</i>	AAAGATTACCTCCCATCTCC	TAAACTAAGCATGCCCTTG
<i>Muc 4</i>	GGATTCCTTCTACGTTACAG	GTAGAGAAATCAGCATCAG
<i>mt-Rnr1</i>	GACACCTTGCTAGCCACAC	TGGCTGGCACGAAATTTACC
<i>mt-Rnr2</i>	ACTAGCATGAACGGCTAAACG	AAGCTCCATAGGGTCTTCTCG

Tabla 4. Secuencia de cebadores adquiridos de la empresa Bio-Rad utilizados para el análisis mediante RT-qPCR de la expresión de genes.

Gen	UniqueAssay ID
<i>mt-Atp6</i>	qMmuCED0051651
<i>mt-Co1</i>	qMmuCED0061464
<i>mt-Co2</i>	qMmuCED0027
<i>mt-Cyb</i>	qMmuCED0001514
<i>mtNd6</i>	qMmuCED0061740
<i>mtNd1</i>	qMmuCED0003246

3.8.3 Análisis de expresión génica mediante RNA-seq

El RNA obtenido a partir de organoides estimulados con aguas fecales durante 24 horas, fue analizado mediante RNA-seq. La secuenciación del RNA se realizó en el Centro de Investigación GENYO (Granada, España). Se aplicó un pre-procesamiento a los datos para eliminar la posibilidad de que hubiese secuencias ribosomales (rRNA), y los datos fastq fueron tratados con el software sortmerna (<https://github.com/biocore/sortmerna>) para filtrar este tipo de secuencias. Los controles de calidad de los datos crudos se llevaron a cabo utilizando el

software FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Se utilizó el programa RSEM (Li & Dewey (2011)) para mapear y cuantificar la expresión génica de las muestras utilizando los ficheros .fasta y .gtf de referencia. Para cada muestra se incluyeron parámetros para cada gen: identificador/es del gen, longitud media de los genes, conteo, TPM y FPKM. Una vez obtenidos los mapeos y las cuantificaciones, se hicieron distintos controles de calidad a ambos tipos de datos. El análisis cuantitativo de expresión génica se realizó utilizando el sistema PANTHER (análisis de proteínas a través de relaciones evolutivas): versión 16.0 (<http://www.pantherdb.org>).

3.9 Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media \pm SEM (error estándar de la media). Se probó la significancia estadística de las diferencias entre medias utilizando un ANOVA unidireccional seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey o de Dunnett. Se usó el coeficiente de correlación de Pearson y el método de Holm-Sidak para estudiar las correlaciones y corregir por comparaciones múltiples. Todos los análisis se realizaron con GraphPad Prism 6 (La Jolla, CA, EE. UU.). Las diferencias se consideraron significativas en $p < 0,05$.

Capítulo 4

RESULTADOS

4 Resultados

Hemos dividido los resultados de esta Tesis Doctoral en dos apartados. En el primero, se recoge el estudio llevado a cabo con el fin de evaluar el efecto de las aguas fecales de niños con asma alérgico obeso (AO) y normopeso (A). En el segundo apartado se recoge un estudio en el que se seleccionaron los niños con asma más grave (GEMA=2) independientemente de su peso y se caracterizó el efecto sus aguas fecales. En ambos estudios se utilizaron organoides intestinales de ratón y se estudió su efecto sobre la expresión génica, y la relación de éste con parámetros macroscópicos y bioquímicos. Para la caracterización de la expresión génica, se utilizaron las técnicas de PCR y RNA-seq.

4.1 Estudio del efecto de aguas fecales de niños normopeso y obesos en organoides de yeyuno de ratón. Caracterización de la relación de este efecto con parámetros macroscópicos y bioquímicos.

4.1.1 Caracterización de la cohorte

Los datos macroscópicos y bioquímicos de la cohorte utilizada en esta Tesis Doctoral se muestran en la Tabla 5. El análisis simultáneo aplicando un T-test seguido de una corrección de comparaciones múltiples, utilizando el método de Holm-Sidak mostró que, como se esperaba, las puntuaciones del IMC (índice de masa corporal) y del BMIZ (índice de masa corporal estandarizado por edad y sexo) eran más altas en los obesos asmáticos (AO). La concentración de leptina en el plasma de los niños obesos asmáticos también fue mayor que la de los participantes normopeso asmáticos.

Se han descrito cambios en la función de la barrera intestinal y la inflamación en el asma y la obesidad. En este estudio nuestro primer objetivo fue determinar si el contenido intestinal de los niños asmáticos (A y AO) era capaz de modular de manera diferencial la expresión de genes que regulan estas funciones. Para este fin, agregamos homogenados fecales al medio de cultivo celular de organoides de yeyuno de ratón. También incluimos heces de un grupo de niños prepúberes sanos (H). Nuestros datos indican que *Tnf* (*Factor de necrosis tumoral*) y *Nos2* (*Óxido nítrico sintasa 2*), marcadores tradicionales de inflamación, se indujeron en organoides de yeyuno de ratón después de la adición de homogenados de niños AO en comparación con la adición de homogenados de A (Figura 18A). Se observó el mismo efecto para *Nt5e*, que codifica una ectonucleotidasa y CD73, que desempeña un papel importante en la producción local de adenosina antiinflamatoria. *Cd14*, un co-receptor de TLR4 que reconoce patrones moleculares asociados a patógenos, también fue significativamente estimulado por los homogenados de AO en comparación con todos los demás grupos ensayados.

Tabla 5. D-lactato fecal, parámetros macroscópicos y parámetros plasmáticos en niños asmáticos normopeso (A, n=9) y asmáticos-obesos (AO, n=19). Se realizó un análisis aplicando un T-test simultáneo, media \pm SEM. Después de la corrección para comparaciones múltiples utilizando el método Holm-Sidak.

	A	AO	p Valor
Asma	1,889 \pm 0,200	2,316 \pm 0,172	0.148
Edad	9,444 \pm 0,884	8,474 \pm 0,486	0.306
Peso (kilogramos)	31,122 \pm 1,980	44,887 \pm 2,886	0.005
Altura (m)	1,383 \pm 0,036	1,345 \pm 0,028	0,426
IMC	16,156 \pm 0,452	24,363 \pm 0,601	<0,0001
Puntuación BMIZ	-0,489 \pm 0,153	2,858 \pm 0,160	<0,0001
Perímetro de cadera (cm)	70,714 \pm 2,998	83,194 \pm 2,482	0.010
Proporción cintura cadera	0,837 \pm 0,019	0,862 \pm 0,023	0,487
D-lactato fecal (mM)	9,100 \pm 1,329	10,327 \pm 1,508	0.609
Glucosa (mmol/L)	4,722 \pm 0,224	4,629 \pm 0,087	0.4439
Insulina (μ UL/mL)	6,847 \pm 1,886	8,606 \pm 1,137	0,1759
índice HOMA	1,144 \pm 0,323	1,654 \pm 0,169	0.585
lumbalgia (μ g/mL)	3,171 \pm 0,604	3,600 \pm 0,461	0.606
Adiponectina (mg/L)	7,071 \pm 1,718	5,631 \pm 0,726	0,378
Resistina (μ g/mL)	13,671 \pm 1,765	13,671 \pm 1,133	>0,9999
Relación adiponectina/resistina	0,400 \pm 0,086	0,446 \pm 0,071	0.706
Leptina (μ g/L)	2,586 \pm 0,440	8,156 \pm 0,555	<0,0001
TNF (pg/mL)	3,800 \pm 0,479	3,383 \pm 0,229	0.385
IL-10 (pg/mL)	3,371 \pm 0,341	4,114 \pm 0,426	0.270
IL-13 (pg/mL)	2,517 \pm 0,681	1,927 \pm 3,373	0.419
IL-4 (pg/mL)	13.917 \pm 3.200	12,846 \pm 2,075	0,777
IL-5 (pg/mL)	1,200 \pm 0,145	1,421 \pm 0,114	0.263
IL-6 (pg/mL)	0,950 \pm 0,228	1,099 \pm 0,220	0,683
IL-8 (pg/mL)	1,957 \pm 0,188	1,793 \pm 0,212	0,624

Cxcl9 y *Cxcl10* son quimiocinas importantes en la defensa antibacteriana. El p valor de ANOVA para *Cxcl9*, con un *Fold change* (FC) de 4.33 en comparación con el grupo H, indicó una tendencia a la significancia ($p = 0.061$). A su vez, los homogenados de A solo produjeron una disminución en la expresión de *Tnf* en comparación con los homogenados de H, y no se observó ningún efecto de los homogenados de H (Figura 18A).

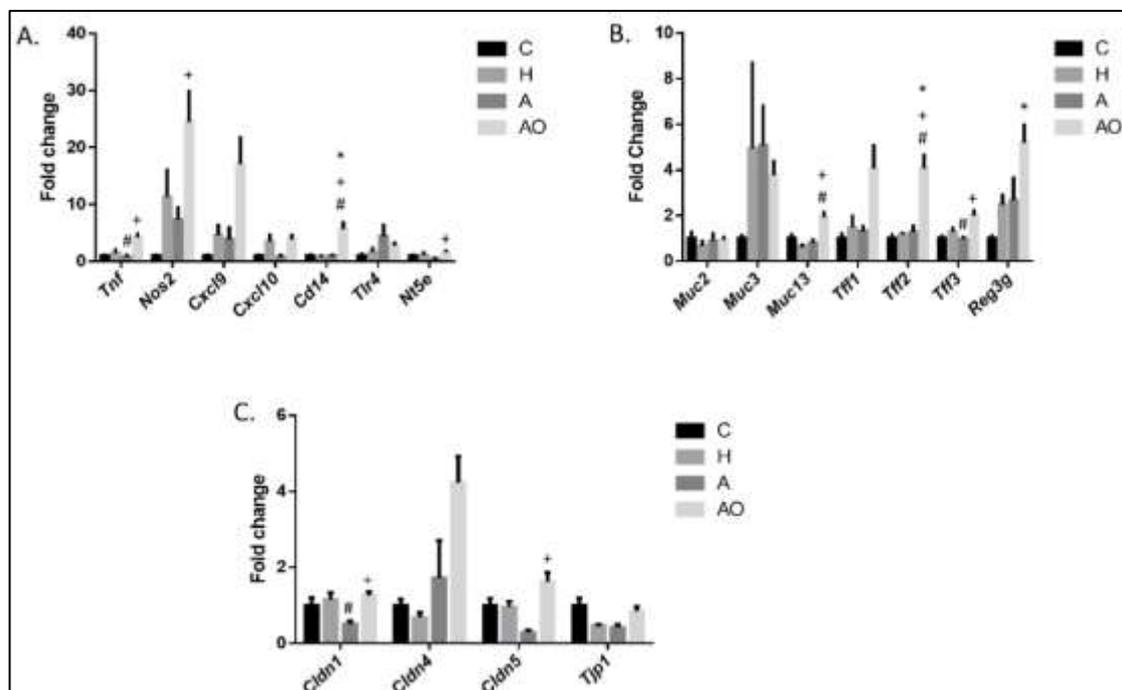


Figura 18. Efecto de homogenados fecales de niños sobre la expresión en organoides de yeyuno de ratón de genes relacionados con la función de la barrera intestinal. (A) Genes relacionados con la inflamación. (B) Mucinas, Factores Trefoil (TFF) y *Reg3g*. (C) Genes relacionados con la permeabilidad. Se agregaron homogenados fecales de niños sanos (H), asmáticos normopeso (A) y asmáticos obesos (AO) al medio de cultivo celular de organoides de yeyuno de ratón. Se realizó qPCR. Todas las muestras se analizaron por separado. Los resultados se expresan como la media del Fold change \pm SEM en comparación con el medio de control (C). Se aplicó un test ANOVA de una vía seguido de un test a posteriori de Tukey. +: $p < 0.05$ vs. A; #: $p < 0.05$ vs. H; *: $p < 0.05$ vs. C.

Las mucinas son un componente clave del moco intestinal y protegen el epitelio de la invasión bacteriana. Junto con los TFF, que son moléculas secretoras asociadas al moco intestinal, las mucinas contribuyen a la función de la barrera intestinal y son producidas principalmente por las células caliciformes. La expresión de *Muc13* y de los genes que codifican *TFF2* y *3* (*Tff2* y *Tff3*) se indujo tras la adición de aguas fecales de niños AO a los medios de cultivo de organoides de yeyuno de ratón (Figura 18B). Se observó un patrón similar para *Reg3g* (miembro de la familia regenerante 3 gamma), cuya expresión se indujo significativamente en el grupo AO en comparación con el grupo control (C). Este gen codifica una lectina que es un componente importante de la barrera intestinal, manteniendo la separación entre las bacterias y el huésped. Aunque existen otras proteínas Reg3 gamma, *Reg3g* es el homólogo del *REG3A* humano, que se expresa a niveles más altos en el intestino

delgado humano. No se observaron efectos de los homogenados A o H, excepto por una inhibición de *Tff3* en el grupo A en comparación con el grupo H (Figura 18B).

El mantenimiento de la permeabilidad intestinal fisiológica es esencial para la función de barrera intestinal. Alteraciones en la permeabilidad se han relacionado tanto con el asma como con la obesidad. *Claudina 1*, 4 y 5, y *Zonula occludens-1 (ZO-1)*, forman parte de las proteínas de las uniones estrechas que regulan la permeabilidad intestinal. El estudio de la expresión de genes que codifican estas proteínas indicó que *Cldn1* y *Cldn5* aumentaron en el grupo AO en comparación con el grupo A (Figura 18C). A su vez, se observó una disminución en la expresión de *Cldn1* en el grupo A vs el grupo H. El análisis mediante ANOVA de *Cldn4* y *Tjp1* (que codifica *ZO-1*) no indicó diferencias específicas entre los grupos, aunque el valor de p fue de 0.011 en el primer caso, y un T-test llevado a cabo entre grupos aislados indicó diferencias significativas entre los grupos C y AO y entre los grupos H y AO.

Cnr1 codifica el receptor cannabinoide 1, cuya expresión se ha demostrado inducida en condiciones inflamatorias y parece estar relacionada con la regulación de la permeabilidad intestinal cuando se sigue una dieta rica en grasas²⁶⁶. La expresión de *Cnr1* fue inducida por el homogeneizado de heces de niños AO en comparación con los otros grupos de estudio (Figura 19).

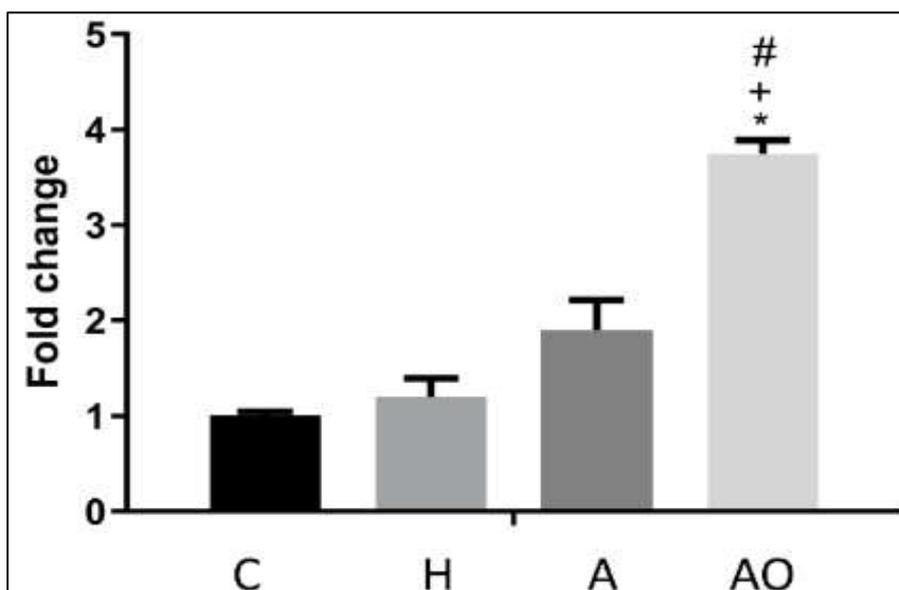


Figura 19. Efecto de los homogenados fecales de los niños en la expresión de *Cnr1*. Homogenados fecales de niños sanos (H), niños asmáticos normopeso (A) y niños asmáticos con obesidad (AO) se añadieron al medio de cultivo de organoides de yeyuno de ratón. Se realizaron tres agrupaciones de n = 3 para el grupo H y de n = 6 - 7 muestras para los grupos A y AO, respectivamente. Se llevó a cabo la qPCR. Los resultados se expresan como la media del Fold change \pm SEM frente al medio de control (C). Se aplicó un ANOVA seguido de un Test Tukey. +: p < 0.05 vs. A; #: p < 0.05 vs. H; *: p < 0.05 vs. C.

Se estudiaron las correlaciones entre los parámetros medidos en los organoides intestinales para caracterizar más en profundidad el efecto diferencial del contenido intestinal de los niños A y AO (Tabla 6 y Tabla 7). En este análisis se encontraron múltiples correlaciones

para ambos grupos, mostrando la fuerte relación entre los parámetros estudiados. Todas las correlaciones significativas encontradas entre los parámetros en el grupo AO fueron positivas (Tabla 6), mientras que algunas correlaciones negativas se encontraron en el grupo A (Tabla 7). Así, *Tff2* y *Tff3* tuvieron una correlación negativa con *Muc13*. *Tff3* también tuvo una correlación negativa con *Cldn4*, *Cldn5* y *Cxcl10*. Finalmente, se encontró una correlación negativa en el grupo A entre *Tlr4* y *Cldn5* y entre *Tnf* y *Tlr4*. *Tnf* es una de las moléculas más relevantes involucradas en la inflamación intestinal. La Figura 20A muestra gráficos radiales para las correlaciones encontradas para *Tnf* con el fin de ilustrar las diferencias entre los grupos A y AO. Tanto *Cldn5* como *Cxcl10* se correlacionaron positiva y fuertemente con *Tnf* en ambos grupos, mientras que los parámetros de la función de barrera (*Muc2*, *Muc3* y *Tff2*) solo se correlacionaron positivamente con *Tnf* en el grupo AO. Se encontraron correlaciones con *Tlr4* (negativa) y *Nt5e* (positiva) en el grupo AO y no en el grupo A. No se encontraron correlaciones con ningún parámetro en el grupo A (Figura 20D).

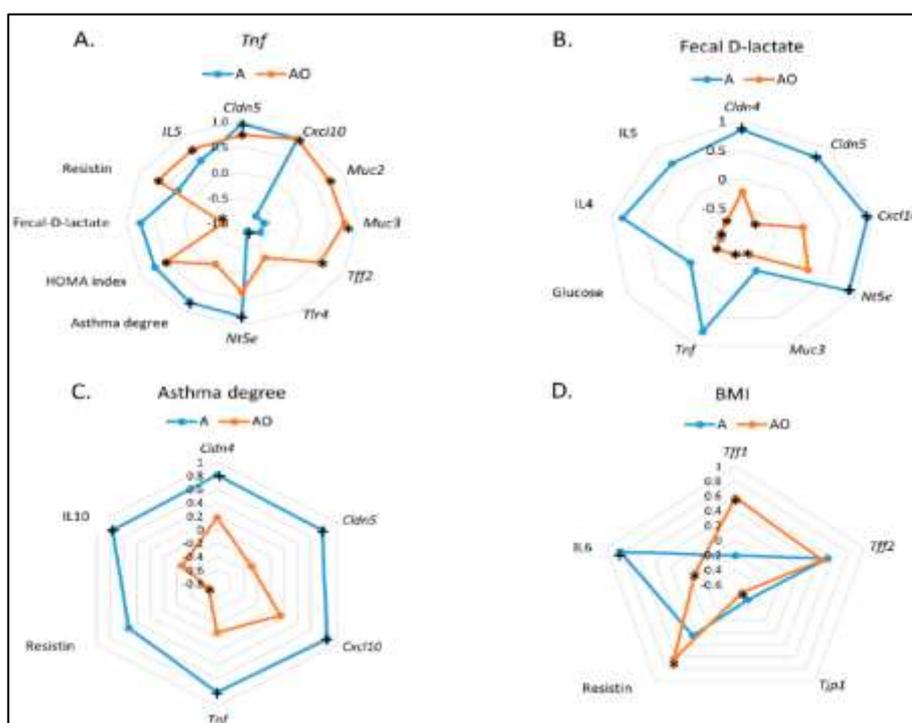


Figura 20. Gráficos radiales para correlaciones estadísticamente significativas entre *Tnf* (A), D-lactato fecal (B), Asma (C) IMC (D) y parámetros analizados en niños prepúberes asmáticos normopeso (A) y asmáticos obesos (AO). Se muestran los coeficientes de correlación de Pearson con corrección para comparaciones múltiples utilizando el método de Holm-Sidak. +: $p < 0,05$ para coeficientes de correlación en el grupo A *: $p < 0,05$ para coeficientes de correlaciones en el grupo AO.

Resultados

Tabla 6. Correlaciones entre parámetros medidos en organoides intestinales después de la adición de heces de niños asmáticos normopeso.
Se muestra un coeficiente de correlación de Pearson de mayor rigor, calculado con todos los parámetros del estudio. *: $p < 0.05$.

	<i>Cd14</i>	<i>Clán1</i>	<i>Clán4</i>	<i>Clán5</i>	<i>Cxcl10</i>	<i>Cxcl9</i>	<i>Muc2</i>	<i>Muc3</i>	<i>Muc13</i>	<i>Nos2</i>	<i>Nt5e</i>	<i>Tff1</i>	<i>Tff2</i>	<i>Tff3</i>	<i>Tjp1</i>	<i>Tnf</i>	<i>Tlr4</i>
<i>Cd14</i>		0.573	0.758 *	0.495	0.560	0.422	0.096	-0.132	0.867 *	-0.335	0.650	0.101	-0.556	-0.706	0.372	0.330	-0.474
<i>Clán1</i>	0.573		0.922 *	0.466	0.738	0.609	0.234	0.408	0.213	-0.590	0.446	0.511	0.084	-0.621	0.527	0.525	-0.140
<i>Clán4</i>	0.758 *	0.922 *		0.707	0.880 *	0.876 *	-0.139	0.004	0.511	-0.634	0.854 *	0.311	-0.153	-0.763 *	0.202	0.658	-0.412
<i>Clán5</i>	0.495	0.466	0.707		0.942 *	-0.434	-0.660	-0.546	0.532	-0.386	0.879 *	0.381	-0.707	-0.818 *	-0.395	0.949 *	-0.817 *
<i>Cxcl10</i>	0.560	0.738	0.880 *	0.942 *		-0.464	-0.542	-0.416	0.511	-0.509	0.943 *	0.460	-0.449	-0.879 *	-0.255	0.914 *	-0.690
<i>Cxcl9</i>	0.422	0.609	0.876 *	-0.434	-0.464		0.894 *	0.778 *	-0.144	-0.621	-0.542	0.197	0.204	0.390	0.932 *	-0.468	0.050
<i>Muc2</i>	0.096	0.234	-0.139	-0.660	-0.542	0.894 *		0.838 *	-0.283	-0.098	-0.550	0.063	0.422	0.288	0.938 *	-0.722	0.288
<i>Muc3</i>	-0.132	0.408	0.004	-0.546	-0.416	0.778 *	0.838 *		-0.540	-0.190	-0.534	0.264	0.792 *	0.545	0.802 *	-0.618	0.646
<i>Muc13</i>	0.867 *	0.213	0.511	0.532	0.511	-0.144	-0.283	-0.540		-0.050	0.695 *	-0.127	-0.711 *	-0.747 *	-0.055	0.425	-0.503
<i>Nos2</i>	-0.335	-0.590	-0.634	-0.386	-0.509	-0.621	-0.098	-0.190	-0.050		-0.431	-0.295	0.125	0.092	-0.318	-0.541	0.536
<i>Nt5e</i>	0.650	0.446	0.854 *	0.879 *	0.943 *	-0.542	-0.550	-0.534	0.695 *	-0.431		0.023	-0.510	-0.808 *	-0.277	0.838 *	-0.592
<i>Tff1</i>	0.101	0.511	0.311	0.381	0.460	0.197	0.063	0.264	-0.127	-0.295	0.023		-0.167	0.170	0.208	0.514	-0.113
<i>Tff2</i>	-0.556	0.084	-0.153	-0.707	-0.449	0.204	0.422	0.792 *	-0.711 *	0.125	-0.510	-0.167		0.562	0.276	-0.636	0.842 *
<i>Tff3</i>	-0.706	-0.621	-0.763 *	-0.818 *	-0.879 *	0.390	0.288	0.545	-0.747 *	0.092	-0.808 *	0.170	0.562		0.071	-0.708	0.627
<i>Tjp1</i>	0.372	0.527	0.202	-0.395	-0.255	0.932 *	0.938 *	0.802 *	-0.055	-0.318	-0.277	0.208	0.276	0.071		-0.494	0.155
<i>Tnf</i>	0.330	0.525	0.658	0.949 *	0.914 *	-0.468	-0.722	-0.618	0.425	-0.541	0.838 *	0.514	-0.636	-0.708	-0.494		-0.821 *
<i>Tlr4</i>	-0.474	-0.140	-0.412	-0.817 *	-0.690	0.050	0.288	0.646	-0.503	0.536	-0.592	-0.113	0.842 *	0.627	0.155	-0.821 *	

Tabla 7. Correlaciones entre parámetros medidos en organoides intestinales después de la adición de heces de niños asmáticos obesos. Se muestra un coeficiente de correlación de Pearson de mayor rigor, calculado con todos los parámetros del estudio. *: $p < 0.05$.

	<i>Cd14</i>	<i>Cldn1</i>	<i>Cldn4</i>	<i>Cldn5</i>	<i>Cxcl10</i>	<i>Cxcl9</i>	<i>Muc2</i>	<i>Muc3</i>	<i>Muc13</i>	<i>Nos2</i>	<i>Nt5e</i>	<i>Tff1</i>	<i>Tff2</i>	<i>Tff3</i>	<i>Tjp1</i>	<i>Tnf</i>	<i>Tlr4</i>
<i>Cd14</i>		0.284	0.260	0.446	0.177	0.197	0.615 *	0.672 *	0.509 *	0.085	0.177	-0.212	-0.191	-0.151	0.312	0.474	0.001
<i>Cldn1</i>	0.284		0.661 *	0.658 *	0.638 *	0.845 *	0.007	0.452	0.243	0.248	0.810 *	-0.054	-0.197	0.071	0.603 *	0.432	0.540
<i>Cldn4</i>	0.260	0.661 *		0.359	0.733 *	0.587 *	0.120	0.539 *	0.486 *	0.020	0.492 *	0.443	0.374	0.498 *	0.504 *	0.383	0.053
<i>Cldn5</i>	0.446	0.658 *	0.359		0.789 *	0.453	0.191	0.743 *	0.156	0.576	0.370	0.108	-0.219	0.045	0.028	0.737 *	0.192
<i>Cxcl10</i>	0.177	0.638 *	0.733 *	0.789 *		0.549 *	0.321	0.703 *	0.500 *	0.330	0.436	0.475	0.475 *	0.678 *	0.184	0.902 *	-0.075
<i>Cxcl9</i>	0.197	0.845 *	0.587 *	0.453	0.549 *		-0.065	0.391	0.395	0.091	0.770 *	-0.113	0.220	0.306	0.570	0.351	0.357
<i>Muc2</i>	0.615 *	0.007	0.120	0.191	0.321	-0.065		0.522 *	0.340	-0.035	0.059	-0.097	-0.003	0.074	0.104	0.718 *	-0.186
<i>Muc3</i>	0.672 *	0.452	0.539 *	0.743 *	0.703 *	0.391	0.522 *		0.661 *	0.432	0.398	0.395	0.365	0.401	0.097	0.770 *	0.024
<i>Muc13</i>	0.509 *	0.243	0.486 *	0.156	0.500 *	0.395	0.340	0.661 *		0.263	0.573 *	0.222	0.093	0.616 *	0.636 *	0.329	0.360
<i>Nos2</i>	0.085	0.248	0.020	0.576 *	0.330	0.091	-0.035	0.432	0.263		0.022	0.206	-0.030	0.370	-0.005	0.149	0.576 *
<i>Nt5e</i>	0.177	0.810 *	0.492 *	0.370	0.436	0.770 *	0.059	0.398	0.573 *	0.022		0.102	0.086	0.398	0.731 *	0.357	0.413
<i>Tff1</i>	-0.212	-0.054	0.443	0.108	0.475	-0.113	-0.097	0.395	0.222	0.206	0.102		0.675 *	0.694 *	-0.060	0.386	-0.012
<i>Tff2</i>	-0.191	-0.197	0.374	-0.219	0.475 *	0.220	-0.003	0.365	0.093	-0.030	0.086	0.675 *		0.450	-0.146	0.549 *	-0.064
<i>Tff3</i>	-0.151	0.071	0.498 *	0.045	0.678 *	0.306	0.074	0.401	0.616 *	0.370	0.398	0.694 *	0.450		0.242	0.357	0.277
<i>Tjp1</i>	0.312	0.603 *	0.504 *	0.028	0.184	0.570 *	0.104	0.097	0.636 *	-0.005	0.731 *	-0.060	-0.146	0.242		-0.043	0.578 *
<i>Tnf</i>	0.474	0.432	0.383	0.737 *	0.902 *	0.351	0.718 *	0.770 *	0.329	0.149	0.357	0.386	0.549 *	0.357	-0.043		-0.213
<i>Tlr4</i>	0.001	0.540	0.053	0.192	-0.075	0.357	-0.186	0.024	0.360	0.576	0.413	-0.012	-0.064	0.277	0.578 *	-0.213	

El D-lactato fecal se origina a partir de bacterias intestinales en el intestino. Aunque los niveles medidos en ambos grupos fueron muy similares, las correlaciones encontradas con los parámetros determinados en organoides fueron muy diferentes. Se encontró una correlación positiva altamente significativa para *Cldn4* y *Cldn5*, y *Cxcl10* y *Nt5e* en el grupo A, mientras que se encontraron correlaciones negativas para *Cldn5*, *Muc3* y *Tnf* en el grupo AO (Figura 20B).

Para estudiar más en profundidad la relación entre el asma alérgica asociada con la obesidad y los parámetros de la función de la barrera intestinal y la inflamación, utilizamos un análisis de correlación. Las correlaciones de *Tnf* con los parámetros sistémicos indicaron diferencias entre ambos grupos. Así, mientras que en el grupo A, *Tnf* se correlacionó positivamente con el grado de asma, en el grupo AO se correlacionó positivamente con el índice HOMA y los valores de resistina, lo que indica que, en el caso del AO, los cambios en las heces inducidos por la obesidad son más importantes que los promovidos por las alergias (Figura 20A). Esta hipótesis se vio reforzada por el hecho de que el grado de asma y el IMC se correlacionaron con distintos parámetros en los grupos A y AO, respectivamente (Figura 20C, D). Por lo tanto, se encontró una correlación positiva del asma con la IL-10 sistémica y la expresión organoide de *Tnf*, *Cxcl10*, *Cldn5* y *Cldn4* en el grupo A. (Figura 20C). Por el contrario, no se observaron correlaciones significativas entre el grado de asma y ninguno de estos parámetros en el grupo AO. A su vez, el IMC se correlacionó positivamente con *Tff1* y *Tff2* y negativamente con *Tjp1* en el grupo AO, mientras que no se encontraron correlaciones con ningún parámetro en el grupo A (Figura 20D). Estos resultados indican que independientemente del peso, el grado de asma es un factor importante en la regulación de la expresión génica del epitelio intestinal por heces. Esta hipótesis se exploró más en profundidad en el segundo estudio de esta Tesis Doctoral cuyos resultados se recogen en el apartado 3 en la sección de materiales y métodos.

4.1.2 RAGE, IP3K y NFκB median la inducción de la expresión de genes relacionados con la función de barrera intestinal por aguas fecales de niños alérgicos obesos

A continuación, se evaluó la participación de tres elementos principales de la transducción de señales (NFκB, IP3K y RAGE) en el efecto de las aguas fecales de niños AO sobre la expresión de genes intestinales. Nuestros resultados indican que estas vías son importantes en los efectos observados, siendo RAGE aparentemente un mediador común en la respuesta de los genes evaluados (Figura 21). De hecho, la adición del inhibidor de RAGE N-bencil-4-cloro-N-ciclohexilbenzamida (FPS-ZM1) a los medios de cultivo de organoides, antes de los homogenados fecales de AO anuló su efecto sobre la expresión de todos los genes estudiados (*Tnf*, *Cxcl10*, *Cldn5*, *Tff2*, *Tff1* y *Reg3g*). El inhibidor de NFκB, BAY11-7082 también anuló fuertemente la respuesta provocada por los homogenados fecales de AO en todos estos genes, excepto *Tff2*. Finalmente, la inhibición de la quinasa IP3K (wortmanina), anuló las respuestas de *Tnf*, *Cxcl10* y *Cldn5*.

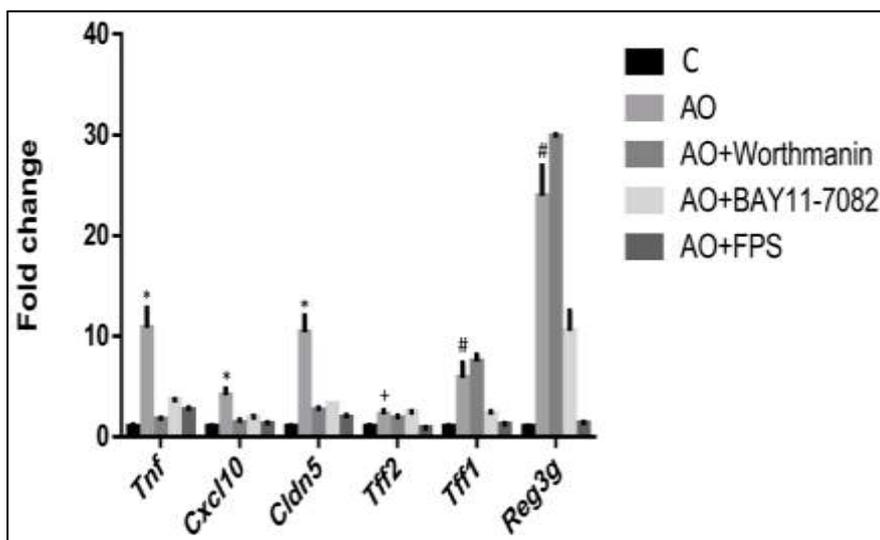


Figura 21. Efecto de los inhibidores de la transducción de señales. Homogenizados fecales de niños asmáticos obesos (AO) se añadieron al medio de cultivo de organoides de yeyuno de ratón junto con inhibidores de las vías de transducción de señales de AKT (wortmanina), NFκB (BAY11-7082) y RAGE (FPS-ZM1). Se realizó qPCR. Los resultados se expresan como la media del Fold change \pm SEM frente al medio de control (C). Se aplicó un ANOVA de una vía seguido de pruebas de comparaciones múltiples de Dunnett para estudiar las diferencias con el grupo AO. *: $p < 0.05$ vs. todos; #: $p < 0.05$ vs. todos excepto AO + wortmanina; +: $p < 0.05$ vs. C y AO + FPS.

4.1.3 Las aguas fecales de niños alérgicos obesos inducen la expresión de genes de la cadena respiratoria mitocondrial

La obesidad y su proceso inflamatorio asociado pueden dar lugar a una mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y causar estrés oxidativo. Además, el exceso de nutrientes puede, causar disfunción mitocondrial que, a su vez, aumenta la producción de (ROS) agravando el proceso inflamatorio. Dado que se observó un efecto proinflamatorio de las aguas fecales de niños asmáticos obesos (AO), nuestro objetivo fue estudiar su efecto sobre la expresión de genes de la cadena respiratoria mitocondrial (Figura 22). Se evaluó la expresión de genes de la cadena respiratoria de los complejos I (*mt-Nd1* y 6), III (*mt-Cyb*) y IV (*mt-Co1* y 2). Además, se estudió el gen *mt-Atp6* y los genes mitocondriales de RNA ribosómico 12S y 16S (*mt-Rnr1* y *mt-Rnr2*). Las aguas fecales de AO indujeron la expresión de genes de los complejos I y III y de *mt-Co2*. Sin embargo, *mt-Atp6* no mostró una inducción significativa con un valor p de ANOVA de 0.07. Del mismo modo, tampoco se observaron diferencias significativas para los genes mitocondriales de RNA ribosómico. No se observaron efectos de las aguas fecales de los niños asmáticos normopeso (A) ni de los controles (H), a excepción de la inhibición de la expresión de *mt-Rnr* en el grupo H.

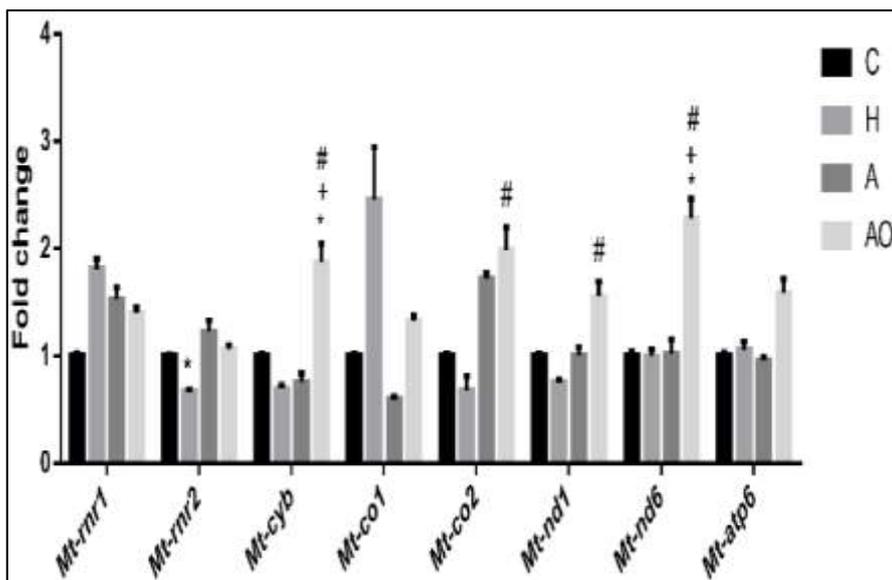


Figura 22. Efecto de homogenados fecales de niños en la expresión de genes relacionados con las mitocondrias. Homogenados fecales de niños sanos (H), asmáticos normopeso (A) y asmáticos obesos (AO) se añadieron al medio de cultivo de organoides de yeyuno de ratón. Se ensayaron tres grupos de $n = 3$ y $n = 6-7$ muestras para los grupos A y AO, respectivamente. Se realizó qPCR. Los resultados se expresan como la media del Fold change \pm SEM frente al medio de control (C). Se aplicó un ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey. +: $p < 0,05$ vs. A; #: $p < 0,05$ vs. H; *: $p < 0,05$ vs. C.

4.2 Evaluación del efecto de aguas fecales de niños con asma alérgico grave sobre la expresión de génica en organoides de yeyuno de ratón.

4.2.1 Caracterización de la cohorte. Datos macroscópicos y bioquímicos

Con el fin de caracterizar más en profundidad el efecto diferencial del asma en la expresión génica de organoides de yeyuno, seleccionamos los 10 niños con índice GEMA=2 del estudio, independientemente de su peso, y llevamos a cabo un reanálisis de los datos obtenidos mediante qPCR. La Tabla 8 muestra los principales datos macroscópicos y bioquímicos de los niños asmáticos con índice GEMA=2.

Tabla 8. Principales datos macroscópicos y microscópicos de todos los niños con asma (GEMA=2) incluidos en nuestro estudio, independientemente de su peso. Datos expresados como Media±SEM.

Parámetro	Valor
Edad	8.947 ± 0.480
Peso (kilogramos)	41.611±2.092
Altura (m)	1.367 ± 0.026
IMC	22.288 ± 0.727
Puntuación BMIZ	1.873 ± 0.289
Glucosa (mmol/L)	4.830 ± 0.129
Insulina (μUL/mL)	13.234 ± 4.702
índice HOMA	3.078 ± 1.412
Leptina (μg/L)	10.383 ± 1.881
TNF (pg/mL)	3.679 ± 0.366

Por otra parte, se seleccionaron muestras de 4 niños de los niños que presentaban asma severo, 2 niños normopeso y 2 con obesidad, y se llevaron a cabo experimentos de RNA-seq para estudiar su efecto sobre la expresión génica de organoides de yeyuno. Los datos básicos de estos niños se muestran en la Tabla 9. Como puede observarse, en comparación con los valores de la Tabla 5 los datos de los niños seleccionados mostraron valores intermedios de peso, IMC y glucosa. Los datos de estos niños, que padecían asma grave, fueron comparados con los de los niños prepúberes sanos.

Tabla 9. Principales datos macroscópicos y microscópicos de los niños con asma grave (GEMA=2) cuyas heces fueron utilizadas para el análisis mediante RNA-seq. Datos expresados como media±SEM.

Parámetro	Valor
Edad	9,444 ± 0,884
Peso (kilogramos)	37,750±4,190
Altura (m)	1,380 ± 0,090
IMC	20,7545 ± 1,61
Puntuación BMIZ	1,51 ± 0,83
Glucosa (mmol/L)	5,042 ± 0,06
Insulina (μUL/mL)	10,39 ± 0,62
índice HOMA	2,08 ± 0,27
Leptina (μg/L)	7,75 ± 0,71
TNF (pg/mL)	4,14 ± 1,47

4.2.2 Las aguas fecales de niños con asma grave inducen la expresión de genes proinflamatorios.

Como se ha indicado en el apartado anterior, tras la exposición durante 24 h de los organoides a los homogenados de heces, las muestras fueron recogidas y se extrajo el RNA. Las 4 muestras seleccionadas de niños alérgicos asmáticos y las de niños sanos se analizaron además mediante RNA-seq. En este análisis se detectó la expresión de 13.844 genes en las todas muestras analizadas. El primer criterio que utilizamos en el análisis comparativo de la variación de los genes entre los grupos fue el del log₂FC, seleccionándose los genes que presentaron un log₂FC ≤ -1 o ≥ 1. Las heces de niños asmáticos en relación con las de los controles indujeron la expresión de 633 genes e inhibieron la de 763.

A continuación, se introdujeron en los datos globales los criterios de significancia en función de P_{adj} tomándose como significativos aquellos valores de p≤0,05. Se observó que sólo 19 genes cumplían los dos criterios en el caso de genes sobreexpresados y 6 en el caso de los inhibidos. Diez genes cuyas diferencias no cumplieron el criterio de fold change (log₂FC ≤ -1 o ≥ 1), mostraron diferencias significativas (P_{adj} ≤0,05).

Ya que uno de los objetivos de este estudio era el desarrollar hipótesis consideramos todos los genes seleccionados, que cumplían el primer y/o el segundo criterio: 770 genes

inhibidos por las heces de niños asmáticos comparados con la de niños sanos y 643 genes inducidos. Utilizamos el test de sobrerrepresentación de Panther-GO Slim con el fin de detectar los procesos biológicos alterados por las aguas fecales de niños alérgicos. Cuando se introdujeron los datos de genes sobreexpresados y reprimidos, el análisis indicó como procesos más alterados la división celular y la expresión génica (desde la transcripción a la traducción) (Anexo 1. Tabla1). Cuando se analizaron sólo los datos de genes sobreexpresados destacaron los procesos implicados en la inmunidad (Anexo 2. Tabla 2). En la Figura 23 se recogen los principales genes relacionados con la inmunidad que resultaron alterados. Se puede observar el claro predominio de genes sobreexpresados. Entre estos genes se encuentran, genes típicos de la inflamación como *Tnf* e *Tlr4* y *Cd14*, que están relacionados con regulación de la inmunidad por productos de la microbiota. Los ligandos de quimiocinas con motivo C-X-C (CXCLs) son moléculas que juegan un papel importante en la inflamación regulando el reclutamiento de leucocitos, incluyendo neutrófilos, macrófagos y monocitos. *Cxcl9* a *11* y *Cxcl16* se encontraron incrementados (Figura 23A). Por otra parte, la expresión de genes relacionados con la respuesta antioxidante, como los genes que codifican glutatión transferasas (*Gsta*) y *Nos2*, o la de genes relacionados con el complemento (*C3* y *C4b*), el purinoma (*Ada* y *P2rx2*) y la síntesis de prostaglandinas (*Ptgs1*), también se indujo por las heces de niños con asma grave. La Figura 23B muestra una relación de genes relacionados con el interferón, que se encontró también incrementada, de manera muy consistente. Estos datos indicarían que las heces de niños asmáticos inducen la respuesta inmunológica en el epitelio intestinal.

A	GENE	Log2 (FC)	B	GENE	Log2 (FC)
	<i>Ada</i>	-2,2		<i>Ddx60</i>	-1,1
	<i>C3</i>	-1,8		<i>Ifit1</i>	-1,0
	<i>C4b</i>	-1,4		<i>Ifit1bl1</i>	-2,8
	<i>Ccl20</i>	-1,0		<i>Ifit1bl2</i>	-1,0
	<i>Ccl24</i>	-2,5		<i>Ifit2</i>	-2,0
	<i>Cd14</i>	-1,6		<i>Ifit3</i>	-1,7
	<i>Csf1</i>	-3,0		<i>Ifit3b</i>	-1,3
	<i>Cxcl10</i>	-1,9		<i>Ifitm3</i>	1,2
	<i>Cxcl11</i>	-1,8		<i>Ift22</i>	-1,0
	<i>Cxcl16</i>	-2,0		<i>Irf1</i>	-1,1
	<i>Cxcl9</i>	-3,1		<i>Irf5</i>	-1,4
	<i>Gsta1</i>	-1,6		<i>Irf7</i>	-1,4
	<i>Gsta2</i>	-1,5		<i>Mx2</i>	-1,0
	<i>Gsta4</i>	-1,0		<i>Oas1g</i>	-1,0
	<i>Gsta5</i>	-1,8		<i>Oas2</i>	-1,5
	<i>Il1rn</i>	-2,5		<i>Oas3</i>	-1,3
	<i>Il3ra</i>	-1,1			
	<i>Il7</i>	-1,8			
	<i>Nos2</i>	-3,1			
	<i>Pgf</i>	-1,5			
	<i>P2rx2</i>	-1,9			
	<i>Ptgs1</i>	-1,4			
	<i>Reg3b</i>	-3,3			
	<i>Reg3g</i>	-2,5			
	<i>S100a14</i>	-2,0			
	<i>Tlr4</i>	-2,4			
	<i>Tnf</i>	-2,5			

Figura 23. Principales genes relacionados con la inmunidad regulados en organoides de yeyuno de ratón, tras la adición de homogenados de heces de niños asmáticos con asma grave (GEMA=2), en comparación con la adición de homogenados de heces de niños sanos. Se muestran los datos de RNA-seq en forma de Log2FC las medias del grupo H vs el grupo A. (A) Genes relacionados con la respuesta de leucocitos. (B) Genes relacionados con la respuesta mediada por interferón. H: niños sanos. A: niños asmáticos.

Con el fin de confirmar estos resultados reanalizamos los datos obtenidos mediante qPCR de los genes relacionados con la inmunidad en las 4 muestras utilizadas en el RNA-seq por una parte, y de todas las muestras del estudio pertenecientes a niños con asma grave (GEMA=2). Nuestros resultados indicaron que efectivamente las heces de niños asmáticos inducían la expresión de genes relacionados con la inflamación, cuando se compararon con las heces de niños sanos. Así, en las 4 muestras utilizadas para el RNA-seq *Nos2*, *Cxcl9*, *Cd14* y *Nt5e* se encontraron incrementados, mientras que en el conjunto de niños con asma grave todos los genes medidos se encontraron incrementados (Figura 24).

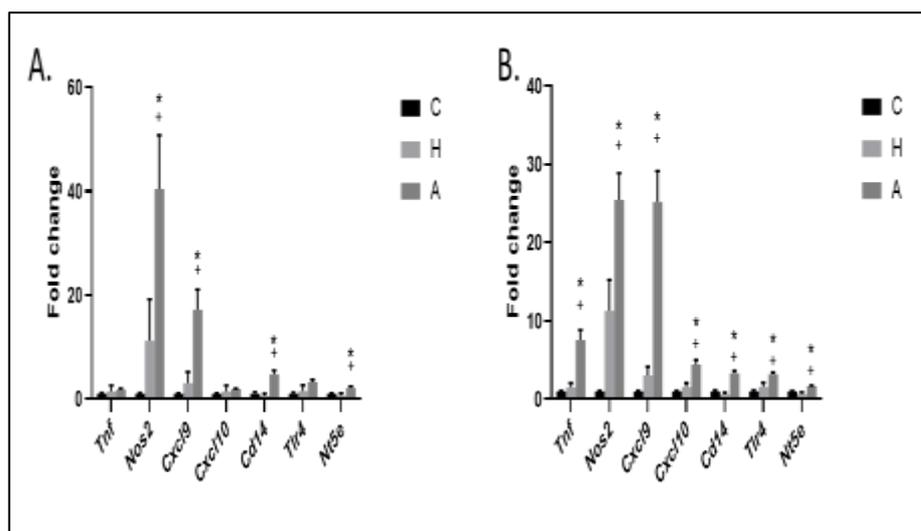


Figura 24. Genes relacionados con la inmunidad regulados en organoides de yeyuno de ratón tras la adición de homogenados de heces de niños asmáticos con asma grave (GEMA=2) en comparación con la adición de homogenados de heces de niños sanos. Se muestran los datos de qPCR de las medias de las muestras utilizadas en el RNA-seq (A) y de todas las muestras del estudio (B). Se muestran los resultados como media±SEM del fold change respecto al grupo control (C, medio sin heces). H: niños sanos. A: niños asmáticos. *: $p < vs C$; +: $p < vs H$.

4.2.3 Las aguas fecales de niños con asma grave regulan genes relacionados con la función de barrera en organodes, inhibiendo los relacionados con la proliferación celular

El mantenimiento de la función de barrera del epitelio intestinal depende de la producción de mucinas y péptidos antibacterianos y del correcto funcionamiento de la permeabilidad. En nuestro estudio observamos que las aguas fecales de niños asmáticos inhibieron *Muc13* y *Muc3a*, que forman parte del moco, y de distintas alfa defensinas (genes *Defa*)(Figura 25). Estas últimas son péptidos antimicrobianos de las criptas que detectan bacterias, hongos y virus. Por el contrario, se observó la sobreexpresión de *Reg3b* y *Reg3g*, que también son péptidos antimicrobianos²⁶⁷ y de claudinas (genes *Cldn*), que forman parte de las uniones estrechas (Figura 25). En el análisis mediante qPCR se confirmaron parcialmente estos resultados. De hecho, se encontraron incrementos en *Reg3g* y *Cldn4* en las muestras de los niños seleccionados para el RNA-seq y cuando se analizaron en conjunto las muestras de todos los niños con asma grave del estudio (Figura 26).

GENE	Log2 (FC)
<i>Cldn1</i>	-1,3
<i>Cldn23</i>	-1,6
<i>Cldn3</i>	-1,0
<i>Cldn4</i>	-1,7
<i>Defa2</i>	1,5
<i>Defa21</i>	2,8
<i>Defa23</i>	1,9
<i>Defa30</i>	1,0
<i>Defa36</i>	2,4
<i>Defa38</i>	1,4
<i>Defa42</i>	1,5
<i>Muc 13</i>	1,6
<i>Muc3a</i>	2,7
<i>Reg3b</i>	-3,3
<i>Reg3g</i>	-2,5
<i>Vil1</i>	-0,8

Figura 25. Genes relacionados con la función de barrera intestinal regulados en organoides de yeyuno de ratón, tras la adición de homogenados de heces de niños asmáticos con asma grave (GEMA=2), en comparación con la adición de homogenados de heces de niños sanos. Se muestran los datos de RNA-seq en forma de Log2FC las medias del grupo H vs el grupo A. H: niños sanos. A: niños asmáticos.

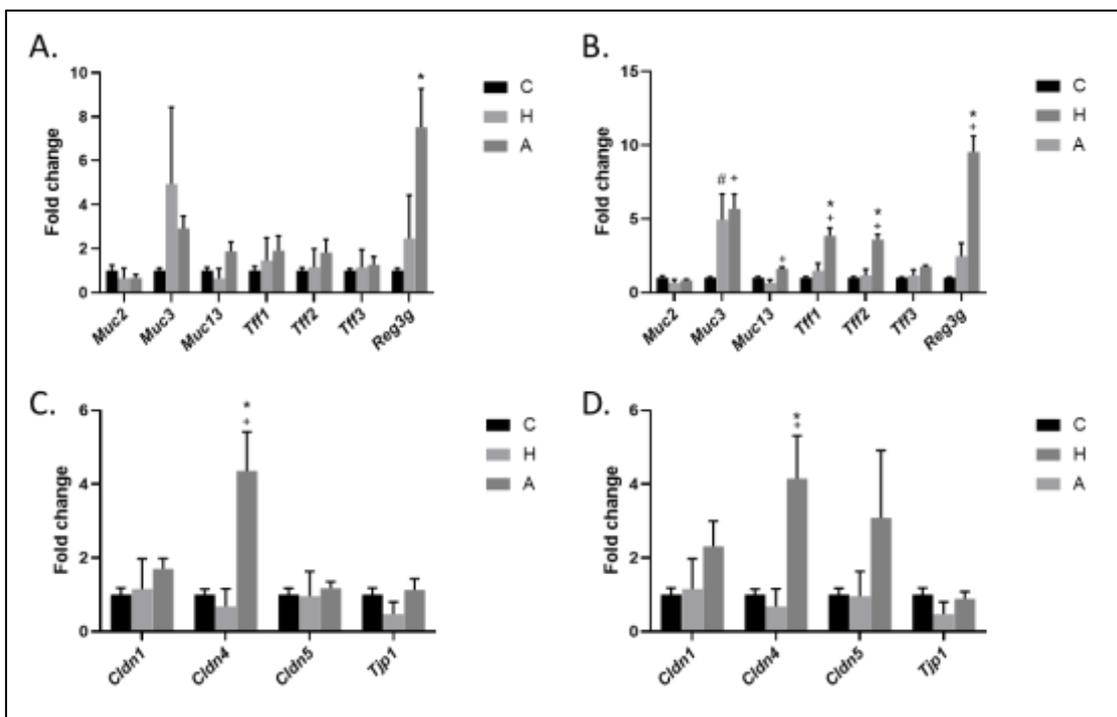


Figura 26. Genes relacionados con función de barrera intestinal determinados en organoides de yeyuno de ratón, tras la adición de homogenados de heces de niños asmáticos con asma grave (GEMA=2), en comparación con la adición de homogenados de heces de niños sanos.

Se muestran los datos de qPCR de las medias de las muestras utilizadas en el RNA-seq (A y C) y de todas las muestras del estudio (B y D). Se muestran los resultados como media±SEM del fold change respecto al grupo control (C, medio sin heces). H: niños sanos. A: niños asmáticos.

La homeostasia del intestino depende de la proliferación y la diferenciación epiteliales. Las figuras 25 y 27 muestran un conjunto de genes relacionados con la proliferación y la diferenciación alterados por las aguas fecales de niños alérgicos. Como puede observarse, la mayoría de los genes relacionados con la proliferación y el ciclo celular se encontraron inhibidos en los organoides tratados con aguas fecales de niños asmáticos. En concreto se observa la inhibición de marcadores de reparación epitelial, como *Egf* y *Ascl2*, y de células madre como *Lgr5*. *Ascl2* es un gen cuyo producto regula la dediferenciación de células del epitelio intestinal en caso de lesiones. En concordancia con la inhibición de marcadores de proliferación y reparación epitelial, el análisis de genes inhibidos indicó como principales funciones alteradas por las aguas fecales de niños alérgicos aquellas relacionadas con la división celular (Anexo 3. Tabla 3). Los genes concretos alterados en la función de ciclo celular se recogen en la Figura 27. Como puede observarse, la mayoría de ellos se inhibió por la adición de aguas fecales de niños con asma grave a los organoides de yeyuno de ratón.

GENE	Log2 (FC)	GENE	Log2 (FC)
Ankle1	1,7	Kif18a	1,1
Anln	1,1	Kif18b	1,3
Ascl2	2,2	Kif4	1,1
Areg	-1,3	Kn11	1,4
Aunip	1,2	Knstrn	1,1
Aurka	1,0	Kntc1	1,5
Aurkb	1,3	Mast1	1,4
Bub1	1,3	Mcm2	1,2
Bub1b	1,3	Mcm3	1,2
Ccna1	1,2	Mcm4	1,1
Ccna2	1,2	Mcm6	1,0
Ccnb1	1,0	Mis18a	1,0
Ccnd1	1,5	Ncapd2	1,3
Ccne1	1,1	Ncapg	1,3
Ccne2	1,2	Ncaph	1,4
Ccnf	1,3	Nde1	1,0
Cdc25c	1,1	Nek2	1,0
Cdc45	1,2	Nuf2	1,3
Cdc6	1,2	Nusap1	1,1
Cdk1	1,0	Oip5	1,1
Cdk2	1,0	Orc1	1,6
Cenpi	1,1	Pard6b	-1,2
Cenps	1,1	Pgf	-1,5
Cep152	1,0	Pola1	1,3
Cep192	1,0	Prc1	1,2
Chek2	1,1	Psmc3ip	1,4
Daam2	1,6	Psrc1	1,4
Ddx11	1,1	Racgap1	1,1
Dscc1	1,5	Rad51c	1,2
E2f1	1,3	Shcbp1	1,2
Egf	1,3	Ska1	1,1
Eme1	1,2	Ska2	1,0
Esco2	1,3	Ska3	1,1
Espl1	1,6	Spc25	1,0
Fancd2	1,7	Stil	1,1
Fgf2	1,6	Ticrr	1,3
Fgfr3	1,4	Top2a	1,4
Fgfr4	1,4	Topbp1	1,2
Gins1	1,2	Trip13	1,1
Gins3	1,1	Ttk	1,3
Haus5	1,0	Wdr62	1,1
Lck	1,3	Zwilch	1,2
Lgr5	2,2	Bcl2	1,1
Igf1r	1,1	Cdk1	1,0
Iqgap3	1,0	Cdk2	1,0

Figura 27. Genes relacionados con la proliferación y el ciclo celular regulados en organoides de yeyuno de ratón, tras la adición de homogenados de heces de niños asmáticos con asma grave (GEMA=2), en comparación con la adición de homogenados de heces de niños sano. Se muestran los datos de RNA-seq en forma de Log2FC las medias del grupo H vs el grupo A. H: niños sanos. A: niños asmáticos.

El metabolismo glucídico y lipídico son necesarios para la homeostasia del intestino y el mantenimiento de la función de barrera. Tanto la glucólisis como el metabolismo lipídico se detectaron como procesos alterados. Cuando se analizaron por separado los genes inhibidos e inducidos por las heces de niños alérgicos, utilizando el test de sobrerepresentación de Panther-Go Slim y la herramienta de reactoma (Anexo 4. Tabla 4 y Anexo 5. Tabla 5). Entre los genes inhibidos relacionados con el metabolismo glucídico encontramos varios genes implicados en la glucólisis: *Aldoa* (aldolasa A), *Hk2* (hexokinasa 2), *Adpgk* (glucokinasa dependiente de ADP), *Eno3* (enolase 3) o *Pgam2* (fosfoglicerato mutasa 2). Mientras que el gen *Pck1*, que codifica la fosfoenol piruvato carboxikinasa (PEPCK), principal enzima reguladora de la gluconeogénesis, se encontró inducida en niños con asma grave (Figura 28). Cabe destacar, que el gen *Gk* que codifica la glicerol kinasa, implicada en la absorción y metabolismo del glicerol y el gen *Fas*, que codifica la ácido graso sintasa, se encontraron inducidos. En conjunto los datos indican modificaciones que llevarían a un incremento tanto de la glucosa como de ácidos grasos.

GENE	Log2 (FC)
<i>Adpgk</i>	1,0
<i>Aldoa</i>	1,3
<i>Eno3</i>	1,2
<i>Fas</i>	-1,2
<i>Gk</i>	-1,2
<i>Hk2</i>	1,5
<i>Pck1</i>	-1,0
<i>Pgam2</i>	1,1

Figura 28. Genes relacionados con el metabolismo glucídico y lipídico regulados en organoides de yeyuno de ratón, tras la adición de homogenados de heces de niños asmáticos con asma grave (GEMA=2), en comparación con la adición de homogenados de heces de niños sanos. Se muestran los datos de RNA-seq en forma de Log2FC las medias del grupo H vs el grupo A. H: niños sanos. A: niños asmáticos.

Capítulo 5

DISCUSIÓN

5 Discusión

El asma y la obesidad están relacionadas con una microbiota y barrera intestinal alteradas. Por lo tanto, la combinación de obesidad y asma se ha asociado con síntomas más graves, una frecuencia más alta de episodios de exacerbación y una respuesta más baja a la terapia ²⁶⁸. Aunque la implicación de la microbiota intestinal en ambas patologías es bien conocida, la relación fisiopatológica entre el contenido fecal y la función intestinal no se comprende completamente. En este estudio, hemos determinado cómo el contenido intestinal de niños preadolescentes obesos y normopeso con asma puede alterar la función intestinal. Para ello, hemos utilizado un modelo con organoides yeyunales de ratón cultivados con homogenados fecales de estos niños, con el fin de caracterizar las diferencias en la expresión de genes relevantes para la función inmunológica y de barrera intestinal. Es interesante señalar que los homogenados fecales se obtuvieron después de sonicación y filtración, por lo tanto, no había bacterias presentes, solo componentes bacterianos y/o metabolitos producidos por las mismas.

Como se describió anteriormente, la caracterización clínica de nuestra cohorte reveló que los niños asmáticos obesos presentaban no solo un IMC más alto que los niños normopeso con asma, sino también niveles elevados de leptina plasmática ¹⁷³. Esta hormona proinflamatoria, producida mayoritariamente por el tejido adiposo blanco, aumenta en individuos obesos, quienes desarrollan resistencia a la hormona y, como consecuencia, una reducción en la sensación de saciedad, lo que lleva a un mayor consumo de energía. Se ha descrito que, en individuos obesos asmáticos, los niveles elevados de leptina podrían modificar la función de las vías respiratorias y provocar una mayor inflamación ^{269,270}. Sin embargo, no se encontraron otras diferencias según la gravedad del asma en nuestra cohorte, indicando niveles generalmente similares de asma e inflamación sistémica en ambos grupos. Somos conscientes de que el tamaño de la muestra podría ser una limitación de nuestro estudio, pero esto se compensa porque las muestras son homogéneas, procedentes de un solo hospital y evaluadas clínicamente por una misma persona. Lo que ha dado como resultado un perfil diferencial de los organoides.

La inmunidad, la capa de moco y la producción de péptidos antibacterianos son elementos importantes en el mantenimiento de la función de barrera intestinal ²⁷¹. Además, el control adecuado de la permeabilidad intestinal es esencial para el funcionamiento correcto de esta barrera. Nuestros resultados indican que las heces de niños con obesidad asmática (AO), pero no las de niños asmáticos normopeso (A), inducen la expresión de genes inflamatorios y de función de barrera intestinal. Específicamente, en las aguas fecales derivadas de niños con obesidad asmática, se observó un aumento en genes relacionados con la inflamación, como *Tnf*, *Nos2*, *Cd14*, *Nt5e* o *Cnr1*. Cabe destacar que la inducción de marcadores inflamatorios estuvo acompañada de cambios en genes asociados con la función de barrera que, en general, tienden a aumentar, posiblemente para contrarrestar los efectos inflamatorios. Así, la inducción

de *Tnf*, por ejemplo, se asoció positivamente con la expresión de genes relacionados con la función de barrera intestinal (*Cldn5*, *Muc3*, *Muc13* o *Tff2*). Notablemente, se observó un efecto muy leve en la expresión génica de las aguas fecales de pacientes sanos o asmáticos no obesos. En este sentido, vale la pena señalar que nuestro modelo utilizó organoides esféricos intactos en los que el lado luminal del epitelio enfrenta la cavidad interna. Por lo tanto, en nuestro estudio, los homogenados estaban en contacto con el lado basal. Se ha demostrado el paso de moléculas de 4 kDa, e incluso 10 kDa, desde el exterior hasta el lado luminal de los organoides ²⁷². Por lo tanto, al menos las moléculas pequeñas estarían en contacto con este lado de los organoides. Además, incluso si las moléculas grandes están en contacto solo con el lado basal, consideramos válido este modelo ya que se ha demostrado que la permeabilidad intestinal está alterada tanto en la obesidad como en el asma, y por lo tanto, el contacto de moléculas más grandes con el lado basal del epitelio ocurriría en estas enfermedades. Dicho esto, es posible que esta falta de efecto de las aguas fecales de niños asmáticos normopeso y no asmáticos se deba al hecho de que las moléculas grandes no tienen acceso al lado luminal.

En cualquier caso, nuestros resultados delinean un efecto diferencial posiblemente relacionado con la microbiota o los metabolitos fecales de estos pacientes. No obstante, se encontraron diferencias mínimas en la composición de la microbiota en nuestra cohorte, lo que apunta al probable papel crucial del perfil de metabolitos, que actualmente se está caracterizando. En consecuencia, en futuras investigaciones planeamos delinear el efecto de homogenados bacterianos utilizando organoides abiertos (monocapas). Sin embargo, aunque es posible obtener organoides abiertos, en nuestra experiencia es un procedimiento bastante ineficiente que hasta ahora dificulta su uso en estudios con muchas muestras.

El D-lactato es producido por bacterias intestinales y se ha propuesto como un marcador de desequilibrio en la microbiota. Aunque no se encontraron diferencias en los niveles de este metabolito en las heces, nuestros datos indican que, en pacientes con asma, están correlacionados directamente con la expresión de marcadores inflamatorios (*Cxcl10*, *Nt5e*, *Cldn4* y *Cldn5*). En contraste, se observó una correlación negativa entre el D-lactato y los genes *Muc3*, *Tnf* y *Cldn5* en niños asmáticos obesos. Estos datos, junto con el hecho de que la inhibición de RAGE, NFκB y AKT evitó que estos genes se sobreexpresaran en niños asmáticos obesos, sugiriendo que diferentes vías moleculares están activadas en niños asmáticos normopeso en comparación con aquellos con obesidad y asma. Parece que RAGE es un mediador común en la respuesta de los genes evaluados. Este receptor es un mediador de la inflamación intestinal. De hecho, los ratones *Rage*^{-/-} son menos susceptibles a desarrollar inflamación intestinal y colónica que los ratones WT ²⁷³. Además, este es un receptor con una amplia gama de ligandos relacionados con la inflamación, que incluyen, los productos de glicación avanzada, lipopolisacáridos bacterianos o la proteína de unión al calcio S100B (S100B) y calprotectina (S100A8/S100A9). La abolición de la respuesta inflamatoria después de la adición de un inhibidor de RAGE sería consistente con el efecto proinflamatorio de las moléculas presentes en las heces de niños obesos.

La obesidad conduce a diversos cambios en el organismo. Entre ellos, el proceso inflamatorio existente puede aumentar la producción de (ROS) y causar estrés oxidativo. El estrés oxidativo, a su vez, puede desencadenar disfunción mitocondrial. Se ha demostrado que el consumo de una dieta alta en grasas provoca un cambio metabólico hacia la β -oxidación de ácidos grasos en las células epiteliales del intestino delgado y afecta la función mitocondrial de los colonocitos, posiblemente a través de las consecuencias derivadas de una β -oxidación de ácidos grasos excesiva y/o la presencia de metabolitos perjudiciales producidos por la microbiota intestinal ²⁷³. Nuestros datos indican una inducción en la expresión de genes de la vía de fosforilación oxidativa mitocondrial en los organoides después de la adición de homogenados fecales de niños con asma y obesidad (AO), pero nuevamente, no en aquellos de niños asmáticos delgados. Estas alteraciones pueden constituir una adaptación en las mitocondrias para permitir una mayor ingesta de energía, lo que llevaría a su proliferación aumentada, pero también a una síntesis elevada de ATP y, como consecuencia, a una mayor producción de ROS ²⁷⁴.

Asimismo, nuestros datos indican que la obesidad es un factor más importante que el asma en la inducción de inflamación intestinal y de alteraciones en la función de barrera intestinal. Esta hipótesis se respalda con los datos mencionados anteriormente y por el hecho de que las correlaciones entre los parámetros evaluados en los organoides se correlacionan de manera diferencial con el grado de asma y con el IMC en el grupo de niños asmáticos normopeso y con sobrepeso. En el caso de los niños normopeso, donde no se encontraron elevados los marcadores de inflamación, se observaron correlaciones positivas entre la gravedad del asma y los parámetros de inflamación (*Tnf*, *Cxcl10*, *Cldn4* y *Cldn5*), mientras que no se encontraron correlaciones para los niños obesos. En estos últimos, a su vez, el IMC se correlacionó positivamente con *Tff1* y *Tff2* y negativamente con *Tjp1*. *Tjp1* codifica ZO-1, que es una proteína de andamiaje que une y ancla las proteínas de la unión estrecha, regulando la permeabilidad intestinal y se ha demostrado que se altera en la obesidad ²⁷⁵. Serán necesarias más investigaciones, pero estos datos sugieren que la función de barrera puede estar siendo modulada por el contenido luminal en la obesidad.

El hecho de que la inflamación se correlacionase con la gravedad del asma en niños normopeso, nos llevó a estudiar la importancia del grado de asma en la modificación de genes del epitelio intestinal por heces de niños con asma grave, independientemente del factor BMI. Con este fin reanalizamos nuestros datos agrupando los resultados de niños con asma grave (GEMA=2), tanto normopeso como obesos, y llevamos a cabo un análisis mediante RNA-seq con un subgrupo de 4 niños (2 normopeso y 2 obesos). Cuando se compararon los datos de estos niños con los de niños sanos, se observó que las heces de niños con asma grave inducía la expresión de genes proinflamatorios en comparación con la de niños sanos. Además, se observó afectación de genes relacionados con la función de barrera intestinal. Aunque no hemos determinado permeabilidad intestinal, estos datos están de acuerdo con resultados que indican que la inflamación intestinal, una permeabilidad intestinal incrementada y el asma están

relacionadas²⁷⁶. De hecho se ha demostrado que la mucosa intestinal de personas asmáticas, desde el punto de vista inmunológico, sufre alteraciones inflamatorias similares a las de la mucosa bronquial²⁷⁷. Es interesante destacar que las alteraciones inflamatorias observadas en el intestino han sido atribuidas a células propias del sistema inmunológico. Antes de este estudio, creemos que no se había estudiado específicamente la posible implicación de las células del epitelio intestinal, ni la relación del contenido intestinal en el efecto inflamatorio sobre estas células. Nuestros datos indican que el epitelio intestinal puede contribuir a la reacción inflamatoria que se produce en el intestino en el asma y que el contenido intestinal contribuye a ésta. Los homogenados de nuestro modelo experimental incluyen tanto productos derivados de la ingesta de alimentos, que no han sido absorbidos, como los presentes en bacterias y los metabolitos de las mismas. Puesto que se ha observado que la microbiota intestinal y sus metabolitos se encuentran alterados en el asma²⁷⁸, sería lógico pensar que las alteraciones observadas en nuestro estudio, son derivadas de alteraciones en la microbiota en niños alérgicos. Esta observación es consistente con el incremento observado en la expresión de *Reg3g*, un péptido antibacteriano producido por células de Paneth en respuesta a las bacterias que, aunque no influye en la composición global del microbioma, afecta a la distribución del moco y mantiene la separación espacial de las bacterias intestinales del epitelio intestinal. Estudios en modelos de ratón han sugerido que *Reg3* tiene efectos beneficiosos, entre otras enfermedades, en la colitis y el asma²⁷⁹, por lo que la inducción que se observa puede ser una respuesta compensatoria de la inflamación. Incrementos en la expresión de claudinas y disminución en alfa defensinas, y mucinas fueron también provocados por las heces con asma grave, confirmando que éstas pueden provocar alteraciones en el epitelio intestinal. Los resultados observados en mucinas y defensinas no coinciden con datos obtenidos en biopsias de íleon de pacientes alérgicos, en los que se ha descrito disminución de la expresión tanto de *MUC2* como de *DEFA1B*²⁸⁰. Las diferencias entre estos datos y los nuestros datos pueden indicar que *in vivo* otros tipos celulares y estímulos extraintestinales contribuyen en la regulación de la expresión de estos genes.

La homeostasia del intestino depende de la proliferación y la diferenciación epiteliales. La barrera intestinal, debido a su delgadez, es ideal para la absorción de nutrientes, pero a la vez carece de la fuerza para soportar la abrasión mecánica y las agresiones lumbales, por eso es necesaria su continua renovación, a pesar de que sea energéticamente costoso. Mantener en condiciones de inflamación la proliferación y diferenciación es esencial para mantener la función de barrera. Nuestros resultados de RNA-seq indicaron que las heces de niños con alergia grave inhibieron múltiples genes relacionados con la proliferación epitelial y el ciclo celular. Lo que podría contribuir a crear defectos en la función de barrera intestinal. Obviamente, estos resultados deberán ser confirmados mediante otras técnicas, que podrían indicar defectos en la proliferación.

Se ha descrito que las células madre de las criptas en el intestino delgado utilizan tanto la glucólisis como la fosforilación oxidativa, pero dependen de la primera para obtener

rápidamente la energía necesaria para la proliferación. Por su parte, las células de Paneth, que contribuyen en la creación del ambiente necesario para la proliferación en las criptas, tienen principalmente un fenotipo glucolítico. La hexokinasa 2 implicada en la glucólisis y codificada por el gen *HK2*, es un gen diana de la señalización Wnt en el epitelio intestinal. Se ha observado que la eliminación de *HK2* o la inhibición de la glucólisis producen como resultado en organoides un mayor número de células de Paneth, calciformes y enteroendocrinas y una disminución de la autorrenovación de las células madre intestinales ²⁸¹. Estas observaciones coinciden, en parte, con las nuestras que indican que las heces de niños asmáticos inhiben la expresión de genes relacionados con la glucólisis e incrementan la expresión de *Pepck* (que codifica la enzima clave de la gluconeogénesis), a la vez que inhiben genes relacionados con la proliferación celular. La correlación con el incremento de células con fenotipo secretor (Paneth, goblet o enteroendocrinas) no está clara en nuestro estudio. Por otra parte, se ha descrito que en estados inflamatorios el epitelio intestinal pasa de obtener su energía mediante fosforilación oxidativa a hacerlo mediante glucólisis. Entre otras observaciones, se ha descrito por ejemplo que la hexokinasa 2 (codificada por el gen *Hk2*) es inhibida por butirato, inhibiéndose así el cambio metabólico de oxidación fosforilativa a glucólisis, disminuyendo la inflamación intestinal ²⁸². En nuestro caso, el estado inflamatorio generado por la adición de homogenados de heces de niños asmáticos, no va acompañado de un incremento en los genes que codifican enzimas de la glucólisis, sino de una inhibición de *Hk2*. Parece, por tanto, que en nuestro modelo la expresión génica indicaría más un fenotipo glucolítico que acompañaría a una menor proliferación epitelial. Serían necesarios más estudios para entender el predominio de este fenotipo glucolítico acompañado de inflamación. En conjunto, nuestros resultados subrayan que el metabolismo epitelial en los mamíferos está controlado por señales microbianas, mucosas y dietéticas, que parecen ser específicas del contexto. Por otra parte, indican que existe una importante relación entre el contenido del lumen intestinal en el asma y la obesidad y las células del epitelio intestinal.

Es necesario indicar, que el modelo de organoides intestinales, como todo modelo, presenta limitaciones, en este caso, al trabajar con estructuras 3D cerradas con acceso limitado al lado luminal, pero ha demostrado ser adecuado para nuestro propósito, ya que hemos obtenido información valiosa.

Capítulo 6

CONCLUSIONES

6 Conclusiones

1. Aunque presenta limitaciones, el modelo de organoides de ratón ha resultado ser útil para el estudio del efecto de aguas fecales y para detectar diferencias en la expresión de genes.
2. En conjunto, nuestros resultados subrayan que la expresión génica del epitelio intestinal está controlada por señales microbianas, mucosas y dietéticas, específicas del contexto. Indican que existe una importante relación entre el contenido del lumen intestinal en el asma y la obesidad y la expresión génica de células del epitelio intestinal.
3. Las aguas fecales de niños asmáticos, normopeso y obesos, indujeron un fenotipo diferente en los organoides intestinales. Las aguas fecales de niños con asma alérgica y obesidad inducen cambios en las células epiteliales intestinales de organoides ratón, que incluyen disfunción mitocondrial, aumento de inflamación y alteraciones de la función de barrera intestinal.
4. La obesidad parece ser un factor más determinante que el asma en las modificaciones de la expresión génica.
5. Las aguas fecales de niños con asma grave inducen marcadores inflamatorios en organoides de yeyuno de ratón e inhiben la expresión de marcadores de proliferación y glucólisis.

Capítulo 6

REFERENCIAS

7 Referencias

1. Gómez Llorante, M. A., Cañavate, A. M., Martos, J. A. & Gómez Llorante, C. Factores implicados en el desarrollo del asma asociada a la obesidad. *Nutr Clin Med* **1**, 14–22 (2018).
2. Lobstein, T., Jackson-Leach, R., Powis, J., Brinsden, H. & Gray, M. World Obesity Atlas 2023. *World Obes. Fed.* 5–25 (2023).
3. Al-Khudairy, L. *et al.* Diet, physical activity and behavioural interventions for the treatment of overweight or obese adolescents aged 12 to 17 years. *Cochrane Database Syst. Rev.* (2017) doi:10.1002/14651858.CD012691.
4. Haktanir Abul, M. & Phipatanakul, W. Severe asthma in children: evaluation and management. *Allergology International* vol. 68 150–157 (2019).
5. Muñoz, X. *et al.* The MEGA project: A study of the mechanisms involved in the genesis and disease course of asthma. Asthma cohort creation and long-term follow-up. *Arch. Bronconeumol.* **54**, 378–385 (2018).
6. Durán, R. Fisiopatología del asma: una mirada actual . *Rev. Colomb. Neumol.* **27**, (2015).
7. Castro Calderon, O. Características epidemiológicas de crisis asmáticas en pacientes pediátricos de 3 a 14 años atendidos en el Hospital II- 2 Tarapoto. Periodo enero – julio 2. (Universidad Nacional de San Martín, 2020).
8. Kansen, H. M. *et al.* Prevalence and predictors of uncontrolled asthma in children referred for asthma and other atopic diseases. *J. of Asthma Allergy* **13**, 67–75 (2020).
9. Aguado Noriega, J., Arévalo Villalobos, P., Sánchez Jiménez, J. & Segarra García, E. *Guía de práctica clínica del asma infantil en atención primaria. Sociedad Española de Neumología Pediátrica* <https://neumoped.org/wp-content/uploads/2019/07/GUIA-ASMA-PEDIATRIA-2019.pdf> (2019).
10. Zein, J. G. *et al.* Impact of age and sex on outcomes and hospital cost of acute asthma in the United States, 2011-2012. *PLoS One* **11**, 1–13 (2016).
11. Duenas Meza, E. *et al.* Cost-utility analysis of an integrated care program for children with asthma in a medium-income country. *Pediatr. Pulmonol.* **55**, 3110–3118 (2020).
12. Lane, S., Molina, J. & Plusa, T. An international observational prospective study to determine the cost of asthma exacerbations (COAX). *Respir. Med.* **100**, 434–450 (2006).
13. Hamilton, D., Dee, A. & Perry, I. J. The lifetime costs of overweight and obesity in childhood and adolescence: a systematic review. *Obes. Rev.* **19**, 452–463 (2018).

14. Huang, J. *et al.* Obesity-related asthma and its relationship with microbiota. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **13**, 1–13 (2024).
15. Schiller, H. B. *et al.* The human lung cell atlas: a high-resolution reference map of the human lung in health and disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **61**, 31–41 (2019).
16. Rock, J. R., Randell, S. H. & Hogan, B. L. M. Airway basal stem cells: a perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling. *DMM Dis. Model. Mech.* **3**, 545–556 (2010).
17. Weibel, E. R. *Morphometry of the Human Lung*. (Springer Berlin Heidelberg, 1963). doi:10.1007/978-3-642-87553-3.
18. Ahmad, S. & Ahmad, A. Epithelial regeneration and lung stem cells. in *Lung epithelial biology in the pathogenesis of pulmonary disease* (eds. Venkataramana K, S. & Koval, M.) vol. 6 91–102 (Academic Press, 2017).
19. Hackett, N. R. *et al.* The human airway epithelial basal cell transcriptome. *PLoS One* **6**, e18378 (2011).
20. Greeley, M. A. Respiratory System. in *Atlas of Histology of the Juvenile Rat* (eds. George A, P. & Catherine A, P.) 89–125 (Academic Press, 2016). doi:10.1016/B978-0-12-802682-3.00004-5.
21. Alberts, B. *et al.* The airways and the gut. in *Molecular Biology of the Cell* (Garland Science, 2002).
22. Kuek, L. E. & Lee, R. J. First contact: the role of respiratory cilia in host-pathogen interactions in the airways. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **319**, L603–L619 (2020).
23. Levardon, H., Yonker, L., Hurley, B. & Mou, H. Expansion of airway basal cells and generation of polarized epithelium. *BioProtoc* **8**, e2877 (2018).
24. Mou, H. *et al.* Dual SMAD signaling inhibition enables long-term expansion of diverse epithelial basal cells. *Cell Stem Cell* **19**, 217–231 (2016).
25. Ma, J., Rubin, B. K. & Voynow, J. A. Mucins, Mucus, and Goblet Cells. *Chest* **154**, 169–176 (2018).
26. Rogers, D. F. The airway goblet cell. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **35**, 1–6 (2003).
27. Mullassery, D. & Smith, N. P. Lung development. *Semin. Pediatr. Surg.* **24**, 152–155 (2015).
28. Invernizzi, R., Lloyd, C. M. & Molyneaux, P. L. Respiratory microbiome and epithelial interactions shape immunity in the lungs. *Immunology* **160**, 171–182 (2020).

Referencias

29. Wiesner, D. L. & Klein, B. S. Lung epithelium: barrier immunity to inhaled fungi and driver of fungal-associated allergic asthma. *Curr. Opin. Microbiol.* **40**, 8–13 (2017).
30. Puttur, F., Gregory, L. G. & Lloyd, C. M. Airway macrophages as the guardians of tissue repair in the lung. *Immunol. Cell Biol.* **97**, 246–257 (2019).
31. Snyder, M. E. & Farber, D. L. Human lung tissue resident memory T cells in health and disease. *Curr. Opin. Immunol.* **59**, 101–108 (2019).
32. Rock, J. R. & Hogan, B. L. M. Epithelial progenitor cells in lung development, maintenance, repair, and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27**, 493–512 (2011).
33. Leiva-Juárez, M. M., Kolls, J. K. & Evans, S. E. Lung epithelial cells: Therapeutically inducible effectors of antimicrobial defense. *Mucosal Immunol.* **11**, 21–34 (2018).
34. Ferkol, T. & Schraufnagel, D. The global burden of respiratory disease. *Ann. Am. Thorac. Soc.* **11**, 404–406 (2014).
35. Krzyzanowski, M. & Cohen, A. Update of WHO air quality guidelines. *Air Qual. Atmos. Heal.* **1**, 7–13 (2008).
36. Cheng, L. K. *et al.* Gastrointestinal system. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **2**, 65 (2010).
37. Denbow, D. M. Gastrointestinal anatomy and physiology. *Sturkie's Avian Physiol. Sixth Ed.* 337–366 (2015) doi:10.1016/B978-0-12-407160-5.00014-2.
38. Wolfe, M. M. & Boylan, M. O. Obesity and the gastrointestinal tract: You are what you eat. *J. Clin. Gastroenterol.* **48**, 817–822 (2014).
39. Flier, L. G. van der & Clevers, H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.physiol.010908.163145> **71**, 241–260 (2009).
40. Shen, L. Functional Morphology of the Gastrointestinal Tract. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **337**, 1–35 (2009).
41. Small intestine – Veterinary Histology. <https://ohiostate.pressbooks.pub/vethisto/chapter/8-small-intestine/> (2022).
42. Sato, T. & Clevers, H. Primary mouse small intestinal epithelial cell cultures. *Methods Mol. Biol.* **945**, 319–328 (2012).
43. Rothe, T. *et al.* Diagnosis and management of asthma – The Swiss guidelines. *Respiration* **95**, 364–380 (2018).
44. Fuchs, O., Bahmer, T., Rabe, K. F. & von Mutius, E. Asthma transition from childhood into adulthood. *The Lancet Respiratory Medicine* vol. 5 224–234 (2017).

45. Salvo-Romero, E., Alonso-Cotoner, C., Pardo-Camacho, C., Casado-Bedmar, M. & Vicario, M. The intestinal barrier function and its involvement in digestive disease. *Rev esp enfeRm Dig* **107**, 686–696 (2015).
46. Camilleri, M., Madsen, K., Spiller, R., Van Meerveld, B. G. & Verne, G. N. Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. *Neurogastroenterol. Motil.* **24**, 512 (2012).
47. Holgate, S. T. *et al.* Asthma. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **1**, 1–22 (2015).
48. Moore, A. Childhood Asthma . *American Academy of Allergy Asthma & immunology* <https://www.aaaai.org/conditions-and-treatments/library/asthma-library/SP-childhood-asthma> (2020).
49. GEMA 5.0. Guía española para el manejo del asma. *Luzán 5 Health Consulting* 23–204 (2020).
50. Levy, M. L. *et al.* Diagnostic Spirometry in Primary Care Proposed standards for general practice compliant with American Thoracic Society and European Respiratory Society recommendations A General Practice Airways Group (GPIAG) 1 document, in association with the Associatio. *Nat. Publ. Gr.* **18**, 130–147 (2009).
51. Patra, K. P. Spirometry. *Pediatrics in Review* vol. 33 469–472 (2012).
52. Muñoz López, F. Asthma: endotypes and phenotypes at a pediatric age. *Rev. alerg. Méx.* **66**, 361–365 (2019).
53. Trisán Alonso, A. Prueba broncodilatadora. *Rev. asma* **1**, 60–67 (2016).
54. García De Vinuesa Broncano, G. Espirometría. Test de broncodilatación y de broncoconstricción. *Neumosur* **18**, 192–197 (2006).
55. Behrends, I. A. Asma alérgica en la infancia: influencia de los hongos durante el desarrollo. *Kompass Neumol.* **2**, 65–66 (2020).
56. Rivas, P. C., Cebollero, P., Echegoyen, E. & Santolaria, M. A. Occupational asthma. *An. Sist. Sanit. Navar* **28**, 51–63 (2005).
57. Lin, J. *et al.* Prevalence and risk factors of asthma in mainland China: The CARE study. *Respir. Med.* **137**, 48–54 (2018).
58. Castro, M. *et al.* Dupilumab Efficacy and Safety in Moderate-to-Severe Uncontrolled Asthma. *N. Engl. J. Med.* **378**, 2486–2496 (2018).
59. Yancey, S. W. *et al.* Biomarkers for severe eosinophilic asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* vol. 140 1509–1518 (2017).
60. Landgraf-Rauf, K., Anselm, B. & Schaub, B. The puzzle of immune phenotypes of

Referencias

- childhood asthma. *Mol. Cell. Pediatr.* **3**, (2016).
61. Dharmage, S. C., Perret, J. L. & Custovic, A. Epidemiology of asthma in children and adults. *Frontiers in Pediatrics* vol. 7 246 (2019).
 62. Lebold, K. M., Jacoby, D. B. & Drake, M. G. Inflammatory mechanisms linking maternal and childhood asthma. *J. Leukoc. Biol.* **108**, 113–121 (2020).
 63. Bermudez-Cordoví, L. L., Martínez-Peréz, J. R., Reyes-González, Y. & Escalona-Lallana, M. Sensibilización a ácaros y hongos ambientales en pacientes pediátricos con asma y rinitis alérgica. *Revista Electrónica Dr. Zoilo E. Marinello Vidaurreta* vol. 46 (2021).
 64. Vaillant, A. A. J., Vashisht, R. & Zito, P. M. Immediate hypersensitivity reactions. *StatPearls* (2021).
 65. Lee, D. H. *et al.* Asthma predictive index as a useful diagnostic tool in preschool children: A cross-sectional study in Korea. *Korean J. Pediatr.* **63**, 104–109 (2020).
 66. Coverstone, A. M., Seibold, M. A. & Peters, M. C. Diagnosis and management of T2-high asthma. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* **8**, 442–450 (2020).
 67. Miller, M. & Broide, D. H. Why is ORMDL3 on chromosome 17q21 highly linked to asthma? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **199**, 404–406 (2019).
 68. DeVries, A. & Vercelli, D. Epigenetic mechanisms in asthma. *Ann. Am. Thorac. Soc.* **13**, S50 (2016).
 69. Juvenal, G. Epigenetic: an old word, new concepts. *Rev Argent Endocrinol Metab* **51**, 66–74 (2014).
 70. Yang, S. N. *et al.* The effects of environmental toxins on allergic inflammation. *Allergy, Asthma and Immunology Research* vol. 6 478–484 (2014).
 71. Hoch, H. E., Houin, P. R. & Stillwell, P. C. Asthma in children: a brief review for primary care providers. *Pediatr. Ann.* **48**, 103–109 (2019).
 72. Zambrano Rivera, M. M. Clinical and epidemiological of bronchial asthma in asthmatic children in crisis features. *Dom. Cien.* **2**, 51–59 (2016).
 73. Subbarao, P., Mandhane, P. J. & Sears, M. R. Asthma: Epidemiology, etiology and risk factors. *CMAJ* vol. 181 E181 (2009).
 74. Boulet, L.-P. & Boulay, M.-È. Asthma-related comorbidities. *Expert Rev. Respir. Med.* **5**, 377–393 (2011).
 75. Infografía S.O.S.: Image. <https://infografiasos.files.wordpress.com/2012/10/asma.jpg>.
 76. Bakirtas, A. Diagnostic challenges of childhood asthma. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **23**, 27–

- 33 (2017).
77. Ross, K. R. *et al.* Severe asthma during childhood and adolescence: a longitudinal study. *J. Allergy Clin. Immunol.* **145**, 140-146.e9 (2020).
 78. Castro-Rodriguez, J. A. The asthma predictive index: a very useful tool for predicting asthma in young children. *J. Allergy Clin. Immunol.* **126**, 212–216 (2010).
 79. Benedictis, F. M. & Attanasi, M. Asthma in childhood. *European respiratory review* vol. 25 41–47 (2016).
 80. Ramratnam, S. K., Bacharier, L. B. & Guilbert, T. W. Severe asthma in children. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* **5**, 889–898 (2017).
 81. Bush, A. Management of asthma in children. *Minerva Pediatrica* vol. 70 444–457 (2018).
 82. Jat, K. R. Spirometry in children. *Primary Care Respiratory Journal* vol. 22 221–229 (2013).
 83. Rivero Yeverino, D. Spirometry: Basic concepts. *Rev. Alerg. Mex.* **66**, 76–84 (2019).
 84. Yancey, S. W. *et al.* Biomarkers for severe eosinophilic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **140**, 1509–1518 (2017).
 85. Rodríguez Rodríguez, M., Antolín Américo, D., Barbarroja Escudero, J. & Sánchez González, M. J. An update on asthma. *Med. -Programa Form. Médica* **12**, 1745–1756 (2017).
 86. Blic, J. Asma infantil. *EMC - Pediatría* **27**, 20–26 (2016).
 87. Aranibar Centeno, M. C. & Fernández Quintero, T. V. *Factores que influyen en la calidad de la técnica inhalatoria en pacientes asmáticos pediátricos en un hospital Esalud y MINSA.* (2020).
 88. Úbeda Sansano, M. I., Cortés Rico, O. & Praena Crespo, M. *Dispositivos de inhalación: El Pediatra de Atención Primaria y los dispositivos de inhalación. Documentos técnicos del GVR (publicación DT-GVR-X).* <http://www.respirar.org/index.php/grupo-vias-respiratorias/protocolos> (2017).
 89. Korta Murua, J. *et al.* Therapeutic education in asthma management. *An. Pediatr.* **66**, 496–517 (2007).
 90. Just, J., Deschildre, A., Lejeune, S. & Amat, F. New perspectives of childhood asthma treatment with biologics. *Pediatr. Allergy Immunol.* **30**, 159–171 (2018).
 91. Corren, J. *et al.* Dupilumab efficacy in patients with uncontrolled, moderate-to-severe allergic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* **8**, 516–526 (2020).
 92. Arakawa, H. *et al.* Japanese guidelines for childhood asthma 2017. *Allergology*

Referencias

- International* vol. 66 190–204 (2017).
93. Just, J., Bourgoïn-Heck, M. & Amat, F. Clinical phenotypes in asthma during childhood. *Clin. Exp. Allergy* **47**, 848–855 (2017).
 94. Hassoun, D., Moui, A., Colas, L., Blanc, F. X. & Magnan, A. Update in severe asthma physiopathology and treatments. *Revue de Medecine Interne* vol. 40 508–516 (2019).
 95. Ridao Redondo, M. Inmunoterapia en patología alérgica pediátrica. *Pediatr Integr.* **17**, 608–6015 (2013).
 96. Ray, A. & Kolls, J. K. Neutrophilic inflammation in asthma and association with disease severity. *Trends in Immunology* vol. 38 942–954 (2017).
 97. Yi, L. *et al.* Intelectin contributes to allergen-induced IL-25, IL-33, and TSLP expression and type 2 response in asthma and atopic dermatitis. *Mucosal Immunol.* **10**, 1491–1503 (2017).
 98. Bretón, R., Renata, N., Vargas, J., Salinas, M. & Miralles, E. Asma alérgica: mecanismos inmunológicos, fisiopatología y tratamientos actuales. *Investig. Cienc.* **23**, 66–72 (2015).
 99. Lambrecht, B. N. & Hammad, H. The immunology of asthma. *Nature Immunology* vol. 16 45–56 (2015).
 100. Humbert, M. *et al.* IgE-Mediated multimorbidities in allergic asthma and the potential for omalizumab therapy. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* **7**, 1418–1429 (2019).
 101. Garcia Garcia, M., Calvo Rey, C. & del Rosal Rabes, T. Pediatric asthma and viral infection. *Arch. Bronconeumol. (English Ed.)* **52**, 269–273 (2016).
 102. Pazmiño, F. A. & Navarrete Jiménez, M. L. *Immunologic mechanisms involved in the pathology of allergic asthma.* *Rev. Fac. Med* vol. 62 (2014).
 103. Bousquet, J. *et al.* Eosinophilic inflammation in asthma. *N. Engl. J. Med.* **323**, 1033–1039 (1990).
 104. Berry, M. A. *et al.* Evidence of a Role of Tumor Necrosis Factor α in Refractory Asthma. *N. Engl. J. Med.* **354**, 697–708 (2006).
 105. Halwani, R. *et al.* Th-17 regulatory cytokines IL-21, IL-23, and IL-6 enhance neutrophil production of IL-17 cytokines during asthma. *J. Asthma* **54**, 893–904 (2017).
 106. Siddiqui, S., Secor, E. R. & Silbart, L. K. Broncho-alveolar macrophages express chemokines associated with leukocyte migration in a mouse model of asthma. *Cell. Immunol.* **281**, 159–169 (2013).
 107. Matera, M. G., Rogliani, P., Calzetta, L. & Cazzola, M. TSLP inhibitors for asthma:

- current status and future prospects. *Drugs* **80**, 449–458 (2020).
108. Jia, L. *et al.* Detection of IL-9 producing T cells in the PBMCs of allergic asthmatic patients. *BMC Immunol.* **18**, 1–9 (2017).
109. Kanagalingam, T. *et al.* IL-2 modulates Th2 cell responses to glucocorticosteroid: A cause of persistent type 2 inflammation? *Immun. Inflamm. Dis.* **7**, 112–124 (2019).
110. Rincon, M. & Irvin, C. G. Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases. *International Journal of Biological Sciences* vol. 8 1281–1290 (2012).
111. Schaper, F. & Rose-John, S. Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade. *Cytokine Growth Factor Rev.* **26**, 475–487 (2015).
112. Doganci, A., Sauer, K., Karwot, R. & Finotto, S. Pathological role of IL-6 in the experimental allergic bronchial asthma in mice. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **28**, 257–269 (2005).
113. OMS. Obesidad y sobrepeso. *Organización Mundial de la Salud* <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (2020).
114. Lee, E. Y. & Yoon, K. H. Epidemic obesity in children and adolescents: risk factors and prevention. *Frontiers of Medicine* vol. 12 658–666 (2018).
115. Weihrauch-Blüher, S. & Wiegand, S. Risk factors and implications of childhood obesity. *Current obesity reports* vol. 7 254–259 (2018).
116. Inge, T. H. *et al.* Long-term outcomes of bariatric surgery in adolescents with severe obesity (FABS-5+): a prospective follow-up analysis. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **5**, 165–173 (2017).
117. Pan, L., Li, X., Feng, Y. & Hong, L. Psychological assessment of children and adolescents with obesity. *J. Int. Med. Res.* **46**, 89–97 (2018).
118. Míhrshahi, S. & Baur, L. A. What exposures in early life are risk factors for childhood obesity? *J. Paediatr. Child Health* **54**, 1294–1298 (2018).
119. Kohut, T., Robbins, J. & Panganiban, J. Update on childhood/adolescent obesity and its sequela. *Curr. Opin. Pediatr.* **31**, 645–653 (2019).
120. Apovian, C. M. Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden. *Am J Manag Care* vol. 22 176–185 (2016).
121. Ye, X. F. *et al.* Identification of the most appropriate existing anthropometric index for home-based obesity screening in children and adolescents. *Public Health* **189**, 20–25 (2020).
122. González-Jiménez, E., Montero-Alonso, M. Á. & Schmidt-Riovalle, J. Estudio de la

Referencias

- utilidad del índice de cintura-cadera como predictor del riesgo de hipertensión arterial en niños y adolescentes . *Nutr Hosp* **28**, 1993–1998 (2013).
123. Hernández Rodríguez, J. La obesidad y la inflamación crónica de bajo grado. *Rev. Cuba. Endocrinol.* **29**, 1–3 (2018).
124. Aceves-Martins, M., Llauradó, E., Tarro, L., Solà, R. & Giralt, M. Obesity-promoting factors in Mexican children and adolescents: challenges and opportunities Obesity-promoting factors in Mexican children and adolescents: challenges and opportunities. *Glob. Health Action* **9**, 29625 (2016).
125. Aguilera, C. *et al.* Obesity: risk factor or primary disease? *Rev. Med. Chil.* **147**, 470–474 (2019).
126. Machado, K., Gil, P., Ramos, I. & Pérez, C. Sobrepeso/obesidad en niños en edad escolar y sus factores de riesgo. *Arch. Pediatr. Urug.* **89**, 16–25 (2018).
127. Memedi, R., Tasic, V., Nikolic, E., Jancevska, A. & Gucev, Z. Obesity in childhood and adolescence, genetic factors. *Pril (Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauk.* **38**, 121–133 (2017).
128. Dabas, A. & Seth, A. Prevention and management of childhood obesity. *Indian Journal of Pediatrics* vol. 85 546–553 (2018).
129. Starling, A. P. *et al.* Associations of maternal BMI and gestational weight gain with neonatal adiposity in the Healthy Start study. *Am. J. Clin. Nutr.* **101**, 302–309 (2015).
130. Suzuki, K. *et al.* The association between maternal smoking during pregnancy and childhood obesity persists to the age of 9-10 years. *J. Epidemiol.* **19**, 136–142 (2009).
131. Omorou, A. Y. *et al.* Physical activity rather than sedentary behaviour is socially determined in French adolescents with overweight and obesity. *Prev. Med. (Baltim).* **134**, 106043 (2020).
132. Grandone, A., Di Sessa, A., Umamo, G. R., Toraldo, R. & Miraglia del Giudice, E. New treatment modalities for obesity. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **32**, 535–549 (2018).
133. Steinbeck, K. S., Lister, N. B., Gow, M. L. & Baur, L. A. Treatment of adolescent obesity. *Nat. Rev. Endocrinol.* **14**, 331–344 (2018).
134. Styne, D. M. *et al.* Pediatric obesity-assessment, treatment, and prevention: An endocrine society clinical practice guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **102**, 709–757 (2017).
135. Aguilar Cordero, M. J. *et al.* Programas de actividad física para reducir sobrepeso y obesidad en niños y adolescentes; revisión sistemática. *Nutr. Hosp.* **30**, 727–740 (2014).

136. Bolling, C. F., Armstrong, S. C., Reichard, K. W. & Michalsky, M. P. Metabolic and bariatric surgery for pediatric patients with severe obesity. *Pediatrics* **144**, 2019–3224 (2019).
137. Sagar, R. & Gupta, T. Psychological aspects of obesity in children and adolescents. *Indian J. Pediatr.* **85**, 554–559 (2018).
138. Pradeepan, S., Garrison, G. & Dixon, A. E. Obesity in asthma: Approaches to treatment. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **13**, 434–442 (2013).
139. Hersoug, L.-G. & Linneberg, A. The link between the epidemics of obesity and allergic diseases: does obesity induce decreased immune tolerance? *Allergy* **62**, 1205–1213 (2007).
140. Umamo, G. R. *et al.* Pediatric obesity and the immune system. *Front. Pediatr.* **7**, 487 (2019).
141. Chylikova, J., Dvorackova, J., Tauber, Z. & Kamarad, V. M1/M2 macrophage polarization in human obese adipose tissue. *Biomed. Pap.* **162**, 79–82 (2018).
142. Peters, U., Dixon, A. E. & Forno, E. Obesity and asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* vol. 141 1169–1179 (2018).
143. Weihrauch-Blüher, S., Schwarz, P. & Klusmann, J. H. Childhood obesity: increased risk for cardiometabolic disease and cancer in adulthood. *Metabolism.* **92**, 147–152 (2019).
144. Del, B. E. *et al.* Relationship among obesity, asthma and pulmonary function review article. *Bol Med Hosp Infant Mex* **68**, 157–168 (2011).
145. Li, X. *et al.* Investigation of the relationship between IL-6 and type 2 biomarkers in patients with severe asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **145**, 430–433 (2020).
146. Peters, M. C. *et al.* Plasma interleukin-6 concentrations, metabolic dysfunction, and asthma severity: a cross-sectional analysis of two cohorts. *Lancet Respir. Med.* **4**, 574–584 (2016).
147. Kelesidis, T., Kelesidis, I., Chou, S. & Mantzoros, C. S. Narrative review: the role of leptin in human physiology: Emerging clinical applications. *Ann. Intern. Med.* **152**, 93–100 (2010).
148. Galicia Negrete, G. & Falfán Valencia, R. Mediators of inflammatory response in asthma and its association with obesity. *Rev. Alerg. Mex.* **64**, 198–205 (2017).
149. Bantulà, M., Roca-Ferrer, J., Arismendi, E. & Picado, C. Asthma and Obesity: Two Diseases on the Rise and Bridged by Inflammation. *J. Clin. Med.* **10**, 169 (2021).
150. Achari, A. E. & Jain, S. K. Adiponectin, a therapeutic target for obesity, diabetes, and endothelial dysfunction. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 18 1321 (2017).

Referencias

151. Wolf, A. M., Wolf, D., Rumpold, H., Enrich, B. & Tilg, H. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **323**, 630–635 (2004).
152. Theofani, E., Semitekolou, M., Morianos, I., Samitas, K. & Xanthou, G. Targeting NLRP3 Inflammasome Activation in Severe Asthma. *J. Clin. Med.* **8**, 1615 (2019).
153. Miethe, S., Karsonova, A., Karaulov, A. & Renz, H. Obesity and asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **146**, 685–693 (2020).
154. Zhang, Y. *et al.* The dynamic relationship between asthma and obesity in schoolchildren. *Am. J. Epidemiol.* **189**, 583–591 (2020).
155. Hirano, T. & Matsunaga, K. Late-onset asthma: current perspectives. *J. Asthma Allergy* **11**, 27 (2018).
156. Anand, S. & Mande, S. S. Diet, microbiota and gut-lung connection. *Front. Microbiol.* **19**, 2147 (2018).
157. Barcik, W., Boutin, R. C. T., Sokolowska, M. & Finlay, B. B. The role of lung and gut microbiota in the pathology of asthma. *Immunity* vol. 52 241–255 (2020).
158. Chunxi, L., Haiyue, L., Yanxia, L., Jianbing, P. & Jin, S. The gut microbiota and respiratory diseases: new evidence. *J. Immunol. Res.* **2020**, (2020).
159. Sender, R., Fuchs, S. & Milo, R. Are we really vastly outnumbered? Revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans. *Cell* vol. 164 337–340 (2016).
160. Icaza-Chávez, M. E. Gut microbiota in health and disease. *Revista de Gastroenterología de Mexico* vol. 78 240–248 (2013).
161. Rastelli, M., Cani, P. D. & Knauf, C. The gut microbiome influences host endocrine functions. *Endocr. Rev.* **40**, 1271–1284 (2019).
162. Blum, H. E. The human microbiome. *Adv. Med. Sci.* **62**, 414–420 (2017).
163. Davenport, E. R. *et al.* The human microbiome in evolution. *BMC Biol* **15**, 127 (2017).
164. Romero-Calvo, I., Ocón, B., Martínez-Moya, P., Martínez-Augustin, O. & Sánchez de Medina, F. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal. Biochem.* **401**, 318–320 (2010).
165. Frati, F. *et al.* The role of the microbiome in asthma: the gut–lung axis. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 123 (2019).
166. Shukla, S. D., Budden, K. F., Neal, R. & Hansbro, P. M. Microbiome effects on immunity, health and disease in the lung. *Clin. Transl. Immunol.* **6**, e133 (2017).
167. Cristina Moreno del Castillo, M., Valladares-García, J. & Halabe-Cherem, J. *Microbioma*

- humano*. vol. 61 (2018).
168. Durack, J. *et al.* Delayed gut microbiota development in high-risk for asthma infants is temporarily modifiable by *Lactobacillus* supplementation. *Nat. Commun.* **9**, 707 (2018).
 169. Hillman, E. T., Lu, H., Yao, T. & Nakatsu, C. H. Microbial ecology along the gastrointestinal tract. *Microbes and Environments* vol. 32 300–313 (2017).
 170. Almeida, A. *et al.* A new genomic blueprint of the human gut microbiota. *Nature* **568**, 499–504 (2019).
 171. Dupont, H. L., Jiang, Z.-D., Dupont, A. W. & Utay, N. S. The intestinal microbiome in human health and disease. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* **131**, 178–197 (2020).
 172. Budden, K. F. *et al.* Emerging pathogenic links between microbiota and the gut-lung axis. *Nat. Rev. Microbiol.* **15**, 55–63 (2017).
 173. Gomez-Llorente, M. A. *et al.* A multi-omics approach reveals new signatures in obese allergic asthmatic children. *Biomedicines* **8**, 359 (2020).
 174. Lynch, S. V. & Pedersen, O. The human intestinal microbiome in health and disease. *N. Engl. J. Med.* **375**, 2369–2379 (2016).
 175. Feng, Q., Chen, W. D. & Wang, Y. D. Gut microbiota: An integral moderator in health and disease. *Front. Microbiol.* **9**, (2018).
 176. Tan, J. Y., Tang, Y. C. & Huang, J. Gut microbiota and lung injury. in *Advances in Experimental Medicine and Biology* vol. 1238 55–72 (Springer, 2020).
 177. Goma, E. Z. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **113**, 2019–2040 (2020).
 178. Turnbaugh, P. J. *et al.* The effect of diet on the human gut microbiome: A metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci. Transl. Med.* **1**, 6ra14 (2009).
 179. Howe, A. *et al.* Divergent responses of viral and bacterial communities in the gut microbiome to dietary disturbances in mice. *ISME J.* **10**, 1217–1227 (2016).
 180. Yang, Y. J. & Ni, Y. H. Gut microbiota and pediatric obesity/non-alcoholic fatty liver disease. *J. Formos. Med. Assoc.* **118**, S55–S61 (2019).
 181. Zhang, C. *et al.* Structural resilience of the gut microbiota in adult mice under high-fat dietary perturbations. *ISME J.* **6**, 1848–1857 (2012).
 182. Hernández, G. *et al.* Adiposidad visceral, patogénia y medición. *Rev Venez Endocrinol Metab* **15**, 70–77 (2017).
 183. Isolauri, E. Microbiota and Obesity. *Nestle Nutr. Inst. Workshop Ser.* **88**, 95–105 (2017).
 184. XL, G. & CM, W. Research advances in association between childhood obesity and gut

- microbiota. *Chinese J. Contemp. Pediatr.* **19**, 371 (2017).
185. Ver Heul, A., Planer, J. & Kau, A. L. The human microbiota and asthma. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* vol. 57 350–363 (2019).
186. Picardo, S. L., Coburn, B. & Hansen, A. R. The microbiome and cancer for clinicians. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* vol. 141 1–12 (2019).
187. McKenzie, C., Tan, J., Macia, L. & Mackay, C. R. The nutrition-gut microbiome-physiology axis and allergic diseases. *Immunol. Rev.* **278**, 277–295 (2017).
188. Silva, Y. P., Bernardi, A. & Frozza, R. L. The role of short-chain fatty acids from gut microbiota in gut-brain communication. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **11**, 25 (2020).
189. Valverde Molina, J. & Valverde Fuentes, J. La disbiosis microbiana como origen precoz del asma. | Valverde Molina | Revista de asma. *Rev. Asma* **3**, 36–45 (2018).
190. Sanders, M. E., Merenstein, D. J., Reid, G., Gibson, G. R. & Rastall, R. A. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **16**, 605–616 (2019).
191. Quigley, E. M. M. Prebiotics and probiotics in digestive health. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **17**, 333–344 (2019).
192. Wang, J. W. *et al.* Fecal microbiota transplantation: Review and update. *J. Formos. Med. Assoc.* **118**, S23–S31 (2019).
193. Kim, J., Koo, B. K. & Knoblich, J. A. Human organoids: model systems for human biology and medicine. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **21**, 571–584 (2020).
194. Rossi, G., Manfrin, A. & Lutolf, M. P. Progress and potential in organoid research. *Nat. Rev. Genet.* **19**, 671–687 (2018).
195. Prior, N., Inacio, P. & Huch, M. Liver organoids: From basic research to therapeutic applications. *Gut* **68**, 2228–2237 (2019).
196. Clevers, H. Modeling development and disease with organoids. *Cell* **165**, 1586–1597 (2016).
197. Schutgens, F. & Clevers, H. Human organoids: tools for understanding biology and treating diseases. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **15**, 211–234 (2020).
198. Clevers, H. C. Organoids: avatars for personalized medicine. *Keio J. Med.* **68**, 95–95 (2019).
199. Setia, H. & Muotri, A. R. Brain organoids as a model system for human neurodevelopment and disease. *Semin. Cell Dev. Biol.* **95**, 93–97 (2019).
200. Bourguignon, C. *et al.* Lung organoids. *Med Sci* **36**, 382–388 (2020).

201. Xu, A. T., Tong, J. L. & Ran, Z. H. Organoids derived from digestive tract, liver, and pancreas. *J. Dig. Dis.* **17**, 3–10 (2016).
202. Nishinakamura, R. Human kidney organoids: progress and remaining challenges. *Nat. Rev. Nephrol.* **15**, 613–624 (2019).
203. Hosseini, Z. F., Nelson, D. A., Moskwa, N. & Larsen, M. Generating Embryonic Salivary Gland Organoids. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **83**, e76 (2019).
204. Hacker, B. C., Gomez, J. D., Silvera Batista, C. A. & Rafat, M. Growth and characterization of irradiated organoids from mammary glands. *J. Vis. Exp.* 10.3791/59293 (2019) doi:10.3791/59293.
205. Hentschel, V. *et al.* Enteropathogenic Infections: Organoids Go Bacterial. *Stem Cells International* vol. 2021 8847804 (2021).
206. d'Aldebert, E. *et al.* Characterization of human colon organoids from inflammatory bowel disease patients. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 363 (2020).
207. Mead, B. E. & Karp, J. M. All models are wrong, but some organoids may be useful. *Genome Biol.* **20**, 66 (2019).
208. Bar-Ephraim, Y. E., Kretzschmar, K. & Clevers, H. Organoids in immunological research. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 279–293 (2020).
209. de Groot, S. C., Sliedregt, K., van Benthem, P. P. G., Rivolta, M. N. & Huisman, M. A. Building an artificial stem cell niche: prerequisites for future 3D-formation of inner ear structures—toward 3D inner ear biotechnology. *Anat. Rec.* **303**, 408–426 (2020).
210. Skardal, A., Shupe, T. & Atala, A. Organoid-on-a-chip and body-on-a-chip systems for drug screening and disease modeling. *Drug Discov. Today* **21**, 1399–1411 (2016).
211. Corrò, C., Novellademunt, L. & Li, V. S. W. A brief history of organoids. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **319**, C151–C165 (2020).
212. Marx, U. *et al.* 'Human-on-a-chip' developments: A translational cuttingedge alternative to systemic safety assessment and efficiency evaluation of substances in laboratory animals and man? *Altern. to Lab. Anim.* **40**, 235–257 (2012).
213. Maschmeyer, I. *et al.* A four-organ-chip for interconnected long-term co-culture of human intestine, liver, skin and kidney equivalents. *Lab Chip* **15**, 2688–2699 (2015).
214. Simian, M. & Bissell, M. J. Organoids: A historical perspective of thinking in three dimensions. *J. Cell Biol.* **216**, 31–40 (2017).
215. Deda, O., Gika, H. G., Wilson, I. D. & Theodoridis, G. A. An overview of fecal sample preparation for global metabolic profiling. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **113**, 137–150 (2015).

Referencias

216. Deda, O. *et al.* Sample preparation optimization in fecal metabolic profiling. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1047**, 115–123 (2017).
217. Pearson, J. R., Gill, C. I. R. & Rowland, I. R. Diet, fecal water, and colon cancer - Development of a biomarker. *Nutr. Rev.* **67**, 509–526 (2009).
218. Monleón, D., Morales, J. M., Barrasa, A., López, J. A. & Celda, B. Metabolite profiling of fecal water extracts from human colorectal cancer. *NMR Biomed.* **22**, 342–348 (2008).
219. Ochsner, S. A. *et al.* The Signaling Pathways Project, an integrated 'omics knowledgebase for mammalian cellular signaling pathways. *Sci. Data* **6**, 1–21 (2019).
220. Valdespino-Gómez, V. M., Valdespino-Castillo, P. M. & Valdespino-Castillo, V. E. Interacción de las vías de señalización intracelulares participantes en la proliferación celular: potencial blanco de intervencionismo terapéutico. *Cir. Cir.* **83**, 165–174 (2015).
221. Heredia Ruíz, D., Herrera Martínez, M. & Caraballo, D. F. Cellular Signaling Pathways Involved in Cervical Carcinogenesis. *Rev Cuba. Obs. Ginecol* **45**, (2019).
222. Becerril-Rico, J. Cell signaling pathways: An approach to human physiology and pathology. *Med. Interna Mex.* **37**, 766–780 (2021).
223. Vanhaesebroeck, B., Perry, M. W. D., Brown, J. R., André, F. & Okkenhaug, K. PI3K inhibitors are finally coming of age. *Nat. Rev. Drug Discov.* **20**, 741–769 (2021).
224. Suzuki, H. *et al.* PI3K and Btk differentially regulate B cell antigen receptor-mediated signal transduction. *Nat. Immunol.* **4**, 280–286 (2003).
225. Wu, P., Nielsen, T. E. & Clausen, M. H. FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. *Trends Pharmacol. Sci.* **36**, 422–439 (2015).
226. Pinzón, C. E., Serrano, M. L. & Sanabria, M. C. Papel de la vía fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K/Akt) en humanos. *Rev. Ciencias la Salud* **7**, 47–66 (2009).
227. Fruman, D. A. *et al.* The PI3K pathway in human disease. *Cell* **170**, 605–635 (2017).
228. Vías de transmisión de señal (artículo) | Khan Academy. <https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/cell-communication-and-cell-cycle/changes-in-signal-transduction-pathways/a/intracellular-signal-transduction>.
229. Naderali, E. *et al.* Regulation and modulation of PTEN activity. *Mol. Biol. Rep.* **45**, 2869–2881 (2018).
230. Hemmings, B. A. & Restuccia, D. F. PI3K-PKB / Akt pathway. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **4**, 1–4 (2012).
231. Winkler, D. G. *et al.* PI3K- δ and PI3K- γ inhibition by IPI-145 abrogates immune responses and suppresses activity in autoimmune and inflammatory disease models.

- Chem. Biol.* **20**, 1364–1374 (2013).
232. Hawkins, P. T. & Stephens, L. R. PI3K signalling in inflammation. *Biochim. Biophys. Acta* **1851**, 882–897 (2015).
233. Breasson, L. *et al.* PI3K γ activity in leukocytes promotes adipose tissue inflammation and early-onset insulin resistance during obesity. *Sci. Signal.* **10**, 6711 (2017).
234. Solinas, G. & Becattini, B. The role of PI3K γ in metabolism and macrophage activation. *Oncotarget* **8**, 106145–106146 (2017).
235. Kuete, V. *et al.* Pharmacogenomic and molecular docking studies on the cytotoxicity of the natural steroid wortmannin against multidrug-resistant tumor cells. *Phytomedicine* **22**, 120–127 (2015).
236. Wipf, P. & Halter, R. J. Química y biología de la wortmannina . *Org. Biomol. química* **3**, 2053–2061 (2005).
237. Ui, M., Okada, T., Hazeki, K. & Hazeki, O. Wortmannin as a unique probe for an intracellular signalling protein, phosphoinositide 3-kinase. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 303–307 (1995).
238. Yuan, H., Barnes, K. R., Weissleder, R., Cantley, L. & Josephson, L. Covalent reactions of wortmannin under physiological conditions. *Chem. Biol.* **14**, 321–328 (2007).
239. Cantrell, W., Huang, Y., Menchaca, A. A., Kulik, G. & Welker, M. E. Synthesis and PI3 kinase inhibition activity of a wortmannin-leucine derivative. *Molecules* **23**, 1791 (2018).
240. Mitchell, S., Vargas, J. & Hoffmann, A. Signaling via the NF κ B system. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **8**, 227–241 (2016).
241. Liu, T., Zhang, L., Joo, D. & Sun, S. C. NF- κ B signaling in inflammation. *Sig Transduct Target Ther* **2**, (2017).
242. Mulero, M. C., Huxford, T. & Gourisankar, G. NF- κ B, I κ B, and IKK: Integral Components of Immune System Signaling. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1172**, 207–226 (2019).
243. Yu, H., Lin, L., Zhang, Z., Zhang, H. & Hu, H. Targeting NF- κ B pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study. *Signal Transduct. Target. Ther.* **5**, 209 (2020).
244. Shao-Cong Sun. The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 545–558 (2017).
245. García, M. G. *et al.* Inhibition of NF- κ B activity by BAY 11-7082 increases apoptosis in multidrug resistant leukemic T-cell lines. *Leuk. Res.* **29**, 1425–1434 (2005).
246. Krishnan, N., Bencze, G., Cohen, P. & Tonks, N. K. The anti-inflammatory compound

Referencias

- BAY-11-7082 is a potent inhibitor of protein tyrosine phosphatases. *FEBS J.* **280**, 2830–2841 (2013).
247. Lee, J., Rhee, M. H., Kim, E. & Cho, J. Y. BAY 11-7082 is a broad-spectrum inhibitor with anti-inflammatory activity against multiple targets. *Mediators Inflamm.* **2012**, 11 (2012).
248. Wautier, M. P., Guillausseau, P. J. & Wautier, J. L. Activation of the receptor for advanced glycation end products and consequences on health. *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.* **11**, 305–309 (2017).
249. Rouhiainen, A., Kuja-Panula, J., Tumova, S. & Rauvala, H. *RAGE-mediated cell signaling. Calcium binding proteins and RAGE. Methods in Molecular Biology* vol. 963 (Humana Press, Totowa, NJ, 2013).
250. Bongarzone, S., Savickas, V., Luzi, F. & Gee, A. D. Targeting the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE): A medicinal chemistry perspective. *J. Med. Chem.* **60**, 7213–7232 (2017).
251. Sakaguchi, M. *et al.* Signal diversity of receptor for advanced glycation end products. *Acta Med. Okayama* **71**, 459–465 (2017).
252. Hudson, B. I. & Lippman, M. E. Targeting RAGE signaling in inflammatory disease. *Annu. Rev. Med.* **69**, 349–364 (2018).
253. Wang, L. *et al.* FPS-ZM1 inhibits LPS-induced microglial inflammation by suppressing JAK/STAT signaling pathway. *Int. Immunopharmacol.* **100**, (2021).
254. Chan, S. Research translation and emerging health technologies: synthetic biology and beyond. *Heal. Care Anal.* **26**, 310–325 (2018).
255. Finotello, F. & Di Camillo, B. Measuring differential gene expression with RNA-seq: Challenges and strategies for data analysis. *Brief. Funct. Genomics* **14**, 130–142 (2015).
256. Hrdlickova, R., Toloue, M. & Tian, B. RNA-Seq methods for transcriptome analysis. *WIREs RNA* **8**, 1364 (2017).
257. Conesa, A. *et al.* A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biol.* **17**, 1–19 (2016).
258. Kumar, K. R., Cowley, M. J., Davis, R. L., Rabbolini, D. J. & Othman, M. Next-generation sequencing and emerging technologies. *Semin Thromb Hemost* **45**, 661–673 (2019).
259. IRepertoire. Next-generation sequencing (NGS) overview. <https://irepertoire.com/ngs-overview-from-sample-to-sequencer-to-results/> (2024).
260. Aguilera, P., Ruiz Tachiquín, M., Rocha Munive, M. G., Pineda Olvera, B. & Chánez Cárdenas, M. E. PCR en tiempo real. *Herramientas Mol. Apl. en Ecol.* **13**, 175–202

- (2015).
261. Thornton, B. & Basu, C. *Rapid and simple method of qPCR primer design. PCR Primer Design. Methods in Molecular Biology. Humana Press* (2015).
 262. Harshitha, R. & Arunraj, D. R. Real-time quantitative PCR: A tool for absolute and relative quantification. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **49**, 800–812 (2021).
 263. Cosette, P. & Jouenne, T. Proteomic analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**, 176–179 (2000).
 264. Aslam, B., Basit, M., Nisar, M. A., Khurshid, M. & Rasool, M. H. Proteomics: Technologies and their applications. *J. Chromatogr. Sci.* **55**, 182–196 (2017).
 265. Gonneaud, A., Asselin, C., Giroux, V. & Boisvert, F.-M. *Workflow for quantitative proteomic analysis of intestinal organoids using SILAC*. vol. 2603 (SILAC. Methods in Molecular Biology, 2022).
 266. Cuddihy, H. *et al.* Role of CB 1 receptors in the acute regulation of small intestinal permeability: effects of high-fat diet. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **323**, G219–G238. (2022).
 267. Shin, J. H. & Seeley, R. J. Reg3 Proteins as Gut Hormones? *Endocrinology* **160**, 1506–1514 (2019).
 268. Machado, L., Esteves, E., Oliveira, D., Castro, B. De & Castro, D. Asthma , obesity , and microbiota : A complex immunological interaction. *Immunol. Lett.* **255**, 10–20 (2023).
 269. Ali, Z. & Ulrik, C. S. Obesity and asthma : A coincidence or a causal relationship? A systematic review. *Respir. Med.* **107**, 1287–1300 (2013).
 270. Youssef, D. M., Elbehidy, R. M., Shokry, D. M. & Elbehidy, E. M. The influence of leptin on Th1/Th2 balance in obese children with asthma*. *J. bras. pneumol* **39**, 562–568 (2013).
 271. Medina, F. S. De, Romero-calvo, I., Mascaraque, C. & Martínez-augustin, O. Intestinal inflammation and mucosal barrier function. *Inflamm Bowel Dis* **20**, 2394–2404 (2014).
 272. Pearce, S. C. *et al.* Marked differences in tight junction composition and macromolecular permeability among different intestinal cell types. *BMC Biol* **16**, (2018).
 273. Body-Malapel, M. *et al.* The RAGE signaling pathway is involved in intestinal inflammation and represents a promising therapeutic target for Inflammatory Bowel Diseases. *Mucosal Immunol.* **12**, 468–478 (2019).
 274. Guerbette, T., Boudry, G. & Lan, A. Mitochondrial function in intestinal epithelium homeostasis and modulation in diet-induced obesity. *Mol. Metab.* **63**, 101546 (2022).

Referencias

275. Mishra, S. P. *et al.* A mechanism by which gut microbiota elevates permeability and inflammation in obese / diabetic mice and human gut. *Gut* **72**, 1848–1865 (2023).
276. Vieira, W. A. & Pretorius, E. The impact of asthma on the gastrointestinal tract (GIT). *J. Asthma Allergy* **3**, 123–130 (2010).
277. Wallaert, B. *et al.* Immunoreactivity for interleukin 3 and 5 and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor of intestinal mucosa in bronchial asthma. *J. Exp. Med.* **182**, 1897 (1995).
278. Zhao, X. *et al.* The role of gut microbiome in the complex relationship between respiratory tract infection and asthma. *Front. Microbiol.* **14**, (2023).
279. Shin, J. H., Bozadjieva-Kramer, N. & Seeley, R. J. Reg3 γ : current understanding and future therapeutic opportunities in metabolic disease. *Exp. Mol. Med.* **2023** 558 **55**, 1672–1677 (2023).
280. Nowak, J. K. *et al.* Expression profiling of ileal mucosa in asthma reveals upregulation of innate immunity and genes characteristic of Paneth and goblet cells. *Allergy, Asthma Clin. Immunol.* **17**, 1–11 (2021).
281. Li, C. *et al.* Glycolytic Regulation of Intestinal Stem Cell Self-Renewal and Differentiation. *Cmgh* **15**, 931–947 (2023).
282. Schwärzler, J., Mayr, L., Grabherr, F., Tilg, H. & Adolph, T. E. Epithelial metabolism as a rheostat for intestinal inflammation and malignancy. *Trends Cell Biol.* **xx**, 1–15 (2024).

Capítulo 8

ANEXOS

8 Anexos

8.1 Anexo 1. Tabla 1. Genes sobreexpresados e inhibidos indican alteraciones en procesos biológicos a nivel de la división celular y la expresión génica.

Analysis Type: PANTHER Overrepresentation Test (Released 20240226)
Annotation Version and Release Date: PANTHER version 18.0 Released 2023-08-01
Analyzed List: Con valores todos asma vs c.txt (Homo sapiens)
Reference List: Mus musculus (all genes in database)
Test Type: FISHER
Correction: FDR

	Mus musculus - REFLIST (21983)	Con valores todos asma vs c.txt (1247)	Con valores todos asma vs c.txt (expected)	Con valores todos asma vs c.txt (over/under)	Con valores todos asma vs c.txt (fold Enrichment)	Con valores todos asma vs c.txt (raw P-value)	Con valores todos asma vs c.txt (FDR)
PANTHER GO-Slim Biological Process							
Meiotic sister chromatid cohesion (GO:0051177)	2	2	0.11	+	17.63	3.22E-03	3.44E-02

Protein localization to kinetochore (GO:0034501)	4	4	0.23	+	17.63	1.03E-05	3.24E-04
Mitotic DNA replication (GO:1902969)	9	8	0.51	+	15.67	8.97E-10	7.60E-08
Mitotic DNA replication initiation (GO:1902975)	6	5	0.34	+	14.69	3.33E-06	1.18E-04
Spindle elongation (GO:0051231)	5	4	0.28	+	14.1	4.92E-05	1.12E-03
Double-strand break repair via break-induced replication (GO:0000727)	12	8	0.68	+	11.75	4.23E-08	2.52E-06
Mitotic chromosome condensation (GO:0007076)	6	4	0.34	+	11.75	1.41E-04	2.93E-03
Cell cycle DNA replication (GO:0044786)	12	8	0.68	+	11.75	4.23E-08	2.45E-06
Nuclear DNA replication (GO:0033260)	12	8	0.68	+	11.75	4.23E-08	2.39E-06
Negative regulation of double-strand break repair via homologous recombination (GO:2000042)	5	3	0.28	+	10.58	1.67E-03	2.11E-02
DNA strand elongation involved in DNA replication (GO:0006271)	12	7	0.68	+	10.28	1.14E-06	4.67E-05
DNA replication initiation (GO:0006270)	19	11	1.08	+	10.21	9.29E-10	7.58E-08
DNA unwinding involved in DNA replication (GO:0006268)	9	5	0.51	+	9.79	6.06E-05	1.33E-03
DNA geometric change (GO:0032392)	15	8	0.85	+	9.4	4.72E-07	2.16E-05
DNA duplex unwinding (GO:0032508)	15	8	0.85	+	9.4	4.72E-07	2.12E-05
Nucleoside triphosphate catabolic process (GO:0009143)	6	3	0.34	+	8.81	3.20E-03	3.49E-02
Negative regulation of DNA repair (GO:0045738)	6	3	0.34	+	8.81	3.20E-03	3.47E-02
Negative regulation of double-strand break repair (GO:2000780)	6	3	0.34	+	8.81	3.20E-03	3.45E-02
Mitotic G2 DNA damage checkpoint signaling (GO:0007095)	6	3	0.34	+	8.81	3.20E-03	3.44E-02
Negative regulation of nuclear division (GO:0051784)	14	7	0.79	+	8.81	4.48E-06	1.54E-04
Negative regulation of mitotic sister chromatid segregation (GO:0033048)	11	5	0.62	+	8.01	2.02E-04	4.01E-03
Negative regulation of sister chromatid segregation (GO:0033046)	11	5	0.62	+	8.01	2.02E-04	3.97E-03
Negative regulation of mitotic sister chromatid separation (GO:2000816)	11	5	0.62	+	8.01	2.02E-04	3.93E-03
Mitotic spindle assembly checkpoint signaling (GO:0007094)	11	5	0.62	+	8.01	2.02E-04	3.90E-03
Negative regulation of mitotic metaphase/anaphase transition (GO:0045841)	11	5	0.62	+	8.01	2.02E-04	3.87E-03
Negative regulation of mitotic nuclear division (GO:0045839)	11	5	0.62	+	8.01	2.02E-04	3.83E-03

Anexos

Purine nucleobase metabolic process (GO:0006144)	9	4	0.51	+	7.83	1.03E-03	1.48E-02
Mitotic DNA replication checkpoint signaling (GO:0033314)	9	4	0.51	+	7.83	1.03E-03	1.47E-02
DNA conformation change (GO:0071103)	18	8	1.02	+	7.83	2.75E-06	1.03E-04
DNA replication checkpoint signaling (GO:0000076)	14	6	0.79	+	7.56	6.66E-05	1.45E-03
Negative regulation of chromosome separation (GO:1905819)	12	5	0.68	+	7.35	3.30E-04	5.77E-03
Negative regulation of chromosome segregation (GO:0051985)	12	5	0.68	+	7.35	3.30E-04	5.72E-03
Negative regulation of metaphase/anaphase transition of cell cycle (GO:1902100)	12	5	0.68	+	7.35	3.30E-04	5.68E-03
Regulation of nuclear division (GO:0051783)	32	13	1.82	+	7.16	7.47E-09	4.99E-07
Regulation of mitotic nuclear division (GO:0007088)	30	12	1.7	+	7.05	3.51E-08	2.15E-06
Sister chromatid segregation (GO:0000819)	46	18	2.61	+	6.9	2.02E-11	2.35E-09
DNA-templated DNA replication (GO:0006261)	64	25	3.63	+	6.89	2.62E-15	5.76E-13
Carbohydrate derivative transport (GO:1901264)	18	7	1.02	+	6.86	3.40E-05	8.23E-04
Mitotic sister chromatid segregation (GO:0000070)	44	17	2.5	+	6.81	9.33E-11	9.34E-09
Replication fork processing (GO:0031297)	13	5	0.74	+	6.78	5.11E-04	8.22E-03
Negative regulation of chromosome organization (GO:2001251)	13	5	0.74	+	6.78	5.11E-04	8.16E-03
Microtubule depolymerization (GO:0007019)	13	5	0.74	+	6.78	5.11E-04	8.10E-03
Mitotic nuclear division (GO:0140014)	47	18	2.67	+	6.75	3.11E-11	3.42E-09
Fluid transport (GO:0042044)	11	4	0.62	+	6.41	2.46E-03	2.83E-02
Mitotic DNA integrity checkpoint signaling (GO:0044774)	22	8	1.25	+	6.41	1.64E-05	4.69E-04
Water transport (GO:0006833)	11	4	0.62	+	6.41	2.46E-03	2.81E-02
Mitotic spindle assembly (GO:0090307)	14	5	0.79	+	6.3	7.58E-04	1.14E-02
DNA replication (GO:0006260)	73	26	4.14	+	6.28	1.00E-14	2.00E-12
Nuclear chromosome segregation (GO:0098813)	75	26	4.25	+	6.11	2.12E-14	3.88E-12
DNA integrity checkpoint signaling (GO:0031570)	32	11	1.82	+	6.06	8.00E-07	3.32E-05
Cell cycle checkpoint signaling (GO:0000075)	50	17	2.84	+	5.99	9.68E-10	7.61E-08
Regulation of lipid biosynthetic process (GO:0046890)	12	4	0.68	+	5.88	3.53E-03	3.62E-02

Regulation of meiotic cell cycle (GO:0051445)	12	4	0.68	+	5.88	3.53E-03	3.60E-02
Regulation of mitotic sister chromatid segregation (GO:0033047)	15	5	0.85	+	5.88	1.08E-03	1.53E-02
Mitotic G2/M transition checkpoint (GO:0044818)	15	5	0.85	+	5.88	1.08E-03	1.52E-02
Mitotic cell cycle checkpoint signaling (GO:0007093)	39	13	2.21	+	5.88	1.20E-07	6.16E-06
Chromosome segregation (GO:0007059)	112	37	6.35	+	5.82	4.30E-19	1.89E-16
Reciprocal meiotic recombination (GO:0007131)	25	8	1.42	+	5.64	4.76E-05	1.12E-03
Homologous recombination (GO:0035825)	25	8	1.42	+	5.64	4.76E-05	1.10E-03
Reciprocal homologous recombination (GO:0140527)	25	8	1.42	+	5.64	4.76E-05	1.09E-03
Mitotic DNA damage checkpoint signaling (GO:0044773)	19	6	1.08	+	5.57	4.71E-04	7.80E-03
Epidermal growth factor receptor signaling pathway (GO:0007173)	13	4	0.74	+	5.42	4.87E-03	4.71E-02
Resolution of meiotic recombination intermediates (GO:0000712)	13	4	0.74	+	5.42	4.87E-03	4.69E-02
Mitotic cell cycle process (GO:1903047)	173	53	9.81	+	5.4	5.44E-25	3.00E-22
Nuclear division (GO:0000280)	93	28	5.28	+	5.31	1.23E-13	2.08E-11
Nucleobase metabolic process (GO:0009112)	20	6	1.13	+	5.29	6.41E-04	9.73E-03
Regulation of cyclin-dependent protein serine/threonine kinase activity (GO:0000079)	27	8	1.53	+	5.22	8.82E-05	1.91E-03
Negative regulation of G2/M transition of mitotic cell cycle (GO:0010972)	17	5	0.96	+	5.18	2.03E-03	2.46E-02
Negative regulation of cell cycle process (GO:0010948)	65	19	3.69	+	5.15	1.86E-09	1.36E-07
Regulation of G2/M transition of mitotic cell cycle (GO:0010389)	24	7	1.36	+	5.14	2.74E-04	4.90E-03
Chromosome organization (GO:0051276)	143	41	8.11	+	5.05	1.85E-18	6.79E-16
Mitotic cell cycle (GO:0000278)	220	63	12.48	+	5.05	1.24E-27	1.36E-24
Double-strand break repair via homologous recombination (GO:0000724)	63	18	3.57	+	5.04	7.40E-09	5.09E-07
Regulation of cell cycle G2/M phase transition (GO:1902749)	28	8	1.59	+	5.04	1.17E-04	2.46E-03
Negative regulation of mitotic cell cycle phase transition (GO:1901991)	35	10	1.99	+	5.04	1.66E-05	4.68E-04
Mitotic spindle organization (GO:0007052)	35	10	1.99	+	5.04	1.66E-05	4.62E-04
Recombinational repair (GO:0000725)	64	18	3.63	+	4.96	9.75E-09	6.32E-07
DNA recombination (GO:0006310)	89	25	5.05	+	4.95	1.39E-11	1.80E-09

Anexos

Regulation of cell cycle process (GO:0010564)	139	39	7.88	+	4.95	2.87E-17	7.91E-15
Negative regulation of cell cycle phase transition (GO:1901988)	61	17	3.46	+	4.91	2.91E-08	1.83E-06
Regulation of chromosome segregation (GO:0051983)	29	8	1.65	+	4.86	1.54E-04	3.17E-03
Organelle fission (GO:0048285)	106	29	6.01	+	4.82	6.83E-13	1.07E-10
Microtubule cytoskeleton organization involved in mitosis (GO:1902850)	45	12	2.55	+	4.7	5.28E-06	1.76E-04
Regulation of mitotic sister chromatid separation (GO:0010965)	19	5	1.08	+	4.64	3.47E-03	3.66E-02
Sister chromatid cohesion (GO:0007062)	19	5	1.08	+	4.64	3.47E-03	3.64E-02
Regulation of cell cycle phase transition (GO:1901987)	92	24	5.22	+	4.6	1.94E-10	1.78E-08
Signal transduction in response to DNA damage (GO:0042770)	27	7	1.53	+	4.57	6.05E-04	9.39E-03
DNA damage checkpoint signaling (GO:0000077)	27	7	1.53	+	4.57	6.05E-04	9.32E-03
Meiotic chromosome segregation (GO:0045132)	31	8	1.76	+	4.55	2.56E-04	4.66E-03
Double-strand break repair (GO:0006302)	98	25	5.56	+	4.5	1.37E-10	1.32E-08
Protein depolymerization (GO:0051261)	24	6	1.36	+	4.41	1.83E-03	2.28E-02
Regulation of leukocyte migration (GO:0002685)	20	5	1.13	+	4.41	4.42E-03	4.40E-02
Negative regulation of cell cycle G2/M phase transition (GO:1902750)	20	5	1.13	+	4.41	4.42E-03	4.38E-02
Spindle organization (GO:0007051)	56	14	3.18	+	4.41	2.04E-06	7.89E-05
Cell cycle process (GO:0022402)	318	78	18.04	+	4.32	5.93E-29	1.31E-25
Mitotic cell cycle phase transition (GO:0044772)	45	11	2.55	+	4.31	3.18E-05	7.97E-04
Cell cycle phase transition (GO:0044770)	45	11	2.55	+	4.31	3.18E-05	7.88E-04
Positive regulation of cell migration (GO:0030335)	62	15	3.52	+	4.27	1.39E-06	5.47E-05
Positive regulation of cell cycle (GO:0045787)	29	7	1.65	+	4.26	9.63E-04	1.40E-02
Protein-DNA complex assembly (GO:0065004)	34	8	1.93	+	4.15	5.06E-04	8.26E-03
Regulation of protein serine/threonine kinase activity (GO:0071900)	56	13	3.18	+	4.09	1.14E-05	3.48E-04
Regulation of sister chromatid segregation (GO:0033045)	26	6	1.47	+	4.07	2.84E-03	3.18E-02
Neural crest cell migration (GO:0001755)	26	6	1.47	+	4.07	2.84E-03	3.16E-02
Negative regulation of mitotic cell cycle (GO:0045930)	57	13	3.23	+	4.02	1.40E-05	4.10E-04

Positive regulation of cell motility (GO:2000147)	66	15	3.74	+	4.01	3.24E-06	1.19E-04
Positive regulation of locomotion (GO:0040017)	66	15	3.74	+	4.01	3.24E-06	1.17E-04
Mesenchyme development (GO:0060485)	31	7	1.76	+	3.98	1.47E-03	1.91E-02
Regulation of mitotic cell cycle phase transition (GO:1901990)	62	14	3.52	+	3.98	7.43E-06	2.44E-04
Spindle assembly (GO:0051225)	31	7	1.76	+	3.98	1.47E-03	1.90E-02
Mesenchymal cell differentiation (GO:0048762)	31	7	1.76	+	3.98	1.47E-03	1.89E-02
Regulation of mitotic cell cycle (GO:0007346)	107	24	6.07	+	3.95	5.29E-09	3.76E-07
Regulation of cell cycle (GO:0051726)	210	47	11.91	+	3.95	2.99E-16	7.31E-14
Neural crest cell differentiation (GO:0014033)	27	6	1.53	+	3.92	3.48E-03	3.63E-02
Neural crest cell development (GO:0014032)	27	6	1.53	+	3.92	3.48E-03	3.62E-02
Stem cell development (GO:0048864)	27	6	1.53	+	3.92	3.48E-03	3.60E-02
Stem cell differentiation (GO:0048863)	27	6	1.53	+	3.92	3.48E-03	3.58E-02
Negative regulation of cell cycle (GO:0045786)	86	19	4.88	+	3.89	2.63E-07	1.29E-05
Meiotic nuclear division (GO:0140013)	50	11	2.84	+	3.88	9.03E-05	1.93E-03
Regulation of chemotaxis (GO:0050920)	32	7	1.82	+	3.86	1.79E-03	2.25E-02
Meiotic cell cycle process (GO:1903046)	61	13	3.46	+	3.76	3.03E-05	7.76E-04
DNA metabolic process (GO:0006259)	273	57	15.49	+	3.68	6.24E-18	1.96E-15
Cell cycle (GO:0007049)	410	85	23.26	+	3.65	6.08E-26	4.47E-23
Microtubule polymerization or depolymerization (GO:0031109)	34	7	1.93	+	3.63	2.59E-03	2.94E-02
Regulation of cell size (GO:0008361)	39	8	2.21	+	3.62	1.33E-03	1.78E-02
Meiosis I (GO:0007127)	39	8	2.21	+	3.62	1.33E-03	1.77E-02
Negative regulation of organelle organization (GO:0010639)	70	14	3.97	+	3.53	3.23E-05	7.91E-04
Meiosis I cell cycle process (GO:0061982)	40	8	2.27	+	3.53	1.59E-03	2.03E-02
Protein-containing complex disassembly (GO:0032984)	41	8	2.33	+	3.44	1.87E-03	2.29E-02
Organic hydroxy compound transport (GO:0015850)	48	9	2.72	+	3.31	1.33E-03	1.79E-02
DNA repair (GO:0006281)	182	34	10.32	+	3.29	6.94E-10	6.12E-08

Anexos

Negative regulation of cellular component organization (GO:0051129)	108	20	6.13	+	3.26	2.52E-06	9.56E-05
Response to wounding (GO:0009611)	38	7	2.16	+	3.25	4.99E-03	4.78E-02
DNA damage response (GO:0006974)	243	42	13.78	+	3.05	9.31E-11	9.77E-09
Regulation of chromosome organization (GO:0033044)	47	8	2.67	+	3	4.57E-03	4.49E-02
Regulation of protein kinase activity (GO:0045859)	100	17	5.67	+	3	4.43E-05	1.06E-03
Inorganic anion transport (GO:0015698)	65	10	3.69	+	2.71	3.45E-03	3.65E-02
Regulation of cell migration (GO:0030334)	117	18	6.64	+	2.71	1.04E-04	2.19E-03
Regulation of kinase activity (GO:0043549)	150	23	8.51	+	2.7	1.28E-05	3.85E-04
Negative regulation of multicellular organismal process (GO:0051241)	74	11	4.2	+	2.62	2.91E-03	3.23E-02
Regulation of cellular component size (GO:0032535)	101	15	5.73	+	2.62	5.59E-04	8.80E-03
Nucleobase-containing compound transport (GO:0015931)	81	12	4.59	+	2.61	1.98E-03	2.40E-02
Regulation of transferase activity (GO:0051338)	156	23	8.85	+	2.6	2.44E-05	6.33E-04
Regulation of cell motility (GO:2000145)	124	18	7.03	+	2.56	2.20E-04	4.14E-03
Regulation of locomotion (GO:0040012)	124	18	7.03	+	2.56	2.20E-04	4.11E-03
Regulation of anatomical structure size (GO:0090066)	118	17	6.69	+	2.54	3.56E-04	6.08E-03
Small gtpase mediated signal transduction (GO:0007264)	94	13	5.33	+	2.44	2.46E-03	2.84E-02
Axon guidance (GO:0007411)	102	14	5.79	+	2.42	1.84E-03	2.28E-02
Neuron projection guidance (GO:0097485)	102	14	5.79	+	2.42	1.84E-03	2.26E-02
Potassium ion transmembrane transport (GO:0071805)	118	16	6.69	+	2.39	1.03E-03	1.49E-02
Potassium ion transport (GO:0006813)	118	16	6.69	+	2.39	1.03E-03	1.48E-02
Peptidyl-serine modification (GO:0018209)	96	13	5.45	+	2.39	2.97E-03	3.27E-02
Regulation of organelle organization (GO:0033043)	258	34	14.64	+	2.32	4.44E-06	1.55E-04
Microtubule-based movement (GO:0007018)	164	21	9.3	+	2.26	4.72E-04	7.76E-03
Microtubule cytoskeleton organization (GO:0000226)	250	32	14.18	+	2.26	2.13E-05	5.59E-04
Cellular response to stress (GO:0033554)	418	52	23.71	+	2.19	9.59E-08	5.03E-06
Negative regulation of response to stimulus (GO:0048585)	274	34	15.54	+	2.19	1.72E-05	4.69E-04

Microtubule-based process (GO:0007017)	389	48	22.07	+	2.18	3.87E-07	1.81E-05
Regulation of anatomical structure morphogenesis (GO:0022603)	124	15	7.03	+	2.13	5.17E-03	4.91E-02
Regulation of protein phosphorylation (GO:0001932)	173	20	9.81	+	2.04	2.42E-03	2.81E-02
Inorganic cation transmembrane transport (GO:0098662)	273	31	15.49	+	2	2.87E-04	5.10E-03
Nucleobase-containing small molecule metabolic process (GO:0055086)	185	21	10.49	+	2	2.17E-03	2.56E-02
Regulation of phosphorylation (GO:0042325)	224	25	12.71	+	1.97	1.18E-03	1.61E-02
Regulation of cellular component organization (GO:0051128)	416	46	23.6	+	1.95	1.45E-05	4.20E-04
Monoatomic ion transmembrane transport (GO:0034220)	331	36	18.78	+	1.92	1.73E-04	3.53E-03
Inorganic ion transmembrane transport (GO:0098660)	314	34	17.81	+	1.91	3.01E-04	5.31E-03
Monoatomic cation transmembrane transport (GO:0098655)	279	30	15.83	+	1.9	9.29E-04	1.36E-02
Negative regulation of signal transduction (GO:0009968)	214	23	12.14	+	1.89	4.09E-03	4.12E-02
Chemical homeostasis (GO:0048878)	214	23	12.14	+	1.89	4.09E-03	4.10E-02
Positive regulation of catalytic activity (GO:0043085)	242	26	13.73	+	1.89	1.79E-03	2.25E-02
Intracellular signal transduction (GO:0035556)	510	54	28.93	+	1.87	1.02E-05	3.25E-04
Import into cell (GO:0098657)	246	26	13.95	+	1.86	2.08E-03	2.50E-02
Negative regulation of cell communication (GO:0010648)	218	23	12.37	+	1.86	4.48E-03	4.42E-02
Regulation of phosphorus metabolic process (GO:0051174)	247	26	14.01	+	1.86	2.16E-03	2.57E-02
Regulation of phosphate metabolic process (GO:0019220)	247	26	14.01	+	1.86	2.16E-03	2.56E-02
Negative regulation of signaling (GO:0023057)	219	23	12.42	+	1.85	4.60E-03	4.51E-02
Response to stress (GO:0006950)	816	85	46.29	+	1.84	7.08E-08	3.80E-06
Homeostatic process (GO:0042592)	250	26	14.18	+	1.83	3.36E-03	3.58E-02
Positive regulation of molecular function (GO:0044093)	304	31	17.24	+	1.8	1.59E-03	2.02E-02
Transmembrane transport (GO:0055085)	522	53	29.61	+	1.79	4.69E-05	1.11E-03
Cytoskeleton organization (GO:0007010)	593	60	33.64	+	1.78	1.31E-05	3.90E-04
Metal ion transport (GO:0030001)	311	31	17.64	+	1.76	2.69E-03	3.04E-02
Regulation of catalytic activity (GO:0050790)	447	44	25.36	+	1.74	3.89E-04	6.49E-03

Anexos

Monoatomic ion transport (GO:0006811)	404	39	22.92	+	1.7	1.47E-03	1.93E-02
Negative regulation of cellular process (GO:0048523)	964	93	54.68	+	1.7	4.95E-07	2.14E-05
Monoatomic cation transport (GO:0006812)	336	32	19.06	+	1.68	4.05E-03	4.11E-02
Organelle organization (GO:0006996)	1306	118	74.08	+	1.59	4.89E-07	2.16E-05
Regulation of molecular function (GO:0065009)	581	52	32.96	+	1.58	1.35E-03	1.79E-02
Nucleobase-containing compound metabolic process (GO:0006139)	1073	95	60.87	+	1.56	1.79E-05	4.81E-04
Heterocycle metabolic process (GO:0046483)	1123	99	63.7	+	1.55	1.12E-05	3.48E-04
Cell surface receptor signaling pathway (GO:0007166)	661	58	37.5	+	1.55	1.09E-03	1.53E-02
Negative regulation of biological process (GO:0048519)	1174	103	66.6	+	1.55	9.31E-06	3.02E-04
Cellular aromatic compound metabolic process (GO:0006725)	1135	99	64.38	+	1.54	1.71E-05	4.70E-04
Organic cyclic compound metabolic process (GO:1901360)	1224	105	69.43	+	1.51	1.90E-05	5.05E-04
Small molecule metabolic process (GO:0044281)	708	60	40.16	+	1.49	2.12E-03	2.54E-02
Cellular component organization (GO:0016043)	2110	176	119.69	+	1.47	1.36E-07	6.81E-06
Nucleic acid metabolic process (GO:0090304)	888	74	50.37	+	1.47	8.38E-04	1.25E-02
Regulation of response to stimulus (GO:0048583)	900	75	51.05	+	1.47	8.80E-04	1.30E-02
Cellular component organization or biogenesis (GO:0071840)	2233	182	126.67	+	1.44	3.67E-07	1.76E-05
Cellular nitrogen compound metabolic process (GO:0034641)	1286	102	72.95	+	1.4	6.06E-04	9.28E-03
Cellular response to stimulus (GO:0051716)	2642	203	149.87	+	1.35	4.57E-06	1.55E-04
Signal transduction (GO:0007165)	2121	154	120.32	+	1.28	1.30E-03	1.77E-02
Cellular metabolic process (GO:0044237)	2533	183	143.69	+	1.27	5.09E-04	8.25E-03
Localization (GO:0051179)	1911	138	108.4	+	1.27	3.13E-03	3.43E-02
Signaling (GO:0023052)	2267	163	128.6	+	1.27	1.31E-03	1.77E-02
Cellular process (GO:0009987)	8229	585	466.8	+	1.25	2.38E-12	3.27E-10
Cell communication (GO:0007154)	2307	164	130.87	+	1.25	2.29E-03	2.69E-02
Biological_process (GO:0008150)	12919	796	732.84	+	1.09	1.88E-04	3.77E-03
Unclassified (UNCLASSIFIED)	9064	451	514.16	-	0.88	1.88E-04	3.80E-03

Regulation of gene expression (GO:0010468)	2311	102	131.09	-	0.78	5.00E-03	4.77E-02
Regulation of RNA metabolic process (GO:0051252)	2033	87	115.32	-	0.75	4.06E-03	4.11E-02
Regulation of DNA-templated transcription (GO:0006355)	1880	80	106.64	-	0.75	4.81E-03	4.69E-02
Regulation of RNA biosynthetic process (GO:2001141)	1881	80	106.7	-	0.75	4.82E-03	4.68E-02
Regulation of macromolecule biosynthetic process (GO:0010556)	1999	84	113.39	-	0.74	2.32E-03	2.70E-02
Immune system process (GO:0002376)	835	26	47.37	-	0.55	5.73E-04	8.95E-03
RNA metabolic process (GO:0016070)	627	19	35.57	-	0.53	2.74E-03	3.08E-02
Gene expression (GO:0010467)	895	20	50.77	-	0.39	6.04E-07	2.56E-05
Immune response (GO:0006955)	658	12	37.33	-	0.32	1.24E-06	4.97E-05
System process (GO:0003008)	704	11	39.93	-	0.28	4.78E-08	2.63E-06
Adaptive immune response (GO:0002250)	203	2	11.52	-	0.17	1.13E-03	1.57E-02
Detection of stimulus (GO:0051606)	308	3	17.47	-	0.17	3.13E-05	7.94E-04
Nervous system process (GO:0050877)	619	6	35.11	-	0.17	1.01E-09	7.71E-08
Translation (GO:0006412)	169	1	9.59	-	0.1	1.17E-03	1.61E-02
Peptide biosynthetic process (GO:0043043)	172	1	9.76	-	0.1	7.80E-04	1.17E-02
B cell mediated immunity (GO:0019724)	189	1	10.72	-	0.09	3.76E-04	6.37E-03
Immunoglobulin mediated immune response (GO:0016064)	189	1	10.72	-	0.09	3.76E-04	6.32E-03
Lymphocyte mediated immunity (GO:0002449)	194	1	11	-	0.09	2.54E-04	4.70E-03
Adaptive immune response based on somatic recombination of immune receptors built from immunoglobulin superfamily domains (GO:0002460)	195	1	11.06	-	0.09	2.56E-04	4.69E-03
Leukocyte mediated immunity (GO:0002443)	196	1	11.12	-	0.09	2.58E-04	4.67E-03
Sensory perception of chemical stimulus (GO:0007606)	491	1	27.85	-	0.04	1.60E-11	1.95E-09
Sensory perception (GO:0007600)	537	1	30.46	-	0.03	9.79E-13	1.44E-10
Production of molecular mediator of immune response (GO:0002440)	179	0	10.15	-	< 0.01	5.59E-05	1.24E-03
Immunoglobulin production (GO:0002377)	177	0	10.04	-	< 0.01	5.44E-05	1.22E-03

8.2 Anexo 2. Tabla 2. Genes sobreexpresados indican alteraciones en procesos biológicos a nivel de la inmunidad.

Analysis Type: PANTHER Overrepresentation Test (Released 20240226)
Annotation Version and Release Date: PANTHER version 18.0 Released 2023-08-01
Analyzed List: Con valores incrementados asma vs c.txt (Mus musculus)
Reference List: Mus musculus (all genes in database)
Test Type: FISHER
Correction: FDR

PANTHER GO-Slim Biological Process	Mus musculus - REFLIST (21983)	Con valores incrementados asma vs c.txt (629)	Con valores incrementados asma vs c.txt (expected)	Con valores incrementados asma vs c.txt (over/under)	Con valores incrementados asma vs c.txt (fold Enrichment)	Con valores incrementados asma vs c.txt (raw P-value)	Con valores incrementados asma vs c.txt (FDR)
Toll-like receptor 4 signaling pathway (GO:0034142)	7	3	0.2	+	14.98	7.49E-04	2.84E-02
Epidermal growth factor receptor signaling pathway (GO:0007173)	13	4	0.37	+	10.75	3.86E-04	1.89E-02
Defense response to virus (GO:0051607)	39	12	1.12	+	10.75	5.24E-10	1.15E-06
Response to virus (GO:0009615)	39	12	1.12	+	10.75	5.24E-10	5.77E-07
ERBB signaling pathway (GO:0038127)	14	4	0.4	+	9.99	5.29E-04	2.33E-02
Carbohydrate derivative transport (GO:1901264)	18	5	0.52	+	9.71	1.19E-04	9.01E-03

Regulation of leukocyte migration (GO:0002685)	20	5	0.57	+	8.74	2.05E-04	1.19E-02
Positive regulation of leukocyte migration (GO:0002687)	17	4	0.49	+	8.22	1.17E-03	4.24E-02
Retinol metabolic process (GO:0042572)	17	4	0.49	+	8.22	1.17E-03	4.17E-02
Barbed-end actin filament capping (GO:0051016)	18	4	0.52	+	7.77	1.48E-03	4.92E-02
Organic hydroxy compound transport (GO:0015850)	48	8	1.37	+	5.82	5.90E-05	5.42E-03
Positive regulation of cell migration (GO:0030335)	62	9	1.77	+	5.07	6.36E-05	5.61E-03
Positive regulation of cell motility (GO:2000147)	66	9	1.89	+	4.77	1.05E-04	8.56E-03
Positive regulation of locomotion (GO:0040017)	66	9	1.89	+	4.77	1.05E-04	8.25E-03
Response to peptide hormone (GO:0043434)	52	7	1.49	+	4.7	6.64E-04	2.76E-02
Response to peptide (GO:1901652)	53	7	1.52	+	4.62	7.47E-04	2.89E-02
Protein localization to plasma membrane (GO:0072659)	64	8	1.83	+	4.37	4.64E-04	2.17E-02
Positive regulation of cell population proliferation (GO:0008284)	121	15	3.46	+	4.33	1.96E-06	2.88E-04
Response to lipid (GO:0033993)	120	13	3.43	+	3.79	4.04E-05	3.87E-03
Protein localization to cell periphery (GO:1990778)	74	8	2.12	+	3.78	1.23E-03	4.30E-02
Regulation of cell migration (GO:0030334)	117	12	3.35	+	3.58	1.35E-04	9.00E-03
Regulation of cell motility (GO:2000145)	124	12	3.55	+	3.38	2.34E-04	1.29E-02
Regulation of locomotion (GO:0040012)	124	12	3.55	+	3.38	2.34E-04	1.26E-02
Response to oxygen-containing compound (GO:1901700)	255	24	7.3	+	3.29	3.65E-07	2.01E-04
Regulation of anatomical structure size (GO:0090066)	118	11	3.38	+	3.26	5.80E-04	2.50E-02
Regulation of cell population proliferation (GO:0042127)	185	17	5.29	+	3.21	2.48E-05	2.73E-03
Response to external biotic stimulus (GO:0043207)	301	26	8.61	+	3.02	6.36E-07	2.80E-04
Response to other organism (GO:0051707)	301	26	8.61	+	3.02	6.36E-07	2.34E-04
Biological process involved in interspecies interaction between organisms (GO:0044419)	303	26	8.67	+	3	7.22E-07	1.99E-04
Defense response (GO:0006952)	321	27	9.18	+	2.94	6.55E-07	2.06E-04
Response to biotic stimulus (GO:0009607)	310	26	8.87	+	2.93	1.11E-06	2.04E-04

Anexos

Defense response to other organism (GO:0098542)	246	20	7.04	+	2.84	2.97E-05	3.12E-03
Cellular response to oxygen-containing compound (GO:1901701)	202	16	5.78	+	2.77	2.44E-04	1.28E-02
Positive regulation of immune system process (GO:0002684)	232	18	6.64	+	2.71	1.33E-04	9.16E-03
Positive regulation of immune response (GO:0050778)	181	14	5.18	+	2.7	7.41E-04	2.91E-02
Response to endogenous stimulus (GO:0009719)	274	19	7.84	+	2.42	3.71E-04	1.86E-02
Positive regulation of molecular function (GO:0044093)	304	21	8.7	+	2.41	1.96E-04	1.20E-02
Regulation of immune system process (GO:0002682)	294	20	8.41	+	2.38	5.22E-04	2.35E-02
Response to external stimulus (GO:0009605)	560	38	16.02	+	2.37	9.85E-07	1.97E-04
Response to organic substance (GO:0010033)	490	32	14.02	+	2.28	2.33E-05	2.70E-03
Organic acid metabolic process (GO:0006082)	428	27	12.25	+	2.2	1.67E-04	1.05E-02
Small molecule metabolic process (GO:0044281)	708	44	20.26	+	2.17	1.58E-06	2.49E-04
Positive regulation of response to stimulus (GO:0048584)	451	28	12.9	+	2.17	1.43E-04	9.25E-03
Regulation of catalytic activity (GO:0050790)	447	27	12.79	+	2.11	2.68E-04	1.37E-02
Cellular response to chemical stimulus (GO:0070887)	516	31	14.76	+	2.1	1.29E-04	9.49E-03
Regulation of molecular function (GO:0065009)	581	33	16.62	+	1.99	2.01E-04	1.20E-02
Transmembrane transport (GO:0055085)	522	29	14.94	+	1.94	7.35E-04	2.95E-02
Regulation of response to stimulus (GO:0048583)	900	48	25.75	+	1.86	3.59E-05	3.60E-03
Regulation of biological quality (GO:0065008)	742	38	21.23	+	1.79	6.66E-04	2.72E-02
Positive regulation of biological process (GO:0048518)	1384	68	39.6	+	1.72	1.26E-05	1.54E-03
Regulation of gene expression (GO:0010468)	2311	42	66.12	-	0.64	9.47E-04	3.48E-02
Regulation of RNA metabolic process (GO:0051252)	2033	36	58.17	-	0.62	1.28E-03	4.40E-02
Regulation of nucleobase-containing compound metabolic process (GO:0019219)	2098	37	60.03	-	0.62	9.26E-04	3.46E-02
Regulation of macromolecule biosynthetic process (GO:0010556)	1999	33	57.2	-	0.58	4.08E-04	1.95E-02
Regulation of DNA-templated transcription (GO:0006355)	1880	31	53.79	-	0.58	6.35E-04	2.69E-02
Regulation of RNA biosynthetic process (GO:2001141)	1881	31	53.82	-	0.58	5.01E-04	2.30E-02
Macromolecule metabolic process (GO:0043170)	2839	46	81.23	-	0.57	7.27E-06	9.42E-04

Cellular nitrogen compound metabolic process (GO:0034641)	1286	19	36.8	-	0.52	1.34E-03	4.53E-02
System process (GO:0003008)	704	5	20.14	-	0.25	7.79E-05	6.60E-03
RNA metabolic process (GO:0016070)	627	4	17.94	-	0.22	1.30E-04	9.22E-03
Nucleic acid metabolic process (GO:0090304)	888	5	25.41	-	0.2	9.44E-07	2.31E-04
Gene expression (GO:0010467)	895	5	25.61	-	0.2	9.63E-07	2.12E-04
Nervous system process (GO:0050877)	619	2	17.71	-	0.11	3.97E-06	5.47E-04
RNA processing (GO:0006396)	402	1	11.5	-	0.09	2.06E-04	1.16E-02
Sensory perception of chemical stimulus (GO:0007606)	491	0	14.05	-	< 0.01	1.35E-06	2.29E-04
Sensory perception (GO:0007600)	537	0	15.37	-	< 0.01	2.56E-07	1.88E-04

8.3 Anexo 3. Tabla 3. Genes inhibidos indican alteraciones en procesos biológicos a nivel de la división celular.

Analysis Type: PANTHER Overrepresentation Test (Released 20240226)
Annotation Version and Release Date: GO Ontology database DOI: 10.5281/zenodo.10536401 Released 2024-01-17
Analyzed List: Inhibidos asma vs c.txt (Mus musculus) / There are duplicate IDs in the file. The unique set of IDs will be used.
Reference List: Mus musculus (all genes in database)
Test Type: FISHER
Correction: FDR

GO molecular function complete	Mus musculus - REFLIST (21983)	Inhibidos asma vs c.txt (724)	Inhibidos asma vs c.txt (expected)	Inhibidos asma vs c.txt (over/under)	Inhibidos asma vs c.txt (fold Enrichment)	Inhibidos asma vs c.txt (raw P-value)	Inhibidos asma vs c.txt (FDR)
DNA replication origin binding (GO:0003688)	15	9	0.49	+	18.22	1.82E-10	3.50E-08
DNA translocase activity (GO:0015616)	5	3	0.16	+	18.22	3.39E-04	2.45E-02
5'-3' DNA helicase activity (GO:0043139)	9	5	0.3	+	16.87	4.31E-06	4.69E-04
Single-stranded DNA helicase activity (GO:0017116)	23	12	0.76	+	15.84	1.44E-12	4.51E-10
Four-way junction helicase activity (GO:0009378)	6	3	0.2	+	15.18	6.60E-04	4.46E-02

Kinetochore binding (GO:0043515)	6	3	0.2	+	15.18	6.60E-04	4.40E-02
Bubble DNA binding (GO:0000405)	6	3	0.2	+	15.18	6.60E-04	4.35E-02
3'-5' DNA helicase activity (GO:0043138)	16	7	0.53	+	13.28	3.60E-07	4.51E-05
Anaphase-promoting complex binding (GO:0010997)	10	4	0.33	+	12.15	2.09E-04	1.58E-02
Histone kinase activity (GO:0035173)	27	10	0.89	+	11.25	7.17E-09	1.16E-06
Pyrimidine nucleotide binding (GO:0019103)	11	4	0.36	+	11.04	3.20E-04	2.35E-02
DNA helicase activity (GO:0003678)	56	19	1.84	+	10.3	7.35E-15	3.67E-12
DNA N-glycosylase activity (GO:0019104)	12	4	0.4	+	10.12	4.68E-04	3.29E-02
Histone H3 kinase activity (GO:0140996)	12	4	0.4	+	10.12	4.68E-04	3.25E-02
Plus-end-directed microtubule motor activity (GO:0008574)	15	5	0.49	+	10.12	8.72E-05	7.27E-03
Microtubule motor activity (GO:0003777)	65	18	2.14	+	8.41	1.97E-12	5.80E-10
Structural constituent of nuclear pore (GO:0017056)	22	6	0.72	+	8.28	5.94E-05	5.03E-03
ATP-dependent activity, acting on DNA (GO:0008094)	117	27	3.85	+	7.01	8.81E-16	8.81E-13
DNA secondary structure binding (GO:0000217)	37	8	1.22	+	6.57	2.20E-05	2.00E-03
DNA polymerase activity (GO:0034061)	29	6	0.96	+	6.28	3.10E-04	2.32E-02
DNA endonuclease activity (GO:0004520)	41	8	1.35	+	5.92	4.86E-05	4.19E-03
Catalytic activity, acting on DNA (GO:0140097)	236	44	7.77	+	5.66	5.86E-21	2.93E-17
DNA nuclease activity (GO:0004536)	64	11	2.11	+	5.22	6.95E-06	7.09E-04
4 iron, 4 sulfur cluster binding (GO:0051539)	41	7	1.35	+	5.18	3.46E-04	2.47E-02
Cyclin-dependent protein serine/threonine kinase regulator activity (GO:0016538)	47	8	1.55	+	5.17	1.34E-04	1.07E-02
Cytoskeletal motor activity (GO:0003774)	110	18	3.62	+	4.97	1.97E-08	2.90E-06
Single-stranded DNA binding (GO:0003697)	123	20	4.05	+	4.94	3.63E-09	6.05E-07
Microtubule binding (GO:0008017)	274	43	9.02	+	4.77	1.43E-17	3.57E-14
Helicase activity (GO:0004386)	150	23	4.94	+	4.66	8.15E-10	1.51E-07
Carbon-oxygen lyase activity (GO:0016835)	76	11	2.5	+	4.39	3.74E-05	3.34E-03

Anexos

Tubulin binding (GO:0015631)	391	48	12.88	+	3.73	4.09E-15	2.92E-12
Damaged DNA binding (GO:0003684)	74	9	2.44	+	3.69	7.09E-04	4.60E-02
Endonuclease activity (GO:0004519)	120	14	3.95	+	3.54	4.15E-05	3.64E-03
ATP-dependent activity (GO:0140657)	577	62	19	+	3.26	2.35E-16	3.92E-13
ATP hydrolysis activity (GO:0016887)	314	32	10.34	+	3.09	1.73E-08	2.62E-06
Catalytic activity, acting on a nucleic acid (GO:0140640)	584	55	19.23	+	2.86	2.78E-12	7.73E-10
Nuclease activity (GO:0004518)	205	18	6.75	+	2.67	1.60E-04	1.25E-02
ATP binding (GO:0005524)	1413	106	46.54	+	2.28	1.16E-15	9.70E-13
Adenyl ribonucleotide binding (GO:0032559)	1484	108	48.87	+	2.21	5.72E-15	3.57E-12
Protein kinase activity (GO:0004672)	581	41	19.13	+	2.14	5.00E-06	5.32E-04
Adenyl nucleotide binding (GO:0030554)	1593	112	52.46	+	2.13	1.56E-14	7.11E-12
Cytoskeletal protein binding (GO:0008092)	1026	72	33.79	+	2.13	1.51E-09	2.61E-07
Protein serine/threonine kinase activity (GO:0004674)	443	31	14.59	+	2.12	1.16E-04	9.50E-03
Transferase activity, transferring phosphorus-containing groups (GO:0016772)	892	59	29.38	+	2.01	4.03E-07	4.92E-05
Phosphotransferase activity, alcohol group as acceptor (GO:0016773)	684	45	22.53	+	2	1.56E-05	1.45E-03
Kinase activity (GO:0016301)	735	48	24.21	+	1.98	7.24E-06	7.24E-04
Purine ribonucleoside triphosphate binding (GO:0035639)	1741	112	57.34	+	1.95	5.35E-12	1.34E-09
Nucleoside phosphate binding (GO:1901265)	2088	134	68.77	+	1.95	2.98E-14	1.15E-11
Nucleotide binding (GO:0000166)	2088	134	68.77	+	1.95	2.98E-14	1.07E-11
Kinase binding (GO:0019900)	898	57	29.58	+	1.93	2.18E-06	2.48E-04
Protein kinase binding (GO:0019901)	805	51	26.51	+	1.92	1.12E-05	1.05E-03
Heterocyclic compound binding (GO:1901363)	2233	141	73.54	+	1.92	2.32E-14	9.67E-12
Ribonucleotide binding (GO:0032553)	1840	116	60.6	+	1.91	7.38E-12	1.76E-09
Purine ribonucleotide binding (GO:0032555)	1822	114	60.01	+	1.9	2.37E-11	4.94E-09
Purine nucleotide binding (GO:0017076)	1932	119	63.63	+	1.87	2.04E-11	4.43E-09
Chromatin binding (GO:0003682)	696	42	22.92	+	1.83	2.00E-04	1.54E-02

Carbohydrate derivative binding (GO:0097367)	2205	133	72.62	+	1.83	3.82E-12	1.01E-09
Anion binding (GO:0043168)	2384	128	78.52	+	1.63	2.46E-08	3.23E-06
DNA binding (GO:0003677)	2308	122	76.01	+	1.6	1.29E-07	1.66E-05
Identical protein binding (GO:0042802)	2430	122	80.03	+	1.52	1.73E-06	2.02E-04
Enzyme binding (GO:0019899)	2369	117	78.02	+	1.5	7.72E-06	7.43E-04
Organic cyclic compound binding (GO:0097159)	5485	262	180.65	+	1.45	9.62E-12	2.19E-09
Protein-containing complex binding (GO:0044877)	2160	103	71.14	+	1.45	1.30E-04	1.05E-02
Nucleic acid binding (GO:0003676)	3387	159	111.55	+	1.43	2.23E-06	2.48E-04
Small molecule binding (GO:0036094)	5635	263	185.59	+	1.42	1.18E-10	2.36E-08
Ion binding (GO:0043167)	5415	251	178.34	+	1.41	8.91E-10	1.59E-07
Metal ion binding (GO:0046872)	3665	167	120.71	+	1.38	7.53E-06	7.38E-04
Cation binding (GO:0043169)	3765	171	124	+	1.38	5.93E-06	6.17E-04
Hydrolase activity (GO:0016787)	2392	108	78.78	+	1.37	6.57E-04	4.50E-02
Protein binding (GO:0005515)	9535	417	314.03	+	1.33	6.69E-15	3.72E-12
Catalytic activity (GO:0003824)	5586	243	183.97	+	1.32	6.89E-07	8.21E-05
Binding (GO:0005488)	14170	566	466.68	+	1.21	4.94E-16	6.18E-13
Molecular transducer activity (GO:0060089)	2421	37	79.73	-	0.46	2.19E-08	3.14E-06
Signaling receptor activity (GO:0038023)	2421	37	79.73	-	0.46	2.19E-08	3.05E-06
Transmembrane signaling receptor activity (GO:0004888)	2205	31	72.62	-	0.43	1.11E-08	1.73E-06
Olfactory receptor activity (GO:0004984)	1169	3	38.5	-	0.08	8.76E-14	2.92E-11
Odorant binding (GO:0005549)	535	0	17.62	-	< 0.01	2.31E-08	3.12E-06

8.4 Anexo 4. Tabla 4. Genes inhibidos en organoides de yeyuno de ratón por heces de niños alérgicos en comparación con las de niños sanos. Los resultados indican alteraciones en el reactoma a nivel de la glucólisis y el metabolismo lipídico.

Analysis Type: PANTHER Overrepresentation Test (Released 20240226)
Annotation Version and Release Date: Reactome version 85 Released 2023-05-25
Analyzed List: Inhibidos asma vs c.txt (Mus musculus) / There are duplicate IDs in the file. The unique set of IDs will be used.
Reference List: con valores todos asma vs c.txt (Mus musculus)
Test Type: FISHER
Correction: FDR

Reactome pathways	Con valores todos asma vs c.txt - REFLIST (1352)	Inhibidos asma vs c.txt (724)	Inhibidos asma vs c.txt (expected)	Inhibidos asma vs c.txt (over/under)	Inhibidos asma vs c.txt (fold Enrichment)	Inhibidos asma vs c.txt (raw P-value)	Inhibidos asma vs c.txt (FDR)
Mitotic spindle checkpoint (r-mmu-69618)	35	35	18.74	+	1.87	2.74E-10	5.25E-08

Amplification of signal from unattached kinetochores via a MAD2 inhibitory signal (R-MMU-141444)	35	35	18.74	+	1.87	2.74E-10	4.50E-08
Amplification of signal from the kinetochores (R-MMU-141424)	35	35	18.74	+	1.87	2.74E-10	3.94E-08
Presynaptic phase of homologous DNA pairing and strand exchange (R-MMU-5693616)	11	11	5.89	+	1.87	1.21E-03	2.62E-02
Activation of the pre-replicative complex (R-MMU-68962)	16	16	8.57	+	1.87	4.65E-05	1.78E-03
Activation of ATR in response to replication stress (R-MMU-176187)	15	15	8.03	+	1.87	8.90E-05	3.10E-03
Glycolysis (R-MMU-70171)	12	12	6.43	+	1.87	6.28E-04	1.53E-02
Processing of DNA double-strand break ends (R-MMU-5693607)	14	14	7.5	+	1.87	1.70E-04	5.44E-03
Nuclear envelope breakdown (r-mmu-2980766)	10	10	5.36	+	1.87	2.33E-03	4.39E-02
Telomere maintenance (r-mmu-157579)	14	14	7.5	+	1.87	1.70E-04	5.29E-03
Sumoylation of DNA replication proteins (R-MMU-4615885)	10	10	5.36	+	1.87	2.33E-03	4.32E-02
Homologous DNA Pairing and Strand Exchange (R-MMU-5693579)	14	14	7.5	+	1.87	1.70E-04	5.15E-03
Resolution of D-loop Structures through Holliday Junction Intermediates (R-MMU-5693568)	14	14	7.5	+	1.87	1.70E-04	5.02E-03
Resolution of D-Loop Structures (R-MMU-5693537)	14	14	7.5	+	1.87	1.70E-04	4.89E-03
Extension of Telomeres (R-MMU-180786)	14	14	7.5	+	1.87	1.70E-04	4.77E-03
Resolution of Sister Chromatid Cohesion (R-MMU-2500257)	39	38	20.88	+	1.82	6.57E-10	7.54E-08
EML4 and NUDC in mitotic spindle formation (R-MMU-9648025)	36	35	19.28	+	1.82	4.42E-09	3.90E-07
Cell cycle checkpoints (r-mmu-69620)	69	67	36.95	+	1.81	1.41E-16	5.38E-14
Dna double-strand break repair (r-mmu-5693532)	28	27	14.99	+	1.8	7.19E-07	4.59E-05
Mitotic prometaphase (r-mmu-68877)	52	50	27.85	+	1.8	4.95E-12	1.14E-09
Chromosome maintenance (r-mmu-73886)	26	25	13.92	+	1.8	2.57E-06	1.55E-04
Homology directed repair (r-mmu-5693538)	26	25	13.92	+	1.8	2.57E-06	1.48E-04
Dna replication (r-mmu-69306)	26	25	13.92	+	1.8	2.57E-06	1.41E-04
S phase (r-mmu-69242)	25	24	13.39	+	1.79	4.87E-06	2.43E-04
HDR through Homologous Recombination (HRR) or Single Strand Annealing (SSA) (R-MMU-5693567)	24	23	12.85	+	1.79	9.20E-06	4.06E-04

Anexos

Mitotic Metaphase and Anaphase (R-MMU-2555396)	45	43	24.1	+	1.78	4.47E-10	5.70E-08
Mitotic anaphase (r-mmu-68882)	44	42	23.56	+	1.78	8.52E-10	8.89E-08
Synthesis of DNA (R-MMU-69239)	22	21	11.78	+	1.78	3.29E-05	1.40E-03
G1/s transition (r-mmu-69206)	22	21	11.78	+	1.78	3.29E-05	1.35E-03
Dna repair (r-mmu-73894)	43	41	23.03	+	1.78	1.62E-09	1.55E-07
Separation of Sister Chromatids (R-MMU-2467813)	39	37	20.88	+	1.77	2.14E-08	1.64E-06
HDR through Homologous Recombination (HRR) (R-MMU-5685942)	18	17	9.64	+	1.76	2.22E-04	6.05E-03
Cell cycle (r-mmu-1640170)	120	113	64.26	+	1.76	2.39E-24	2.75E-21
Dna replication pre-initiation (r-mmu-69002)	17	16	9.1	+	1.76	4.01E-04	1.05E-02
Cell cycle. mitotic (r-mmu-69278)	101	95	54.09	+	1.76	2.66E-20	1.53E-17
Anchoring of the basal body to the plasma membrane (R-MMU-5620912)	16	15	8.57	+	1.75	7.26E-04	1.67E-02
M phase (r-mmu-68886)	64	60	34.27	+	1.75	9.06E-13	2.60E-10
AURKA Activation by TPX2 (R-MMU-8854518)	16	15	8.57	+	1.75	7.26E-04	1.63E-02
G2/m checkpoints (r-mmu-69481)	29	27	15.53	+	1.74	4.80E-06	2.51E-04
G2/M DNA damage checkpoint (R-MMU-69473)	14	13	7.5	+	1.73	2.36E-03	4.30E-02
Switching of origins to a post-replicative state (R-MMU-69052)	14	13	7.5	+	1.73	2.36E-03	4.24E-02
RHO gtpases Activate Formins (R-MMU-5663220)	41	38	21.96	+	1.73	6.41E-08	4.60E-06
Mitotic G1 phase and G1/S transition (R-MMU-453279)	24	22	12.85	+	1.71	9.38E-05	3.17E-03
Golgi-to-ER retrograde transport (R-MMU-8856688)	20	18	10.71	+	1.68	9.68E-04	2.14E-02
Transcriptional Regulation by TP53 (R-MMU-3700989)	32	28	17.14	+	1.63	5.07E-05	1.88E-03
Regulation of TP53 Activity (R-MMU-5633007)	24	21	12.85	+	1.63	6.38E-04	1.52E-02
RHO gtpase Effectors (R-MMU-195258)	52	45	27.85	+	1.62	5.42E-07	3.66E-05
Intra-Golgi and retrograde Golgi-to-ER traffic (R-MMU-6811442)	22	19	11.78	+	1.61	1.87E-03	3.91E-02
Regulation of TP53 Activity through Phosphorylation (R-MMU-6804756)	22	19	11.78	+	1.61	1.87E-03	3.84E-02
Metabolism of RNA (R-MMU-8953854)	22	19	11.78	+	1.61	1.87E-03	3.77E-02
Mitotic G2-G2/M phases (R-MMU-453274)	28	24	14.99	+	1.6	4.16E-04	1.06E-02

G2/m transition (r-mmu-69275)	27	23	14.46	+	1.59	6.97E-04	1.63E-02
Gene expression (Transcription) (R-MMU-74160)	77	65	41.23	+	1.58	5.96E-09	4.89E-07
Rna polymerase ii transcription (r-mmu-73857)	63	51	33.74	+	1.51	6.55E-06	3.13E-04
Generic transcription pathway (r-mmu-212436)	63	51	33.74	+	1.51	6.55E-06	3.01E-04
Signaling by Rho gtpases. Miro gtpases and RHOBTB3 (R-MMU-9716542)	84	63	44.98	+	1.4	3.90E-05	1.54E-03
Signaling by Rho gtpases (R-MMU-194315)	83	62	44.45	+	1.39	5.79E-05	2.08E-03
Immune system (r-mmu-168256)	117	44	62.65	-	0.7	3.17E-04	8.47E-03
Transport of small molecules (R-MMU-382551)	67	23	35.88	-	0.64	1.53E-03	3.24E-02
Metabolism of lipids (R-MMU-556833)	47	15	25.17	-	0.6	2.73E-03	4.83E-02
Innate immune system (r-mmu-168249)	64	19	34.27	-	0.55	9.53E-05	3.12E-03
Cytokine Signaling in Immune system (R-MMU-1280215)	23	4	12.32	-	0.32	4.80E-04	1.20E-02
Formation of the cornified envelope (R-MMU-6809371)	12	1	6.43	-	0.16	1.97E-03	3.90E-02
Keratinization (R-MMU-6805567)	12	1	6.43	-	0.16	1.97E-03	3.83E-02
TNFR2 non-canonical NF-kb pathway (R-MMU-5668541)	8	0	4.28	-	< 0.01	2.12E-03	4.05E-02

8.5 Anexo 5. Tabla 5. Genes inhibidos indican alteraciones en procesos biológicos a nivel del metabolismo glucídico y lipídico

Analysis Type: PANTHER Overrepresentation Test (Released 20240226)
Annotation Version and Release Date: Reactome version 85 Released 2023-05-25
Analyzed List: inhibidos asma vs c.txt (Mus musculus) / There are duplicate IDs in the file. The unique set of IDs will be used
Reference List: Mus musculus (all genes in database)
Test Type: FISHER
Correction: FDR

Reactome pathways	Mus musculus - REFLIST (21983)	Inhibidos asma vs c.txt (724)	Inhibidos asma vs c.txt (expected)	Inhibidos asma vs c.txt (over/under)	Inhibidos asma vs c.txt (fold Enrichment)	Inhibidos asma vs c.txt (raw P-value)	Inhibidos asma vs c.txt (FDR)
Mitotic metaphase/anaphase transition (r-mmu-68881)	2	2	0.07	+	30.36	1.08E-03	1.43E-02
Phosphorylation of Emi1 (R-MMU-176417)	6	5	0.2	+	25.3	2.23E-07	7.55E-06
G2 phase (r-mmu-68911)	5	4	0.16	+	24.29	5.68E-06	1.38E-04

Phosphorylation of proteins involved in G1/S transition by active Cyclin E:Cdk2 complexes (R-MMU-69200)	4	3	0.13	+	22.77	1.39E-04	2.37E-03
Pyrimidine biosynthesis (R-MMU-500753)	3	2	0.1	+	20.24	3.18E-03	3.73E-02
Proline catabolism (R-MMU-70688)	3	2	0.1	+	20.24	3.18E-03	3.71E-02
Activation of NIMA Kinases NEK9. NEK6. NEK7 (R-MMU-2980767)	5	3	0.16	+	18.22	3.39E-04	5.26E-03
Polo-like kinase mediated events (R-MMU-156711)	5	3	0.16	+	18.22	3.39E-04	5.22E-03
TP53 Regulates Transcription of Genes Involved in G1 Cell Cycle Arrest (R-MMU-6804116)	9	5	0.3	+	16.87	4.31E-06	1.06E-04
Homologous DNA Pairing and Strand Exchange (R-MMU-5693579)	26	14	0.86	+	16.35	1.05E-14	8.59E-13
Condensation of Prometaphase Chromosomes (R-MMU-2514853)	8	4	0.26	+	15.18	7.35E-05	1.36E-03
Activation of the pre-replicative complex (R-MMU-68962)	32	16	1.05	+	15.18	5.99E-16	6.08E-14
Ptk6 regulates cell cycle (r-mmu-8849470)	6	3	0.2	+	15.18	6.60E-04	9.19E-03
Presynaptic phase of homologous DNA pairing and strand exchange (R-MMU-5693616)	23	11	0.76	+	14.52	4.32E-11	2.20E-09
Resolution of D-loop Structures through Holliday Junction Intermediates (R-MMU-5693568)	32	14	1.05	+	13.28	4.25E-13	2.62E-11
Resolution of D-Loop Structures (R-MMU-5693537)	32	14	1.05	+	13.28	4.25E-13	2.53E-11
Nucleotide biosynthesis (R-MMU-8956320)	14	6	0.46	+	13.01	2.99E-06	7.71E-05
TP53 Regulates Transcription of Genes Involved in G2 Cell Cycle Arrest (R-MMU-6804114)	7	3	0.23	+	13.01	1.13E-03	1.47E-02
Activation of ATR in response to replication stress (R-MMU-176187)	37	15	1.22	+	12.31	2.41E-13	1.60E-11
Amplification of signal from unattached kinetochores via a MAD2 inhibitory signal (R-MMU-141444)	93	35	3.06	+	11.43	4.61E-28	1.59E-25
Amplification of signal from the kinetochores (R-MMU-141424)	93	35	3.06	+	11.43	4.61E-28	1.33E-25

Anexos

RHO gtpases activate CIT (R-MMU-5625900)	8	3	0.26	+	11.39	1.76E-03	2.22E-02
Cleavage of the damaged pyrimidine (R-MMU-110329)	8	3	0.26	+	11.39	1.76E-03	2.20E-02
Depyrimidination (R-MMU-73928)	8	3	0.26	+	11.39	1.76E-03	2.19E-02
DNA replication initiation (R-MMU-68952)	8	3	0.26	+	11.39	1.76E-03	2.17E-02
Base-excision repair. ap site formation (r-mmu-73929)	11	4	0.36	+	11.04	3.20E-04	5.07E-03
Purine ribonucleoside monophosphate biosynthesis (R-MMU-73817)	11	4	0.36	+	11.04	3.20E-04	5.02E-03
Chk1/Chk2(Cds1) mediated inactivation of Cyclin B:Cdk1 complex (R-MMU-75035)	12	4	0.4	+	10.12	4.68E-04	6.90E-03
Displacement of DNA glycosylase by APEX1 (R-MMU-110357)	9	3	0.3	+	10.12	2.58E-03	3.07E-02
Processive synthesis on the lagging strand (R-MMU-69183)	15	5	0.49	+	10.12	8.72E-05	1.58E-03
EML4 and NUDC in mitotic spindle formation (R-MMU-9648025)	108	35	3.56	+	9.84	1.74E-25	3.76E-23
Cyclin A/B1/B2 associated events during G2/M transition (R-MMU-69273)	25	8	0.82	+	9.72	8.76E-07	2.56E-05
Mitotic spindle checkpoint (r-mmu-69618)	110	35	3.62	+	9.66	3.54E-25	6.10E-23
Resolution of Sister Chromatid Cohesion (R-MMU-2500257)	120	38	3.95	+	9.62	3.83E-27	9.43E-25
HDR through Homologous Recombination (HRR) (R-MMU-5685942)	56	17	1.84	+	9.22	1.55E-12	8.61E-11
Urea cycle (R-MMU-70635)	10	3	0.33	+	9.11	3.59E-03	4.13E-02
DNA strand elongation (R-MMU-69190)	24	7	0.79	+	8.86	8.66E-06	2.08E-04
Telomere extension by telomerase (r-mmu-171319)	21	6	0.69	+	8.68	4.44E-05	8.33E-04
Removal of the Flap Intermediate (R-MMU-69166)	14	4	0.46	+	8.68	8.97E-04	1.22E-02
Kinesins (R-MMU-983189)	56	16	1.84	+	8.68	1.98E-11	1.07E-09
RHO gtpases Activate Formins (R-MMU-5663220)	133	38	4.38	+	8.68	2.62E-25	5.02E-23

Extension of Telomeres (R-MMU-180786)	49	14	1.61	+	8.68	3.62E-10	1.60E-08
Nuclear pore complex (npc) disassembly (r-mmu-3301854)	32	9	1.05	+	8.54	6.16E-07	1.93E-05
G0 and Early G1 (R-MMU-1538133)	18	5	0.59	+	8.43	2.29E-04	3.73E-03
Telomere maintenance (r-mmu-157579)	51	14	1.68	+	8.34	6.52E-10	2.81E-08
TP53 Regulates Transcription of Cell Cycle Genes (R-MMU-6791312)	34	9	1.12	+	8.04	1.09E-06	3.13E-05
Mitotic prometaphase (r-mmu-68877)	192	50	6.32	+	7.91	7.95E-31	3.43E-28
Dna damage/telomere stress induced senescence (r-mmu-2559586)	27	7	0.89	+	7.87	2.04E-05	4.24E-04
Regulation of APC/C activators between G1/S and early anaphase (R-MMU-176408)	35	9	1.15	+	7.81	1.42E-06	4.02E-05
Cell cycle checkpoints (r-mmu-69620)	266	67	8.76	+	7.65	5.09E-40	2.93E-37
Lagging strand synthesis (r-mmu-69186)	20	5	0.66	+	7.59	3.92E-04	5.94E-03
HDR through Single Strand Annealing (SSA) (R-MMU-5685938)	37	9	1.22	+	7.39	2.36E-06	6.26E-05
Sumoylation of DNA replication proteins (R-MMU-4615885)	42	10	1.38	+	7.23	7.99E-07	2.42E-05
Telomere C-strand (Lagging Strand) Synthesis (R-MMU-174417)	34	8	1.12	+	7.14	1.13E-05	2.57E-04
Regulation of Glucokinase by Glucokinase Regulatory Protein (R-MMU-170822)	30	7	0.99	+	7.08	4.29E-05	8.13E-04
Regulation of TP53 Expression and Degradation (R-MMU-6806003)	35	8	1.15	+	6.94	1.42E-05	3.11E-04
Regulation of TP53 Degradation (R-MMU-6804757)	35	8	1.15	+	6.94	1.42E-05	3.07E-04
Postmitotic nuclear pore complex (NPC) reformation (R-MMU-9615933)	22	5	0.72	+	6.9	6.31E-04	8.93E-03
Chromosome maintenance (r-mmu-73886)	112	25	3.69	+	6.78	2.35E-14	1.85E-12
Homology directed repair (r-mmu-5693538)	113	25	3.72	+	6.72	2.93E-14	2.20E-12
HDR through Homologous Recombination (HRR) or Single Strand Annealing	107	23	3.52	+	6.53	6.04E-13	3.47E-11

Anexos

(SSA) (R-MMU-5693567)							
Transcriptional regulation by small mas (R-MMU-5578749)	33	7	1.09	+	6.44	8.26E-05	1.52E-03
AURKA Activation by TPX2 (R-MMU-8854518)	71	15	2.34	+	6.41	8.30E-09	3.41E-07
Fanconi anemia pathway (r-mmu-6783310)	38	8	1.25	+	6.39	2.71E-05	5.44E-04
Processive synthesis on the C-strand of the telomere (R-MMU-174414)	19	4	0.63	+	6.39	3.05E-03	3.60E-02
Regulation of TP53 Activity through Phosphorylation (R-MMU-6804756)	91	19	3	+	6.34	1.06E-10	5.11E-09
Nuclear envelope breakdown (r-mmu-2980766)	48	10	1.58	+	6.33	2.97E-06	7.77E-05
Sumoylation of sumoylation proteins (R-MMU-4085377)	34	7	1.12	+	6.25	1.01E-04	1.82E-03
Transport of the SLBP independent Mature mrna (R-MMU-159227)	34	7	1.12	+	6.25	1.01E-04	1.80E-03
Base excision repair (r-mmu-73884)	39	8	1.28	+	6.23	3.31E-05	6.36E-04
Separation of Sister Chromatids (R-MMU-2467813)	184	37	6.06	+	6.11	5.66E-19	6.10E-17
G1/s transition (r-mmu-69206)	105	21	3.46	+	6.07	2.64E-11	1.38E-09
Transport of the SLBP Dependant Mature mrna (R-MMU-159230)	35	7	1.15	+	6.07	1.23E-04	2.14E-03
Alpha-defensins (R-MMU-1462054)	35	7	1.15	+	6.07	1.23E-04	2.12E-03
Dna replication (r-mmu-69306)	126	25	4.15	+	6.02	4.09E-13	2.62E-11
Processing of DNA double-strand break ends (R-MMU-5693607)	71	14	2.34	+	5.99	6.60E-08	2.48E-06
Glycolysis (R-MMU-70171)	61	12	2.01	+	5.97	5.90E-07	1.88E-05
Cell cycle (r-mmu-1640170)	583	113	19.2	+	5.89	8.72E-55	1.51E-51
Mitotic Metaphase and Anaphase (R-MMU-2555396)	222	43	7.31	+	5.88	3.50E-21	4.65E-19
Polymerase switching on the C-strand of the telomere (R-MMU-174411)	26	5	0.86	+	5.84	1.41E-03	1.81E-02
Cell cycle. mitotic (r-mmu-69278)	495	95	16.3	+	5.83	1.54E-45	1.33E-42

Dna double-strand break repair (r-mmu-5693532)	141	27	4.64	+	5.81	1.17E-13	8.39E-12
Mitotic anaphase (r-mmu-68882)	221	42	7.28	+	5.77	2.17E-20	2.68E-18
G2/m checkpoints (r-mmu-69481)	145	27	4.78	+	5.65	2.37E-13	1.64E-11
RHO gtpase Effectors (R-MMU-195258)	244	45	8.04	+	5.6	3.29E-21	4.73E-19
Resolution of Abasic Sites (AP sites) (R-MMU-73933)	38	7	1.25	+	5.59	2.11E-04	3.51E-03
Sumoylation of ubiquitylation proteins (R-MMU-3232142)	38	7	1.25	+	5.59	2.11E-04	3.48E-03
Snrnp Assembly (R-MMU-191859)	49	9	1.61	+	5.58	2.74E-05	5.43E-04
Metabolism of non-coding RNA (R-MMU-194441)	49	9	1.61	+	5.58	2.74E-05	5.37E-04
Deposition of new CENPA-containing nucleosomes at the centromere (R-MMU-606279)	61	11	2.01	+	5.48	4.27E-06	1.08E-04
Nucleosome assembly (R-MMU-774815)	61	11	2.01	+	5.48	4.27E-06	1.07E-04
G2/M DNA damage checkpoint (R-MMU-69473)	73	13	2.4	+	5.41	6.73E-07	2.07E-05
Loss of proteins required for interphase microtubule organization from the centrosome (R-MMU-380284)	68	12	2.24	+	5.36	2.00E-06	5.47E-05
Loss of Nlp from mitotic centrosomes (R-MMU-380259)	68	12	2.24	+	5.36	2.00E-06	5.38E-05
Synthesis of DNA (R-MMU-69239)	119	21	3.92	+	5.36	3.11E-10	1.45E-08
Regulation of PLK1 Activity at G2/M Transition (R-MMU-2565942)	85	15	2.8	+	5.36	1.06E-07	3.75E-06
Transport of Mature mrna Derived from an Intronless Transcript (R-MMU-159231)	41	7	1.35	+	5.18	3.46E-04	5.28E-03
COPI-dependent Golgi-to-ER retrograde traffic (R-MMU-6811434)	95	16	3.13	+	5.11	7.95E-08	2.86E-06
Mitotic G1 phase and G1/S transition (R-MMU-453279)	131	22	4.31	+	5.1	3.18E-10	1.44E-08
Transport of Mature mRNAs Derived from Intronless Transcripts (R-MMU-159234)	42	7	1.38	+	5.06	4.03E-04	6.00E-03

Anexos

Dna replication pre-initiation (r-mmu-69002)	98	16	3.23	+	4.96	1.25E-07	4.30E-06
S phase (r-mmu-69242)	147	24	4.84	+	4.96	9.18E-11	4.53E-09
M phase (r-mmu-68886)	368	60	12.12	+	4.95	5.66E-25	8.89E-23
Gene Silencing by RNA (R-MMU-211000)	43	7	1.42	+	4.94	4.68E-04	6.85E-03
Orc1 removal from chromatin (R-MMU-68949)	70	11	2.31	+	4.77	1.69E-05	3.56E-04
Anchoring of the basal body to the plasma membrane (R-MMU-5620912)	96	15	3.16	+	4.74	5.54E-07	1.80E-05
Centrosome maturation (R-MMU-380287)	78	12	2.57	+	4.67	8.81E-06	2.06E-04
Recruitment of mitotic centrosome proteins and complexes (R-MMU-380270)	78	12	2.57	+	4.67	8.81E-06	2.03E-04
Sumoylation of RNA binding proteins (R-MMU-4570464)	46	7	1.51	+	4.62	7.14E-04	9.78E-03
Factors involved in megakaryocyte development and platelet production (R-MMU-983231)	120	18	3.95	+	4.55	7.91E-08	2.91E-06
Glucose metabolism (R-MMU-70326)	81	12	2.67	+	4.5	1.31E-05	2.90E-04
Dna repair (r-mmu-73894)	281	41	9.25	+	4.43	1.13E-15	1.08E-13
Switching of origins to a post-replicative state (R-MMU-69052)	91	13	3	+	4.34	8.68E-06	2.05E-04
Regulation of HSF1-mediated heat shock response (R-MMU-3371453)	64	9	2.11	+	4.27	2.36E-04	3.81E-03
Golgi-to-ER retrograde transport (R-MMU-8856688)	129	18	4.25	+	4.24	2.43E-07	8.08E-06
Regulation of mitotic cell cycle (R-MMU-453276)	86	12	2.83	+	4.24	2.44E-05	5.02E-04
APC/C-mediated degradation of cell cycle proteins (R-MMU-174143)	86	12	2.83	+	4.24	2.44E-05	4.96E-04
G1/s dna damage checkpoints (r-mmu-69615)	65	9	2.14	+	4.2	2.66E-04	4.26E-03
Recruitment of numa to mitotic centrosomes (R-MMU-380320)	88	12	2.9	+	4.14	3.09E-05	5.99E-04
Sumoylation of DNA damage response and repair proteins (R-MMU-3108214)	74	10	2.44	+	4.1	1.51E-04	2.53E-03

Defensins (R-MMU-1461973)	52	7	1.71	+	4.09	1.51E-03	1.91E-02
Regulation of TP53 Activity (R-MMU-5633007)	156	21	5.14	+	4.09	4.65E-08	1.82E-06
Mitotic G2-G2/M phases (R-MMU-453274)	182	24	5.99	+	4	7.79E-09	3.28E-07
Sumoylation of chromatin organization proteins (R-MMU-4551638)	54	7	1.78	+	3.94	1.88E-03	2.29E-02
G2/m transition (r-mmu-69275)	180	23	5.93	+	3.88	2.91E-08	1.17E-06
P53-Dependent G1/S DNA damage checkpoint (R-MMU-69580)	63	8	2.07	+	3.86	1.04E-03	1.39E-02
P53-Dependent G1 DNA Damage Response (R-MMU-69563)	63	8	2.07	+	3.86	1.04E-03	1.38E-02
RHOC gtpase cycle (R-MMU-9013106)	72	9	2.37	+	3.8	5.78E-04	8.32E-03
Mitotic prophase (r-mmu-68875)	101	12	3.33	+	3.61	1.21E-04	2.14E-03
RHOB gtpase cycle (R-MMU-9013026)	70	8	2.31	+	3.47	2.08E-03	2.51E-02
Cellular response to heat stress (R-MMU-3371556)	84	9	2.77	+	3.25	1.77E-03	2.16E-02
Activation of APC/C and APC/C:Cdc20 mediated degradation of mitotic proteins (R-MMU-176814)	76	8	2.5	+	3.2	3.50E-03	4.05E-02
Metabolism of nucleotides (R-MMU-15869)	95	10	3.13	+	3.2	1.15E-03	1.49E-02
Signaling by Rho gtpases (R-MMU-194315)	608	62	20.02	+	3.1	2.78E-15	2.40E-13
Intra-Golgi and retrograde Golgi-to-ER traffic (R-MMU-6811442)	187	19	6.16	+	3.09	1.43E-05	3.04E-04
Signaling by Rho gtpases. Miro gtpases and RHOBTB3 (R-MMU-9716542)	623	63	20.52	+	3.07	2.43E-15	2.21E-13
MHC class II antigen presentation (R-MMU-2132295)	113	11	3.72	+	2.96	1.27E-03	1.63E-02
SUMO E3 ligases sumoylate target proteins (R-MMU-3108232)	148	14	4.87	+	2.87	3.93E-04	5.89E-03
Transcriptional Regulation by TP53 (R-MMU-3700989)	301	28	9.91	+	2.82	8.72E-07	2.60E-05
Cilium assembly (r-mmu-5617833)	185	17	6.09	+	2.79	1.39E-04	2.36E-03

Anexos

Sumoylation (R-MMU-2990846)	154	14	5.07	+	2.76	5.87E-04	8.37E-03
Organelle biogenesis and maintenance (R-MMU-1852241)	212	17	6.98	+	2.43	6.87E-04	9.49E-03
Metabolism of carbohydrates (R-MMU-71387)	264	20	8.69	+	2.3	6.40E-04	8.98E-03
Generic transcription pathway (r-mmu-212436)	816	51	26.87	+	1.9	1.31E-05	2.94E-04
Gene expression (Transcription) (R-MMU-74160)	1064	65	35.04	+	1.85	1.55E-06	4.30E-05
Rna polymerase ii transcription (r-mmu-73857)	934	51	30.76	+	1.66	4.70E-04	6.82E-03
Signal transduction (r-mmu-162582)	2230	120	73.44	+	1.63	5.80E-08	2.23E-06
Unclassified (UNCLASSIFIED)	12918	308	425.45	-	0.72	5.27E-19	6.07E-17
Innate immune system (r-mmu-168249)	1090	19	35.9	-	0.53	2.19E-03	2.62E-02
Translation (R-MMU-72766)	224	0	7.38	-	< 0.01	1.00E-03	1.35E-02