



UNIVERSIDAD DE CANTABRIA
Programa de Doctorado en Biología
Molecular y Biomedicina

Papel de BAMBI en la respuesta inmune de las mucosas y en el desarrollo de patología inflamatoria intestinal y de neoplasias secundarias.

Director:

Dr. Ramón Merino Pérez

Codirector:

Dr. Jesús Merino Pérez

Tesis doctoral presentada por Marta Muñoz Ruiz
para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Cantabria
Santander, Junio 2018

Ramón Merino Pérez, Científico Titular del CSIC, Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria, CSIC-Universidad de Cantabria-Sodercan, Profesor Asociado del Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Cantabria,

Jesús Merino Pérez, Catedrático de Inmunología, Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Cantabria,

EXPONEN:

Que han llevado a cabo las funciones de DIRECTOR y CO-DIRECTOR DE TESIS, respectivamente, del Trabajo de TESIS DOCTORAL realizado por la Licenciada **Marta Muñoz Ruiz** en el Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Cantabria y titulado **"Papel de BAMBI en la respuesta inmune de las mucosas y en el desarrollo de patología inflamatoria intestinal y de neoplasias secundarias"**.

Consideramos que los objetivos planteados y los resultados obtenidos en dicho trabajo, fundamentan las conclusiones a las que se llegan. Por lo tanto, el trabajo reúne los requisitos necesarios para su presentación como memoria de doctorado por el interesado, al objeto de poder optar al título de DOCTOR por la Universidad de Cantabria.

En Santander a dieciocho de junio de dos mil dieciocho.

Ramón Merino Pérez

Jesús Merino Pérez

*A Josh,
Gracias por ser esa luz*

A todas mis familias,

Gracias, os quiero

“Good fences make good neighbours”

Robert Frost, 1914

ÍNDICE

ÍNDICE.....	1
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	5
ABREVIATURAS.....	7
I- INTRODUCCIÓN.....	15
1. FISIOLÓGÍA DE LA MUCOSA INTESTINAL.....	16
1.1 Componentes de la barrera intestinal.....	16
1.1.1 Epitelio intestinal.....	16
1.1.2 Muestreo del contenido intestinal.....	20
1.2. IECs, centinelas de la homeostasis intestinal.....	22
1.2.1 Señalización por PRRs.....	23
1.2.2 Regulación de las vías de PRRs en las IECs.....	25
1.2.3. Papel de los PRRs en la homeostasis de la barrera intestinal.....	27
1.3. El Sistema Inmunológico de la mucosa intestinal.....	29
1.3.1 Tejidos linfoides asociados a mucosa intestinal (GALT).....	29
1.3.2. Tejido linfoide organizado.....	29
1.3.3. Tejido linfoide difuso.....	30
1.3.3.1. IEp.....	30
1.3.3.2. LP intestinal.....	31
- Linfocitos T.....	31
- Céulas Plasmáticas.....	32
- Fagocitos morfonucleares.....	32
- Células linfoides innatas (ILCs).....	36
- Otras células innatas intestinales.....	38
2. MICROBIOTA INTESTINAL.....	40
2.1 Composición de la microbiota intestinal.....	40
2.2. Mutualismo.....	41
2.3. Aspectos funcionales de la microbiota intestinal.....	41
2.3.1. Metabolismo de nutrientes y obesidad.....	42
2.3.2. Desarrollo de estructuras linfoides.....	43

2.3.3. Diferenciación de poblaciones inmunológicas.....	44
2.3.4. Producción de mediadores inmunológicos.....	46
2.3.5. Producción de moco.....	46
2.4. Microbiota intestinal y EII.....	47
2.5. Microbiota intestinal y desarrollo de cáncer.....	48
3. LA SUPERFAMILIA DE FACTORES DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE- β (TGF β).....	50
3.1. Síntesis de TGF β s.....	51
3.2. Activación de los TGF β s latentes.....	51
3.3. Receptores y señalización de TGF β s.....	52
3.4. Ruta canónica: señalización por proteínas Smad.....	53
3.5. Rutas no canónicas.....	54
3.5.1. Señalización a través de ERK.....	54
3.5.2. Señalización a través de JNK/p38.....	55
3.5.3. Señalización a través de GTPasas tipo Rho.....	55
3.5.4. Señalización a través de PI3K/AKT.....	56
3.6. Regulación de la señalización por TGF β	57
3.6.1. BAMBI.....	59
3.7. TGF β en el tubo digestivo.....	62
3.7.1. TGF β en el SI asociado a mucosa intestinal.....	62
3.7.2. TGF β en el epitelio intestinal.....	65
3.7.3. TGF β en patología intestinal.....	66
3.7.4. TGF β y CRC.....	67
II- OBJETIVOS.....	73
III- MATERIALES Y MÉTODOS.....	77
1. RATONES.....	77
1.1. Ratones cosanguíneos.....	77
1.2. Ratones deficientes (gene knock-out).....	77
1.3. Otros ratones.....	78
2. MANTENIMIENTO Y MANIPULACIÓN DE LOS ANIMALES.....	78

3. CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA MEDIANTE PCR.....	79
3.1. Ratones BAMBI-KO.....	79
3.2. Ratones NOD2-KO.....	80
4. OBTENCIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS Y SUSENSIONES CELULARES.....	81
4.1. Muestras sanguíneas: sangre y plasma.....	81
4.2. Suspensiones celulares.....	81
4.2.1. Obtención de células de la LP.....	81
5. CARACTERIZACIÓN DE LAS POBLACIONES INMUNOLÓGICAS DE LOS ÓRGANOS LINFOIDES Y DE LA LP.....	82
6. SEPARACIÓN DEL EPITELIO INTESTINAL DEL MESÉNQUIMA.....	85
7. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN POR PCR CUANTITATIVA.....	86
7.1. Extracción del RNA. Técnica del Trizol-Cloroformo.....	86
7.2. Obtención del cDNA.....	87
7.3. Amplificación del cDNA por PCR cuantitativa.....	87
8. PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE AcMs.....	91
8.1. Producción en ratones Nude.....	91
8.2. Purificación de los AcMs. Método del ácido caprílico.....	91
9. INDUCCIÓN Y VALORACIÓN DE LA COLITIS INDUCIDA POR DSS.....	92
9.1. Inducción.....	92
9.2. Valoración clínica.....	92
10. TRATAMIENTO <i>IN VIVO</i> CON AcMs.....	93
10.1. Tratamiento con el AcM IgG1 de rata anti-CD25 (PC61) murino.....	93
10.2. Tratamiento con el AcM IgG1 murino anti-TGF β (1D11) murino.....	93
11. GENERACIÓN DE RATONES QUIMÉRICOS.....	93
12. PROCESAMIENTO Y ESTUDIO HISTOLÓGICO DE LOS TEJIDOS.....	94
13. TINCIÓN DE TÚNEL.....	94
14. ESTUDIO DE PERMEABILIDAD INTESTINAL.....	95
15. OBTENCIÓN DE MUESTRAS FECALES.....	96
15.1. Obtención de SN fecal.....	96
15.2. Obtención de DNA de microbiotas bacterianas fecales.....	96
16. CUANTIFICACIÓN DE Igs MEDIANTE ELISA.....	96

17. ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD DE LA MICROBIOTA BACTERIANA.....	97
18. INDUCCIÓN Y VALORACIÓN CLÍNICA DE CÁNCER COLORRECTAL (CRC) ASOCIADO A INFLAMACIÓN CRÓNICA.....	98
18.1. Inducción.....	98
18.2. Valoración clínica del desarrollo del CRC.....	98
19. REACTIVOS.....	99
19.1. Tampones.....	99
19.2. Soluciones.....	99
19.3. Medios de cultivo.....	100
20. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	100
IV- RESULTADOS.....	103
1. CARACTERIZACIÓN DEL GALT EN LOS RATONES BAMBI-KO.....	103
2. LA DEFICIENCIA EN BAMBI PROTEGE CONTRA EL DESARROLLO DE COLITIS.....	106
3. LA PROTECCIÓN CONTRA EL DESARROLLO DE COLITIS-DSS EN LOS RATONES BAMBI-KO ES DEPENDIENTE DE TGF β	109
4. CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL DEL IEP EN LA PROTECCIÓN CONTRA EL DESARROLLO DE COLITIS-DSS EN LOS RATONES BAMBI-KO.....	111
5. PAPEL DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN LA PROTECCIÓN CONTRA EL DESARROLLO DE COLITIS-DSS EN LOS RATONES BAMBI-KO.....	117
6. LA AUSENCIA DE NOD2 BLOQUEA LA PROTECCIÓN CONTRA EL DESARROLLO DE COLITIS-DSS EN LOS RATONES BAMBI-KO.....	122
7. LA DEFICIENCIA EN BAMBI PROTEGE CONTRA EL DESARROLLO DE CANCER DE COLON ASOCIADO A INFLAMACIÓN CRÓNICA.....	123
V- DISCUSIÓN.....	127
VI- CONCLUSIONES.....	139
VII- BIBLIOGRAFÍA.....	143
ANEXO: PUBLICACIONES DEL PERIODO PREDOCTORAL.....	181

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

I- INTRODUCCIÓN

Figura 1. La barrera intestinal.....	21
Figura 2. Reconocimiento de microorganismos en las IECs.....	26
Figura 3. Regulación de la inmunidad innata y adaptativa por las IECs.....	36
Figura 4. Distribución de la carga microbiana a lo largo del intestino.....	43
Figura 5. Impacto de la microbiota en el SI de la LP intestinal.....	45
Figura 6. Activación y señalización del TGF β	56
Figura 7. Papel del TGF β en la homeostasis inmune de la mucosa intestinal.....	64

III- MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 1. Disrupción del gen BAMBI por recombinación homóloga.....	78
Figura 2. Caracterización de los ratones BAMBI-KO	79
Tabla 1. Secuencia de los diferentes <i>primers</i> utilizados en PCR para la caracterización de los ratones.....	80
Tabla 2. AcMs utilizados para la caracterización de poblaciones linfocitarias por citometría de flujo.....	84
Figura 3. Separación del epitelio intestinal del mesénquima.....	85
Figura 4. Comprobación de la integridad del RNA.....	87
Tabla 3. Referencias de los <i>primers</i> utilizados, tomados de la librería de Applied Biosystems.....	89
Tabla 4. Secuencias de los diferentes <i>primers</i> diseñados utilizados en los estudios de expresión con SYBR Premix.....	89
Tabla 5. Diferentes <i>coatings</i> y Acs secundarios utilizados en las determinaciones realizadas mediante ELISA.....	97

IV- RESULTADOS

Figura 1. Distribución de las poblaciones linfocitarias en el GALT de ratones WT y BAMBI-KO.....	104
---	-----

Figura 2. Distribución de poblaciones celulares de la RI innata en el GALT de ratones WT y BAMBI-KO.....	105
Figura 3. Perfil de expresión génica de distintas citocinas pro- y anti-inflamatorias en el íleon y colon de ratones WT y BAMBI-KO.....	106
Figura 4. La deficiencia en BAMBI previene el desarrollo de colitis-DSS.....	107
Figura 5. Distribución de poblaciones celulares de la RI adaptativa e innata en la LP del colon de ratones WT y BAMBI-KO antes y tras la administración de DSS.....	109
Figura 6. Papel de las células Treg CD4 ⁺ CD25 ⁺ , de la IL-10 y de TGFβ en la protección contra el desarrollo de colitis-DSS en ratones BAMBI-KO.....	110
Figura 7. Desarrollo de colitis-DSS en ratones quiméricos de médula ósea.....	112
Figura 8. Expresión de BAMBI en el IEp.....	113
Figura 9. Importancia del IEp en la protección contra el desarrollo de colitis-DSS en ratones BAMBI-KO.....	115
Figura 10. Perfil de expresión génica de distintos componentes del moco y de las uniones estrechas en el colon de ratones WT y BAMBI-KO.....	116
Figura 11. La deficiencia en BAMBI incrementa la expresión de defensinas en el colon y el transporte de anticuerpos al lumen intestinal.....	117
Figura 12. Influencia del estabulario en la protección frente al desarrollo de colitis-DSS en los ratones BAMBI-KO.....	118
Figura 13. Caracterización de las microbiotas del colon en ratones WT y BAMBI-KO en condiciones homeostáticas y tras la inducción de colitis-DSS.....	120
Figura 14. “Heatmap” de la distribución de especies bacterianas concretas en ratones WT y BAMBI-KO criados en un animalario convencional tanto en condiciones homeostáticas como tras la inducción de colitis-DSS.....	121
Figura 15. Desarrollo de colitis-DSS en ratones BAMBI-KO/NOD2-KO.....	122
Figura 16. Protección contra el desarrollo de cáncer de colon en ratones BAMBI-KO.....	124

ABREVIATURAS

ABREVIATURA	Concepto
Ac	Anticuerpo
AcM	Anticuerpo monoclonal
AOM	Azoximetano
AP	Fosfatasa alcalina
APCs	Células presentadoras de antígeno
APC	Aloficocianina
APC-Cy7	Aloficocianina-cianina 7
APRIL	Ligando A inductor de proliferación
BAFF	Factor activador de linfocitos B
BAMBI	<i>BMP and Activin membrane bound inhibitor</i>
BAMBI-KO	Ratones deficientes en BAMBI
BBS	Tampón borato salino
B-CG	Células B del centro germinal
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BSA	Albúmina sérica bovina
CD	Enfermedad de Crohn
cDC	Célula dendrítica clásica
cDNA	DNA complementario
CG	Centro germinal
CH	Carbohidratos
CIA	Artritis inducida por Colágeno
CRC	Cáncer colorrectal
DAI	Índice de actividad de la enfermedad
DAMP	Patrón molecular asociado al daño
DC	Célula dendrítica
DEPC	Dietil pirocarbonato
dH ₂ O	Agua destilada

Abreviaturas

dNTPs	Desoxirribonucleótidos fosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSS	Sulfato de dextrano sódico
DTT	Ditiotreitol
ECM	Matriz extracelular
EDTA	Ácido dietilenaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima
EMT	Transición epitelio-mesénquima
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
F1	Híbrido de primera generación
FAM	Carboxifluoresceína
FBS	Suero fetal bovino
FITC	Fluoresceína isotiocianato
Foxp3	<i>Forkhead box p3</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
GALT	Tejido linfoide asociado a mucosa intestinal
GF	<i>Germ free</i>
GI	Gastrointestinal
HEX	6-carboxi-2,4,4,5,7,7-hexaclorofluoresceína succinimidil éster
IDO	Indolamina 2,3-dioxigenasa
IEC	Célula epitelial intestinal
IEp	Epitelio intestinal
IESC	Célula madre epitelial intestinal
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
ILC	Célula linfoide innata
ILFs	Folículos linfoides aislados

iNKT	Célula T asesina natural inducida
i.p.	Intraperitoneal
iTreg	Célula T reguladora inducida
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
LAP	Péptido asociado a latencia
LLC	Complejo grande de latencia
LP	Lámina propia
LPS	Lipopolisacárido
LTBPs	Proteínas de unión al TGFβ latente
LTi	Célula inductora de tejido linfoide
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MDP	Muramil dipéptido
MEK	MAP quinasa ERK-quinasa
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MKK	MAP quinasa quinasa
MLN	Ganglios mesentéricos
MMP	Metaloproteasas de matriz extracelular
mRNA	RNA mensajero
NF-κB	Factor nuclear de unión al <i>enhancer</i> de las cadenas ligeras
NLR	Receptor tipo NOD
NOD	Dominio de oligomerización y unión de nucleótidos
NOD2-KO	Ratones deficientes en NOD2
NK	Célula asesina natural
o/n	Durante toda la noche (<i>over night</i>)
PAMs	Péptidos antimicrobianos
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
pb	Pares de bases
PB	Azul pacífico
PBS	Tampón fosfato salino

Abreviaturas

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pDC	Célula dendrítica plasmacitoide
PE	Ficoeritrina
PerCp	Peridin-clorofila α -proteína
PG	Peptidoglicano
PI3K	Fosfoinositol 3 quinasa
pIgR	Receptor de inmunoglobulinas polimérico
pNPP	4-nitrofenilfosfato
PP	Placas de peyer
PRR	Receptores de reconocimiento de patógenos
qPCR	PCR cuantitativa
RA	Ácido retinoico
Rho	Homólogo de Ras
RIA	Respuesta inmune adaptativa
RII	Respuesta inmune innata
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Temperatura ambiente
SARA	<i>Smad anchor for receptor activation</i>
SAS	Sulfato amónico saturado
SBE	<i>Smad binding element</i>
SCFAs	Ácidos grasos de cadena corta
SI	Sistema inmune
SLC	Complejo pequeño de latencia
SMURF	Factor regulador de la ubiquitinación de Smad
SN	Sobrenadante
SPF	Libre de patógenos específicos
SSC	<i>Side Scatter</i>
TAK1	<i>TGFβ activated kinase 1</i>

TBE	Tampón Tris-borato-EDTA
TβRI	Receptor de TGFβ tipo I
TβRII	Receptor de TGFβ tipo II
TCR	Receptor antigénico de linfocitos T
TEDs	Dendritas transepiteliales
TGF	Factor de crecimiento transformante
TIMP	Inhibidores tisulares de MMPs
TFh	Células T CD4 ⁺ foliculares
Th	Linfocitos T colaboradores o <i>helper</i>
THBS	Trombospondina
TLR	Receptor tipo <i>Toll</i>
TNBS	ácido 2 4 6-trinitrobenceno sulfónico
TNF	Factor de necrosis tumoral
Treg	Células T reguladoras
TSLP	Linfopoyetina estromal tímica
U	Unidades
UC	Colitis ulcerosa
UV	Ultravioleta
WT	Cepa silvestre (<i>wild type</i>)

I. INTRODUCCIÓN

I- INTRODUCCIÓN

La piel y las mucosas son las estructuras anatómicas que protegen al organismo contra el medio externo. A parte de su función de barrera, estas estructuras son los principales sitios de interacción entre los microorganismos externos y el Sistema Inmune (SI). De hecho, la piel y las mucosas albergan complejas comunidades microbianas englobadas bajo el termino de microbiotas. En concreto, las microbiotas de las mucosas de la cavidad oral y gastrointestinales, compuestas por bacterias, arqueas, virus, hongos y protozoos, son sin duda alguna las más numerosas, pudiendo alcanzar a nivel del colon densidades superiores a los 10^{10} - 10^{12} micro-organismos por gramo de tejido. Por lo tanto, en estas localizaciones el SI está expuesto a una ingente carga antigénica compuesta por los microorganismos mencionados anteriormente y por los antígenos alimentarios.

En la mucosa intestinal el SI y los microorganismos de la microbiota han co-evolucionado durante miles de años estableciéndose un estado de comensalismo beneficioso tanto para el organismo como para la propia microbiota. Este comensalismo es el resultado de la puesta en marcha de un complejo sistema de intercomunicación en donde se va a definir la configuración (composición, activación, tolerización) de ambos compartimentos y en donde va a jugar un papel central el epitelio intestinal (IEp) (Belkaid and Hand, 2014; Ivanov and Honda, 2012; Kamada et al., 2013) De la coordinación de estas señales, a través de complejas redes celulares y moleculares, va a depender el mantenimiento de la homeostasis intestinal.

1. FISIOLÓGÍA DE LA MUCOSA INTESTINAL

1.1. Componentes de la barrera intestinal

1.1.1. Epitelio Intestinal

El IEp constituye un elemento esencial de la barrera mucosa, formado por una monocapa de células epiteliales (IECs), organizada en criptas y vellosidades, y que se renueva cada cuatro o cinco días. Existen distintos linajes de IECs que contribuyen a la función de barrera del IEp, y, en función de su actividad biológica, se clasifican en células absorbentes (enterocitos y células M) y células secretoras (células de Paneth, células caliciformes o de Goblet, células enteroendocrinas y células de Tuft). Todos estos tipos celulares derivan de células madre del IEp (IESCs), que se localizan en la base de las criptas de Lieberkühn. Las IESCs se auto-renuevan continuamente, dando origen a células progenitoras transitorias (TAC), que permanecen alrededor de dos días en la cripta intestinal, donde experimentan una rápida proliferación antes de su diferenciación y maduración (Noah et al., 2011). Aproximadamente tres días tras su diferenciación, estas células, migran siguiendo el eje cripta-vellosidad hasta la punta de las vellosidades, donde se desprenden de la membrana epitelial por un proceso de apoptosis (Sato et al., 2009). Las células de Paneth son una excepción, siendo las únicas células diferenciadas que escapan a la migración ascendente. Se asientan en la base de la cripta y su vida media es de al menos tres semanas, mucho mayor que el del resto de células diferenciadas del IEp (Bjerknes and Cheng, 1981). Aunque, la organización modular del IEp en criptas, es similar tanto en el intestino delgado como en el colon, en este último, se observan dos diferencias importantes: no tiene vellosidades, sino una superficie epitelial plana, y no presenta células de Paneth.

Recientes avances en la biología de las células madre intestinales han identificado marcadores que han ayudado a comprender la auto-renovación y diferenciación de las IECs. Es necesario un equilibrio entre la señalización de BMP (*Bone Morphogenetic Protein*) y sus antagonistas, como Noggin y Gremlin, para asegurar un nicho para las IESCs, y limitar la formación de criptas ectópicas (Haramis, 2004). Por otra parte, las IESCs

dependen de la señalización a través de las vías de Wnt- β -catenina y de Notch para el mantenimiento del compartimento de la cripta en su estado indiferenciado y proliferativo. Además, la vía de Notch tiene un papel central en la decisión del destino celular (Van der Flier and Clevers, 2009).

Los **enterocitos** son el tipo celular predominante en el IEp y sus funciones principales son la absorción de nutrientes del lumen intestinal y el mantenimiento de la integridad física de la barrera. Para esta última función son indispensables los complejos de uniones apicales que se establecen entre las IECs, que consisten en uniones adherentes, uniones estrechas y desmosomas. Las uniones adherentes y los desmosomas proporcionan fuerza adhesiva mecánica entre las IECs, mientras que las uniones estrechas regulan la permeabilidad paracelular selectiva, permitiendo el paso de agua, iones y solutos a través de poros. Las uniones estrechas son complejos, localizados en la membrana lateral de la región apical, compuestos por proteínas transmembrana [claudinas, ocludinas, moléculas de unión estrecha (JAM) y tricelulina] y proteínas adaptadoras citosólicas [Zonula Occludens (ZO), AF-6 y cingulina]. Algunas claudinas, como la Claudina 4, disminuyen la permeabilidad paracelular e incrementan la función barrera, mientras que otras, como la Claudina 2, forman poros e incrementan la permeabilidad paracelular (Suzuki, 2013). Los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII) presentan una disminución en la expresión y una redistribución de Ocludina, junto con un aumento de la expresión de Claudina 2, desestabilizando la función de barrera intestinal e incrementando la permeabilidad epitelial (Vetrano et al., 2008). Se han visto alteraciones similares en modelos animales; ratones deficientes en IL-10, que desarrollan una colitis espontánea, presentan un descenso en la expresión y una redistribución de Claudina 1, ZO-1 y Ocludina (Chen et al., 2010).

La diversidad de funciones que lleva a cabo el IEp queda reflejada por la presencia de linajes especializados adicionales (Figura 1). La secreción de moco al lumen intestinal por las **células de Goblet** recubre la monocapa de IECs, actúa como lubricante, facilitando el transporte gastrointestinal (GI), y crea una primera línea de defensa frente a la invasión bacteriana (Johansson et al., 2011). La capa de moco tiene una estructura muy definida, que varía en función de la localización anatómica. Mientras que en el intestino delgado

consiste en una monocapa laxa, en el colon se compone de dos subcapas; una capa interna más densa, firmemente adherida al IEp y una capa externa más laxa (Johansson et al., 2008). Está principalmente compuesta por proteínas altamente glicosiladas, denominadas mucinas, que forman redes poliméricas con textura de gel. MUC2 es la mucina más abundante tanto en ratones como en humanos, y juega un papel esencial en la organización de las capas de moco en la superficie epitelial del colon (Johansson et al., 2008). Por otra parte, el moco tiene un papel dual en relación a la microbiota; además de proteger a la mucosa de interacciones indeseadas con microorganismos patógenos, proporciona un sustrato de crecimiento, adhesión y protección para microorganismos presentes en el lumen del tracto GI (Derrien et al., 2010; Van Klinken et al., 1995). Sin embargo, las bacterias sólo se encuentran en la capas laxas, debido a que en la capa de moco interna del colon las moléculas de mucina interconectadas forman poros más pequeños que una célula bacteriana, impidiendo así su penetración (Ambort et al., 2012). La importancia de esta capa en el mantenimiento de la homeostasis intestinal queda demostrada con la observación de que la deficiencia en MUC2, reduce la capacidad de barrera de la misma y promueve el desarrollo espontáneo de colitis en ratones (Van der Sluis et al., 2006).

Las células de Goblet secretan otros productos que contribuyen a la regulación de la barrera física intestinal. Un ejemplo es el trefoil factor 3 (TFF3), que proporciona integridad estructural a la capa de moco a través de su interacción con mucinas y que actúa como una señal que promueve la reparación epitelial, la migración de IECs y la resistencia a apoptosis (Taupin et al., 2000).

La barrera intestinal se ve reforzada por la secreción de péptidos antimicrobianos (PAMs) por las IECs. Los enterocitos son capaces de producir algunos PAMs, como Reg3 γ (*lectin regenerating islet-derived protein 3 γ*), a lo largo del intestino delgado y del colon. Sin embargo, las **células de Paneth** son las únicas capaces de secretar muchos PAMs adicionales en las criptas del intestino delgado, incluyendo defensinas (criptidinas en el ratón), catelicidinas, fosfolipasa A2 y lisozima (Gallo and Hooper, 2012). Estos PAMs funcionan como antibióticos naturales, actuando frente a estructuras esenciales para la biología bacteriana, como la membrana extracelular o la pared celular de las bacterias

Gram-positivas (Mukherjee et al., 2014), lo que permite la regulación tanto de bacterias comensales como patógenas. Existen diferencias en la producción de PAMs a lo largo del tracto digestivo (Darmoul and Ouellette, 1996), que podrían servir para dar forma a la heterogeneidad de la composición y de la localización de las comunidades microbianas.

Reg3 γ se ha descrito recientemente como un mediador de la separación física entre el huésped y la microbiota en el intestino. De forma parecida a MUC2 en el colon, Reg3 γ actúa excluyendo a las bacterias de la superficie del intestino delgado, y su producción depende de señales de reconocimiento de microbiota comensal en las IECs (Vaishnava et al., 2011). La interacción entre PAMs y mucinas da lugar a una gran actividad antimicrobiana en la superficie epitelial (Meyer-Hoffert et al., 2008). Así, las acciones secretoras combinadas de las IECs limitan la cantidad y la diversidad de bacterias que pueden alcanzar la superficie epitelial o interactuar con el sistema inmune de la mucosa subyacente. La producción defectuosa de PAMs se ha ligado a disbiosis, y el sistema inmunológico puede verse comprometido. Una deficiencia en la expresión de α y β -defensinas se asocia con una menor eliminación de ciertos microorganismos. En pacientes con enfermedad de Crohn (CD), se observan niveles más bajos de α -defensinas 5 y 6, particularmente en aquellos con mutaciones en NOD2 (ver posteriormente). Por otra parte, ratones con una eliminación específica de MyD88 en el IEp, presentan una deficiencia en la producción de criptidinas y Reg3 γ , y desarrollan una colitis espontánea con la edad, asociada con un aumento en la translocación de bacterias comensales (Gong et al., 2010). Además, ratones deficientes en catelicidina son más susceptibles a desarrollar colitis inducida por sulfato de dextrano sódico (DSS), mientras que la administración intracolónica de catelicidina tiene un efecto protector frente al desarrollo de dicha colitis (Ho et al., 2013), lo que demuestra que, al menos en algunos casos, la protección frente a la inflamación es mediada por PAMs.

Las IECs también transportan inmunoglobulinas secretadas a través de la barrera epitelial. Tras su producción por las células plasmáticas en la lámina propia (LP), la Inmunoglobulina A secretada (sIgA), en forma de complejos diméricos, se une al receptor de Inmunoglobulina polimérico (pIgR) en la membrana basolateral de las IECs, y se transporta al lumen intestinal por un proceso de transcitosis (Johansen and Kaetzel,

2011). La colaboración entre las células B secretoras de IgA y las IECs proporciona un componente adaptativo a la barrera epitelial que regula las poblaciones bacterianas para mantener la homeostasis intestinal (Johansen et al., 1999) (Figura 1).

1.1.2. Muestreo del contenido intestinal por las IECs

Además de su función de barrera, el IEP tiene células especializadas en la captación y transcitosis de antígenos y microorganismos intactos del lumen para su posterior presentación al SI de la mucosa subyacente. Estas células se denominan células microfold o **células M**, y se concentran en el epitelio asociado a las estructuras linfoides intestinales, como las Placas de Peyer (PP) y los folículos linfoides aislados (ILFs) (Figura 1) (Mabbott et al., 2013). Las células M son capaces de captar antígenos del lumen intestinal de forma no selectiva, realizando un muestreo continuo del contenido del lumen. Sin embargo, en algunos casos, pueden captar antígenos de forma específica por endocitosis mediada por receptor. Numerosos estudios sugieren que las células M expresan receptores de inmunovigilancia en su membrana apical, como GP2 (Glicoproteína 2) o PrP^C (Proteína Prion Celular), que les permiten muestrear un rango de microorganismos patógenos y antígenos de forma específica y eficiente (Hase et al., 2009; Nakato et al., 2009). Este transporte activo de contenido del lumen a través de la barrera epitelial no es una función exclusiva de las células M. Las células de Goblet del intestino delgado también contribuyen a este proceso, transportando antígenos solubles de bajo peso molecular desde el lumen a las células dendríticas (DCs) subepiteliales (McDole et al., 2012). Sin embargo, se desconoce la contribución de estas dos vías al desarrollo de respuestas frente a patógenos o para el mantenimiento de tolerancia inmunológica.

Las **células enteroendocrinas** también son importantes sensores del contenido intestinal, estratégicamente posicionadas para detectar señales del lumen y transmitir estas señales a las poblaciones celulares adyacentes a través de la secreción de varios productos bioactivos (factores reguladores de la secreción de moco, del metabolismo del huésped o de la motilidad intestinal). Se han descrito alteraciones de las poblaciones enteroendocrinas en modelos experimentales de enteritis y colitis (Linden et al., 2005; Rubin et al., 2000), y en pacientes con EII (El-Salhy et al., 1997). Puesto que las células enteroendocrinas expresan TLRs, se ha sugerido que pueden participar directamente en

las respuestas inflamatorias del huésped mediante la secreción de citocinas y quimiocinas (Bogunovic et al., 2007; Palazzo et al., 2007). Hasta hace poco, se pensaba que las **células de Tuft** eran un tipo de célula enteroendocrina, dada su poca frecuencia y su función en la detección química del contenido del lumen intestinal mediante la expresión de proteínas implicadas en la sensación del gusto (α -gustducina, Trmp5) (Höfer et al., 1996). Sin embargo, recientemente Gerbé et al. han descrito a las células de Tuft como un cuarto linaje secretor independiente implicado en el inicio de respuestas tipo Th2 a infecciones por parásitos y sugieren que puedan ser sensores directos de la presencia de estos parásitos en el lumen intestinal (Gerbe et al., 2011, 2016).

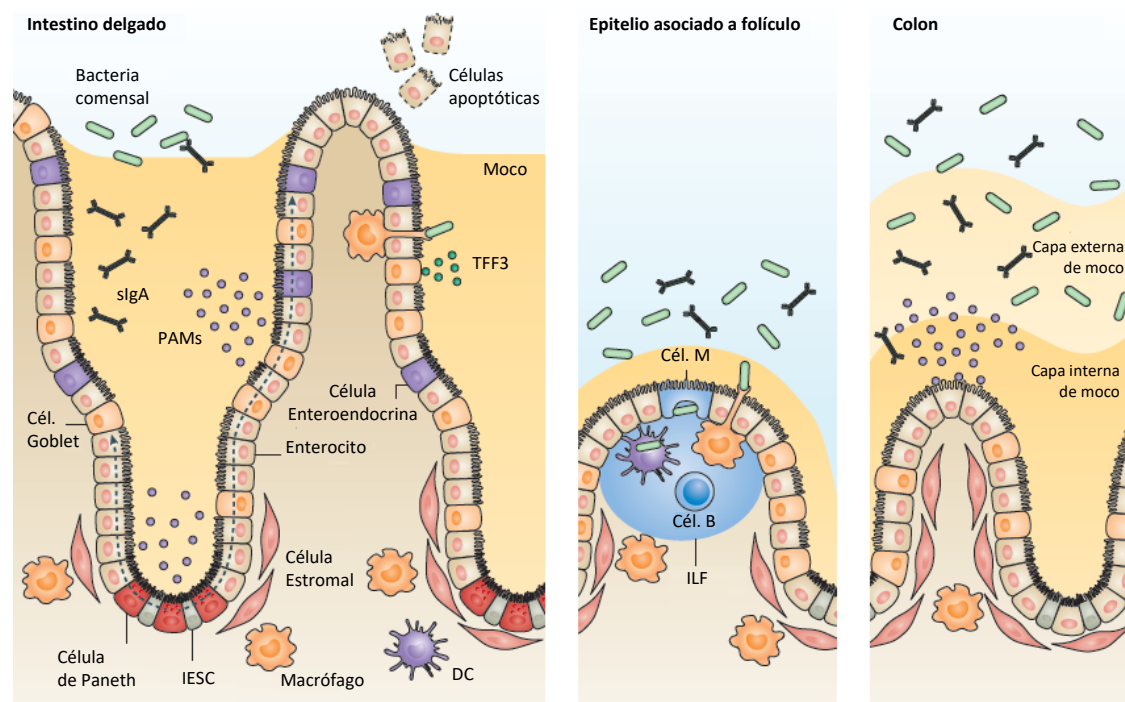


Figura 1. La barrera intestinal. Las IECs forman una barrera física y bioquímica que mantiene la separación entre los microorganismos presentes en el lumen y el sistema inmunológico de la mucosa intestinal. El nicho de las IESCs controla la renovación continua de la capa de IECs por las células madre residentes en las criptas. Las IESCs diferenciadas, a excepción de las células de Paneth, migran hacia arriba en el eje cripta-vellosidad. Las células de Goblet y de Paneth secretan moco y péptidos antimicrobianos (PAMs) para promover la exclusión de bacterias de la superficie epitelial, y la transcitosis y liberación de IgA secretada (slgA) contribuye a esta función de barrera. Las células M y las células de Goblet, median el transporte de antígenos y bacterias del lumen, a través de la barrera intestinal, hasta las DCs y los macrófagos residentes en el intestino muestrean el contenido del lumen mediante la emisión de dendritas transepiteliales. Figura de Peterson and Artis, 2014.

Además del muestreo del lumen intestinal por parte de las IECs, los fagocitos mononucleares subepiteliales también son capaces de detectar el contenido del lumen, emitiendo dendritas transepiteliales (TEDs) que interaccionan a su vez con las IECs (ver posteriormente) (Rescigno et al., 2001).

La capacidad de la barrera epitelial de percibir el contenido intestinal es esencial para limitar y controlar la translocación bacteriana y antigénica, y dirigir adecuadamente las respuestas a los patógenos presentes en el lumen.

1.2. IECs, centinelas de la homeostasis intestinal

Las IECs intestinales pueden detectar y responder a estímulos microbianos, reforzando su función de barrera. Para ello, expresan receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), que les permiten actuar como sensores del ambiente microbiano y participar en la coordinación de respuestas inmunológicas apropiadas, tanto antimicrobianas como inmunorreguladoras. Aunque la función de los PRR se ha estudiado principalmente en la células inmunitarias, células presentadoras de antígeno y poblaciones celulares efectoras, recientemente se ha evidenciado un papel de estos receptores en el control de la funcionalidad de las IECs (Peterson and Artis, 2014).

Se han identificado muchas clases de PRRs, incluyendo las familias de receptores Toll-like (TLRs), NOD-like (NLRs) y RIG-1-like (RLRs), aunque las dos primeras han recibido mayor atención. (Akira et al., 2006). Se expresan una gran variedad de PRRs en las IECs. De los TLRs, TLR3, 7 y 8 se localizan exclusivamente en endosomas y TLR1, 2, 4 y 5 en la membrana citoplasmática. TLR5 está únicamente presente en la membrana basolateral, donde no tiene ningún contacto con la microbiota del lumen intestinal. TLR9 es el único que se expresa tanto en la membrana apical, basolateral y en endosomas. Entre los NLRs presentes en las IECs, encontramos a NOD1, NOD2, NLRC4, NLRP3 y NLRP6 entre otros (Figura 2).

1.2.1 Señalización por PRRs

Los PRRs reconocen componentes esenciales para la supervivencia de los microorganismos, que se conocen como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). También reconocen moléculas de origen endógeno asociadas al daño celular y tisular, conocidas como alarminas. Ambos tipos de señales transmiten un mensaje similar y dan lugar a una respuesta similar, pudiéndose clasificar como distintos subgrupos de un conjunto de patrones moleculares asociados al daño (DAMPs). Curiosamente, las células efectoras de la inmunidad innata y adaptativa pueden secretar alarminas, y normalmente lo hacen tras ser activadas por PAMPs u otras alarminas (Bianchi, 2007).

Los TLRs son receptores transmembrana con un dominio extracelular que posee motivos repetidos ricos en leucina (LRRs), implicados en el reconocimiento del agente infeccioso, que puede ser derivado de virus, hongos, bacterias, protozoos o parásitos. También posee un dominio intracelular TIR (*Toll/IL-1Receptor*), con homología al receptor de la IL-1 β . Hasta la fecha, se han descrito 12 TLRs en mamíferos con distintas localizaciones celulares (membrana citoplasmática, endosomas). Todos ellos, a excepción de TLR3, señalizan a través de la proteína adaptadora MyD88, la cual recluta a cinasas de la familia IRAK (*interleukin-1 receptor-associated kinase*) a través de su dominio de muerte (DD). Éstas, interactúan con TRAF6 (*TNF-receptor associated factor 6*) que a su vez activa a TAK1 (*transforming growth factor beta activated kinase-1*) y concluye en la activación del factor de transcripción NF- κ B (nuclear factor- κ B), o en la activación de la vía de las MAPK (*mitogen-activating protein kinase*) y el factor de transcripción AP-1 (*activator protein-1*). La translocación de estos factores al núcleo, controla la expresión de citocinas inflamatorias. El receptor TLR3 señala de forma independiente a MyD88, reclutando la proteína adaptadora TRIF (*TIR-domain-containing adaptor protein-inducing interferon- β*). Esta señalización dependiente de TRIF también es capaz de activar NF- κ B y la vía de las MAPK, tanto interaccionando con TRAF6, como activando RIP1 (*receptor-interacting serine/threonine-protein kinase*), que activa a su vez a TAK1. Además, TRIF es capaz de interaccionar con TRAF3, que activa factores reguladores de interferón (IRFs) que controlan la expresión de Interferones de tipo 1 (IFN-I). Los receptores TLR4 son capaces

de señalar tanto por la vía dependiente de MyD88 como por la vía independiente (Figura 2A) (Kumar et al., 2009).

Los NLRs son receptores citoplasmáticos cuya estructura común se caracteriza por un dominio central de oligomerización y unión de nucleótidos (NOD) y un extremo carboxilo de repeticiones de leucina (LRRs). Los NLRs se pueden dividir en dos subfamilias en función de su dominio amino-terminal: proteínas con dominios reclutadores y activadores de caspasa (CARDs), como son NOD1, NOD2 y NLRC4, o con un dominio relacionado pero no caracterizado, como son NLRX1, NLRC3 y NLRC5, y proteínas con un dominio pirina, denominadas NLRP (Coll and O'Neill, 2010). En concreto, NOD1 y NOD2 juegan un papel crucial en la detección de bacterias intestinales. Reconocen distintos productos de la degradación del peptidoglicano (PG), ácido meso-diaminopimélico (ieDAP) y muramil dipéptido (MDP) respectivamente, ambos presentes tanto en bacterias Gram negativas como Gram positivas (Kufer et al., 2006). Tras la unión con el ligando, el receptor forma homodímeros y recluta la proteína adaptadora RIP2 (*Receptor interacting protein 2*) a través de sus dominios CARD. A continuación, RIP2 sufre un proceso de ubiquitinización e interactúa con TAK1, dando lugar a la activación de las vías de señalización de NF- κ B y MAPK. Estas señales conllevan un aumento en la expresión de citocinas proinflamatorias y la liberación de péptidos antimicrobianos (Chen et al., 2009).

Las proteínas NOD también pueden actuar de forma independiente de RIP2 y de la señalización de NF- κ B. Travassos et al. demostraron que, tras la unión con el ligando, NOD1 y NOD2 son capaces de interactuar directamente con el regulador de autofagia ATG16L1 e iniciar la autofagia de determinadas bacterias invasoras (Travassos et al., 2010). Por otra parte, Lipinski et al. describieron un papel de NOD2 en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), confiriendo protección frente a la infección por *Listeria monocystogenes* (Lipinski et al., 2009).

Además de NOD1 y NOD2, otros NLRs, como NLRP1, NLRP3 y NLRC4, han sido sujeto de amplio estudio. Estos receptores forman complejos de elevado peso molecular junto con otras proteínas accesorias y efectoras, denominados inflammasomas, cuya principal función es el procesamiento de la citocina proinflamatoria IL-1 β a su forma activa (Martinon et al., 2009). Se ha visto que las ROS son capaces de activar el inflammasoma

NLRP3, lo que podría constituir un mecanismo de intercomunicación entre NLRs (Dostert et al., 2008) (Figura 2A).

1.2.2. Regulación de las vías de PRRs en las IECs.

A diferencia de las regiones estériles del organismo, donde el reconocimiento de microorganismos desencadena cascadas altamente inflamatorias, en el intestino, la mayor parte de los patrones moleculares reconocidos pertenecen a la flora comensal, por lo que son necesarios mecanismos para mantener una señalización por PRRs atenuada. En este contexto, el SI debe diferenciar las señales derivadas de microorganismos comensales de aquellas derivadas de microorganismos patogénicos, y así elaborar una respuesta inmunológica adecuada. Para ello, las IECs expresan una variedad de reguladores negativos de la señalización pro-inflamatoria dependiente de PRRs (Abreu, 2010; Coll and O'Neill, 2010). La pérdida de estas vías reguladoras, o la activación constitutiva de NF- κ B, lleva a una mala regulación de la homeostasis epitelial y a una inflamación exagerada. Además, estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que se establecen diferentes respuestas a la estimulación en las IECs en función de la localización de los TLRs. Un ejemplo es la señalización a través de TLR9; aunque la exposición a ligandos de TLR9 en el polo basolateral de la célula epitelial promueve la activación canónica de NF- κ B y su translocación al núcleo, su estimulación en el polo apical, tanto a nivel de la membrana citoplasmática como a nivel del endosoma, promueve la inhibición NF- κ B (Lee et al., 2006) (Figura 2A). Este concepto de distribución polarizada se ha trasladado a la regulación de otros PRRs. FRMPD2 (*FERM and PDZ domain-containing*) es un regulador positivo de la activación de NF- κ B mediada por NOD2, y actúa como una proteína adaptadora, promoviendo la localización basolateral de NOD2 a través de interacciones con el dominio LRR. Las variantes de *NOD2* asociadas a enfermedad de Crohn contienen mutaciones en este dominio LRR, por lo que estas proteínas NOD2 mutantes carecen de la capacidad de interactuar con FERMP2 para colocalizar en la membrana basolateral de las IECs, y por tanto para responder a la estimulación con ligandos de NOD2 (Lipinski et al., 2012). Por otra parte, se ha visto que la producción de ROS dependiente de bacterias comensales en las IECs, es capaz de atenuar la activación de NF- κ B inducida por los PRRs (Kumar et al., 2008) (Figura 2A).

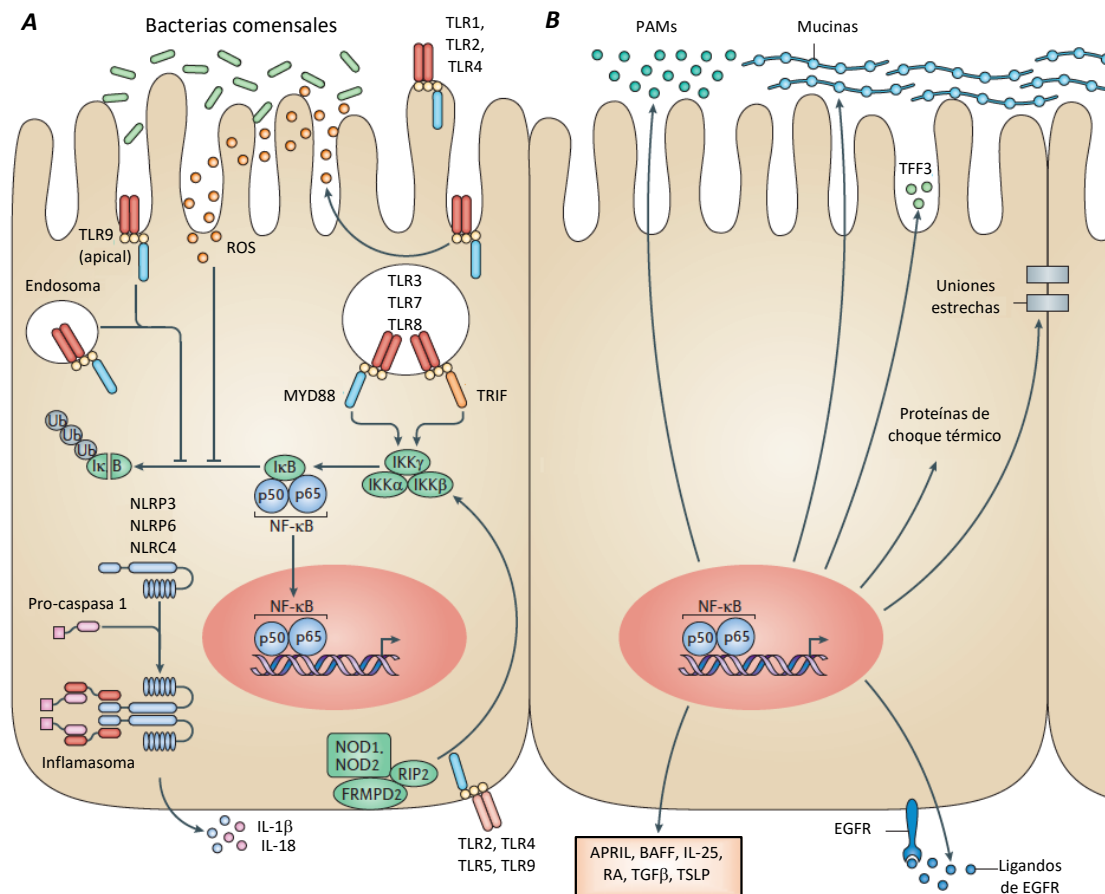


Figura 2. Reconocimiento de microorganismos en las IECs. (A) Los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), como TLRs y los NLRs NOD1 y NOD2, reconocen patrones moleculares asociados a microorganismos, y dan lugar a la activación de las vías de señalización de NF-κB y de MAPK. Otros NLRs, como NLRP3, NLRP6 y NLRC4, forman complejos de inflamasoma junto con pro-caspasa 1, para la activación de las interleucinas IL-1β e IL-18. La expresión polarizada de los PRRs en la membrana apical o basolateral de las IECs, puede contribuir a la discriminación entre señales microbianas procedentes de microorganismos comensales o patógenos. (B) El reconocimiento microbiano promueve la supervivencia y reparación celular (mediada por la expresión de TFF3, proteínas de choque térmico, y ligandos de EGFR), potencia la función de barrera (mediante el aumento de la producción de mucinas y PAMs), y promueve las respuestas inmunorreguladoras [mediadas por APRIL (ligando A inductor de proliferación), BAFF (factor activador de la célula B), IL-25, ácido retinoico, TGFβ (factor de crecimiento transformante β) y TSLP (linfopoyetina estromal tímica)]. Figura de Peterson and Artis, 2014.

1.2.3. Papel de los PRRs en la homeostasis de la barrera intestinal

El evidente papel de los PRRs en el mantenimiento de la homeostasis intestinal y en la reparación del daño epitelial, surge de estudios con ratones deficientes en distintos TLRs o en proteínas adaptadoras de su vía de señalización. De esta forma, Medzhitov et al. demostraron que las señales derivadas de bacterias comensales contribuyen a la homeostasis epitelial en el modelo de colitis inducida químicamente por DSS (Rakoff-Nahoum et al., 2004). Estos y otros estudios definen el papel beneficioso de la señalización intrínseca de los TLRs en las IECs, implicada en la expresión de proteínas de choque térmico citoprotectoras, de ligandos del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Brandl et al., 2010) y de TFF3 (Podolsky et al., 2009), y en la potenciación de la integridad de complejos de uniones estrechas apicales (Cario et al., 2004). Además, la eliminación específica de elementos necesarios para la activación del factor de transcripción NF- κ B en la señalización de TLRs en el ratón, como la quinasa del inhibidor de NF- κ B (I κ B), denominada complejo IKK, o el modulador esencial de NF- κ B (NEMO), potencian la colitis inducida por DSS y la colitis espontánea (Greten et al., 2004; Nenci et al., 2007). Estos estudios confirman el papel esencial de los TLRs, además de otras vías de señalización de NF- κ B, en homeostasis y en la reparación epitelial. Así mismo, las ROS producidas en respuesta a bacterias patogénicas y comensales, además de sus efectos microbicidas, promueven la formación de adhesiones focales en las IECs, necesarias para la migración celular y la reparación de heridas (Swanson et al., 2011) (Figura 2B).

Se ha visto que los NLRs también tienen un papel en la regulación de las respuestas inmunológicas y son importantes en la regulación de la homeostasis intestinal en las IECs. La identificación de NOD2 como primer locus genético de susceptibilidad de la enfermedad de Crohn (Ogura et al., 2001), ha suscitado interés en este PRR y en la proteína NOD1, en su papel tanto en las células inmunológicas como en el IEp. La deficiencia en estos receptores confiere susceptibilidad al desarrollo de colitis experimental (Penack et al., 2009) y la sobreexpresión de NOD2 en células MHCII⁺ protege frente al desarrollo de colitis inducida por TNBS (Yang et al., 2007). Una señalización alterada de NOD2 modifica la composición de la flora comensal, lo que puede estar asociado con una secreción defectuosa de PAMs en el intestino y una respuesta inmune

aberrante frente a la flora comensal (Fukata and Arditi, 2013; Petnicki-Ocwieja et al., 2009). Por otra parte, los inflammasomas, formados por caspasa 1 y NLRs (como NLRP3, NLRP6, NLRP12 o NLRC4), también tienen una compleja influencia en la inflamación (Chen and Nunez, 2011). En general, la expresión de estos complejos de inflammasomas confiere resistencia frente al desarrollo de colitis inducida por DSS, TNBS (2,4,6 trinitrobenzenesulfonic acid) y frente al desarrollo de tumores colorrectales inducidos por Azoximetano (AOM) y DSS (ver posteriormente) (Hirota et al., 2011; Hu et al., 2010; Zaki et al., 2010), y están también implicados en la protección o susceptibilidad frente a infecciones por determinados patógenos como *Citrobacter rodentium* o *Salmonella typhimorium* (Anand et al., 2012; Nordlander et al., 2014; Song-Zhao et al., 2014). En concreto, NLRP6 se expresa en grandes cantidades en las IECs y en miofibroblastos intestinales, jugando un papel crucial en el proceso de curación de heridas (Normand et al., 2011). Además, NLRP6 parece tener gran importancia en la composición de la microbiota comensal, de manera que ratones deficientes en NLRP6 presentan una expansión de bacterias de la familia *Prevotellaceae*, y una exacerbación de la colitis inducida por DSS (Elinav et al., 2011). En un estudio reciente se ha observado que NLRP6 está implicado en la regulación de la secreción de moco por las células de Goblet, y su deficiencia daría lugar a una barrera de moco debilitada, lo que apoya el impacto de NLRP6 en enfermedad intestinal (Wlodarska et al., 2014).

Aunque el reconocimiento de los microorganismos comensales por las IECs generalmente induce mecanismos protectores del daño tisular o infecciones, también pueden dar lugar al desarrollo de tumores cuando dichas respuestas se desregulan. De hecho, la señalización de TLR a través de MyD88 y la activación aberrante de NF- κ B en las IECs se ha implicado en el desarrollo y la progresión tumoral en distintos modelos de cáncer colorrectal murinos, tanto genéticos (Rakoff-Nahoum and Medzhitov, 2007) como inducidos tras inflamación crónica (Masayuki Fukata et al., 2007; Greten et al., 2004). Además, la señalización por MyD88 puede estabilizar proteínas oncogénicas clave, como MYC (Lee et al., 2010), y NF- κ B puede potenciar la señalización de WNT en IECs diferenciadas, promoviendo su desdiferenciación (Schwitalla et al., 2013).

1.3. El Sistema Inmunológico de la mucosa intestinal

1.3.1. Tejidos linfoides asociados a mucosa intestinal (GALT)

El sistema inmunológico de las mucosas es la parte del sistema inmunológico subyacente a las superficies mucosas y en contacto directo con el ambiente antigénico externo. Los elementos linfoides del GALT se pueden dividir en dos grupos:

- Tejido linfoide organizado: folículos responsables de la fase de la inducción de la respuesta inmunológica.
- Tejido linfoide difuso: leucocitos diseminados distribuidos a lo largo del epitelio y de la LP de la mucosa, que constituyen los sitios efectores.

1.3.2. Tejido linfoide organizado

El tejido mejor caracterizado del GALT son las PP, que son agregados macroscópicos, localizados en la submucosa a lo largo del intestino delgado, y cuyo tamaño se incrementa desde el duodeno hasta el íleon (Cornes, 1965). A diferencia de los ganglios linfáticos, las PP no están encapsuladas y no tienen vasos linfáticos aferentes, puesto que los antígenos se captan directamente del lumen por las células M, localizadas en el IEp asociado al folículo, y lo transportan a la región subyacente rica en DCs, denominada como subepitelial (SED). Las PP maduras consisten en folículos de células B, rodeados de un área parafolicular rica en células T, y siempre contienen centros germinales (CG), lo que indica una estimulación continua presumiblemente en respuesta a antígenos del lumen. Encontramos también estructuras similares a lo largo del colon, denominadas placas colónicas (Owen et al., 1991).

El GALT también incluye pequeños agregados linfoides, denominados tejidos linfoides aislados solitarios (SILTs), que sólo se pueden detectar microscópicamente, y que varían en tamaño desde pequeñas criptoplasmas hasta **folículos linfoides aislados** maduros (ILFs), lo que representa distintos estados de maduración (Herbrand et al., 2008). Los ILFs consisten principalmente en un conjunto de linfocitos B sin una zona clara de linfocitos T, y, de forma similar a las PP, contienen centros germinales. De hecho, se consideran lugares importantes en el cambio de clase a IgA independiente de linfocitos T (Tsuji et al.,

2008). Los folículos linfoides maduros son más frecuentes en el íleon y en el colon, lo que concuerda con las regiones de mayor carga bacteriana (Bouskra et al., 2008).

Por último, los ganglios linfáticos que drenan el intestino son los más grandes del cuerpo, lo que refleja la constante exposición del intestino al ambiente, y son conocidos como **ganglios mesentéricos** (MLN). Representan un “cruce de caminos” entre la recirculación periférica y la mucosa intestinal (Mowat, 2003). Los múltiples vasos linfáticos aferentes llevan la linfa al interior de los ganglios, la cual se filtra lentamente a través de la corteza del ganglio linfático y llega hasta la médula. En su trayecto, se encuentra con linfocitos B y T en la corteza externa e interna respectivamente, y puede dar lugar a su activación como parte de la respuesta inmune adaptativa.

1.3.3. Tejido linfoide difuso

La LP y el IEp son las regiones efectoras del sistema inmunológico intestinal, y en conjunto contienen la mayor población de linfocitos T, células plasmáticas y macrófagos del cuerpo.

1.3.3.1. IEp

El IEp de los mamíferos contiene linfocitos T localizados en la membrana basal entre los enterocitos, a una frecuencia de 10-15 **linfocitos intraepiteliales** (IELs) por cada 100 IECs (Ferguson, 1977). Los IELs presentan un gran rango de actividades reguladoras y efectoras (Cheroutre et al., 2011) y se dividen en dos grandes grupos:

- Linfocitos T convencionales o ‘tipo A’, que expresan el receptor TCR $\alpha\beta$, y los correceptores CD8 o CD4. Se piensa que derivan de linfocitos T vírgenes, activados en ganglios linfáticos secundarios.
- Linfocitos T no convencionales o ‘tipo B’, que no expresan CD8 β , pero sí el homodímero CD8 $\alpha\alpha$ y el receptor de TCR $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$. La ontogenia de estas células es motivo de debate, pero hay evidencias que sugieren que la mayoría de los linfocitos T $\alpha\beta$ CD8 $\alpha\alpha$ derivan del timo, diferenciándose posteriormente en el intestino (Hayday and Gibbons, 2008).

Casi todos los IELs, independientemente de su fenotipo, expresan la integrina $\alpha E\beta 7$, también conocida como CD103. La unión de CD103 a su ligando E-cadherina en los enterocitos, ayuda al anclaje de los IEL en el epitelio y puede tener un papel funcional (Schon et al., 1999) Esto es particularmente importante en respuestas de memoria dependientes de células T CD8⁺ (Gebhardt et al., 2013), las cuales quedan ancladas al IEL por este mecanismo.

1.3.3.2. LP intestinal

- Linfocitos T

Tras la presentación antigénica en los tejidos linfoides secundarios, las células T efectoras convencionales recirculan por el cuerpo antes de establecerse en el intestino, donde ejercen su función tolerogénica o inflamatoria. En la LP, encontramos tanto linfocitos T CD4⁺ como CD8⁺, en un ratio aproximado de 2/1, y la mayoría de ellos presentan un fenotipo efector de memoria. El compartimento de células T CD4⁺ en la LP es muy diverso, conteniendo, entre otras subpoblaciones, células productoras de IL-17 (Th17), así como células T reguladoras productoras de IL-10 que expresan FOXP3 (Treg), y células T reguladoras tipo 1 (Tr1), que también producen IL-10 pero no expresan FOXP3 (Ivanov et al., 2006; Maynard et al., 2007). Sin embargo, la distribución y función de estas poblaciones varía a lo largo del intestino, debido, al menos en parte, a las variaciones en el contenido del lumen intestinal, cuyas señales van a condicionar a las DCs para dirigir la diferenciación hacia unas u otras subpoblaciones linfocitarias. Aunque las células T CD4⁺ productoras de IL-10 están presentes en toda la mucosa intestinal, son más abundantes en el colon, donde la mayoría de ellas son Treg (Maynard et al., 2007). Se ha descrito una correlación inversa entre el número de células Treg y Th17 a lo largo del intestino del ratón; siendo estas últimas más frecuentes en el duodeno del ratón y disminuyendo progresivamente hasta el colon (Denning et al., 2011). En humanos, al contrario que en el ratón, se ha visto una mayor proporción de células Th17 en la LP del colon y del íleon comparado con el yeyuno (Sathaliyawala et al., 2013).

- Células Plasmáticas

Al contrario que la mayoría de los tejidos sanos, la LP contiene numerosas células plasmáticas, cuya densidad es mayor en las regiones más proximales y distales del tubo digestivo (Brandtzaeg, 2010). La maduración de células B vírgenes a células plasmáticas productoras de IgA, depende de su interacción con las células dendríticas. En la LP, la producción de IgA en las células plasmáticas puede ser dependiente de células T, mediante su interacción con CD40L, o independiente de células T, mediada por la estimulación con APRIL y BAFF. Este proceso está directamente regulado por las IECs, que producen APRIL y BAFF en respuesta a la señalización por NF- κ B inducida por bacterias comensales (He et al., 2007; Xu et al., 2007). El 90% de las células plasmáticas del colon producen IgA, y ésta es casi completamente dependiente de la microbiota (Brandtzaeg and Johansen, 2005). Además, el receptor de IgA polimérica (pIgR), necesario para el transporte de IgA al lumen, presenta un patrón de expresión dependiente de la microbiota en el intestino grueso (Brandtzaeg et al., 2005).

- Fagocitos mononucleares

Los fagocitos mononucleares representan la población de leucocitos más abundante de la mucosa intestinal en estado basal (Hume et al., 1984), dentro de los cuales, podemos distinguir dos grupos: macrófagos y DCs, ambos implicados en la captación y presentación de antígenos en el intestino. Los fagocitos mononucleares son capaces de emitir TEDs a través del epitelio (Chieppa et al., 2006) para la captación del antígeno. Este proceso es dependiente de CX₃CR1 (Niess et al., 2005), y la membrana epitelial no se ve afectada debido a que los fagocitos expresan moléculas de uniones estrechas en su superficie (Rescigno et al., 2001). Dado que ambos tipos celulares expresan niveles similares de Complejo Mayor de Histocompatibilidad de Clase II (MHC II) y de la integrina CD11c, su clasificación ha sido sujeto de controversia durante los últimos años. Afortunadamente, en la actualidad se conocen marcadores específicos que han permitido caracterizar de forma más precisa a estas células (Pabst and Bernhardt, 2010).

Los **macrófagos** se caracterizan por la expresión del receptor de alta afinidad de IgG (Fc γ R1), CD64 (Tamoutounour et al., 2012), y se localizan fundamentalmente en la LP

intestinal, próximos a la monocapa epitelial (Hume et al., 1984). Su frecuencia varía a lo largo del tracto GI, siendo más frecuentes en el colon que en el intestino delgado en humanos y roedores (Denning et al., 2011; Nagashima et al., 1996). Ejercen múltiples funciones, como la eliminación de células apoptóticas o senescentes, a través de sus receptores carroñeros, y la renovación de las IECs, regulando la integridad de la barrera intestinal y ayudando a mantener la homeostasis tisular (Nagashima et al., 1996; Rani et al., 2011). Sin embargo, se conoce mejor su papel como célula efectora innata: los macrófagos son células con una elevada actividad fagocítica y bactericida, y están idealmente localizados para captar y destruir cualquier material que atraviese la barrera intestinal. Son capaces de emitir TEDs de manera mucho más eficiente que las DCs CD103⁺ (Farache et al., 2013), a las cuales les transfieren el antígeno en un proceso dependiente de proteínas de uniones GAP (Mazzini et al., 2014). A diferencia de muchos otros tejidos, los macrófagos de la mucosa intestinal proceden de la continua llegada de monocitos de la sangre, que se diferencian localmente bajo el control del ambiente de la mucosa (Bain et al., 2014). Las IECs condicionan a estos macrófagos hacia un fenotipo tolerogénico a través de la producción de TSLP, TGFβ, ácido retinoico (RA), y el contacto directo con semaforina 7A (SEMA7A), expresada en su superficie. Estos macrófagos, permanecen en la LP donde favorecen la expansión y el mantenimiento de células T reguladoras (Treg) a través de la producción de grandes cantidades de IL-10 (Hadis et al., 2011) (Figura 3). Además, la capacidad de los macrófagos intestinales para responder a la IL-10 es fundamental en el mantenimiento de la homeostasis local, de tal forma que ratones con una deficiencia del receptor de la IL-10 específica en estas células, desarrollan una colitis espontánea (Zigmond et al., 2014). Por otra parte, los macrófagos intestinales también producen IL-1β en respuesta a la microbiota, lo que podría tener una acción análoga en el mantenimiento de la actividad de las células Th17 intestinales en estado basal (Shaw et al., 2012).

Las **DC clásicas** (cDCs) se localizan a lo largo de toda la LP intestinal, pero también en otras localizaciones del GALT (PP, ILFs, MLN). Su principal función consiste en el muestreo de antígenos propios y extraños, para posteriormente migrar a los ganglios linfáticos de drenaje, en este caso los MLN, y presentar péptidos antigénicos a las células T vírgenes, induciendo su proliferación y diferenciación. De forma similar a lo que sucede

con los macrófagos intestinales, las IECs condicionan a las cDCs hacia un fenotipo tolerogénico (Rimoldi et al., 2005), promoviendo la diferenciación de células T CD4⁺ vírgenes hacia células Treg y la maduración de linfocitos B a células plasmáticas secretoras de IgA. Éstas adquieren un fenotipo de migración a la LP intestinal tras el encuentro con las cDCs tolerogénicas, en un mecanismo mediado por la producción de RA (Iwata et al., 2004; Mora and von Andrian, 2008) (Figura 3). Las cDCs juegan por tanto un papel crucial en la homeostasis intestinal, induciendo respuestas de tolerancia a antígenos inofensivos, e iniciando una respuesta protectora frente a patógenos intestinales. Suponen un enlace esencial entre la respuesta inmunológica innata y adaptativa.

La mayor parte de las cDCs intestinales de la LP expresan la integrina CD103 (Johansson-Lindbom et al., 2005), necesaria para su migración a los MLN por la linfa aferente (Schulz et al., 2009). Las cDCs CD103⁺ intestinales pueden dividirse en dos grandes grupos: cDCs CD103⁺ CD11b⁺ y CD103⁺ CD11b⁻, que difieren en su localización, factores de transcripción y función. La proporción relativa de estos tipos de cDCs varía a lo largo del intestino, siendo las DCs CD103⁺ CD11b⁺ predominantes en el duodeno, mientras que las cDCs CD103⁺ CD11b⁻ son las más abundantes en el colon y en el **GALT** (Bogunovic et al., 2009; Denning et al., 2011). Las cDCs CD103⁺ de la LP y de los MLN presentan una mayor capacidad para generar células Treg Foxp3⁺ inducidas (iTregs), debido en parte a su capacidad de producir ácido retinoico (Coombes et al., 2007). Estudios recientes parecen indicar que las células que promueven esta generación de células iTreg son las cDCs CD103⁺ CD11b⁻. Además, expresan altos niveles de indoleamina 2,3 dioxigenasa (IDO), lo que favorece el mantenimiento de la homeostasis, controlando el balance entre las células Treg y las células T efectoras Th1 y Th17 *in vivo* (Matteoli et al., 2010; Persson et al., 2013). Por otra parte, las cDCs CD103⁺ CD11b⁺ parecen más eficientes en inducir la polarización a células Th17 (Persson et al., 2013; Wenzel et al., 2015). De hecho, ratones con una reducción selectiva de cDCs CD103⁺ CD11b⁺ en el intestino delgado y una pérdida casi completa de estas células en los MLN, presentan niveles reducidos de células Th17 en el intestino delgado, en los MLN, y en el colon, a pesar de tener valores normales de células T CD4⁺ y de células Th1 (Persson et al., 2013). Las señales que imprimen a las cDCs la capacidad de generar células T efectoras *in vivo* no están claras, aunque se ha sugerido que los PRRs y la señalización por MyD88 podrían

tener un papel importante (Hoshi et al., 2012). Existen ligandos de los TLR2, TLR5, y TLR9, que inducen la producción de IL-6 en las cDCs CD103⁺ CD11b⁺ *in vitro* y promueven la diferenciación a células Th17 (Persson et al., 2013). En este sentido, es interesante destacar que las cDCs CD103⁺ CD11b⁺ y las cDCs CD103⁺ CD11b⁻ presentan un patrón de expresión de PRRs parcialmente diferente, lo que sugiere que puedan responder de forma distinta a las señales microbianas del lumen intestinal (Fujimoto et al., 2011).

Por último, existe un tercer grupo minoritario de cDCs CD103⁻ mieloides en la LP intestinal, que expresan niveles heterogéneos de CD11b, y que tienden a producir citocinas proinflamatorias e iniciar respuestas Th1 y Th17 (Cerovic et al., 2013). Sin embargo, su linaje es todavía motivo de debate (Schulz et al., 2009; Weber et al., 2011). También se han hecho progresos en la identificación de subconjuntos de cDCs en la LP del intestino delgado en humanos. La mayoría de estas cDCs en estado basal también expresan CD103, y, de forma similar al ratón, pueden dividirse en dos subconjuntos; una mayor población de cDCs que expresan SIRPα e IRF4, posiblemente equivalentes a las cDCs CD103⁺ CD11b⁺ del ratón, y una población minoritaria que expresa CD141 y que parecen equivalentes a las cDCs CD103⁺ CD11b⁻ en ratón (Bachem et al., 2010; Persson et al., 2013). Aún queda por determinar si existe un equivalente humano de las DCs CD103⁻ murinas.

En la mucosa intestinal también encontramos **células dendríticas plasmacitoides** (pDCs), aunque en menor frecuencia que las células dendríticas clásicas. Parecen estar restringidas al intestino delgado, sin apenas presencia en el colon (Wendland et al., 2007). De forma similar a las pDCs de otros tejidos, las pDCs intestinales se han asociado a inducción de tolerancia y pueden tener papeles protectores en modelos experimentales de inflamación intestinal y alergia alimentaria (Mizuno et al., 2012; Smit et al., 2011). Sin embargo, se desconoce la función exacta de las pDCs en el intestino, y solo han sido estudiadas en el ratón.

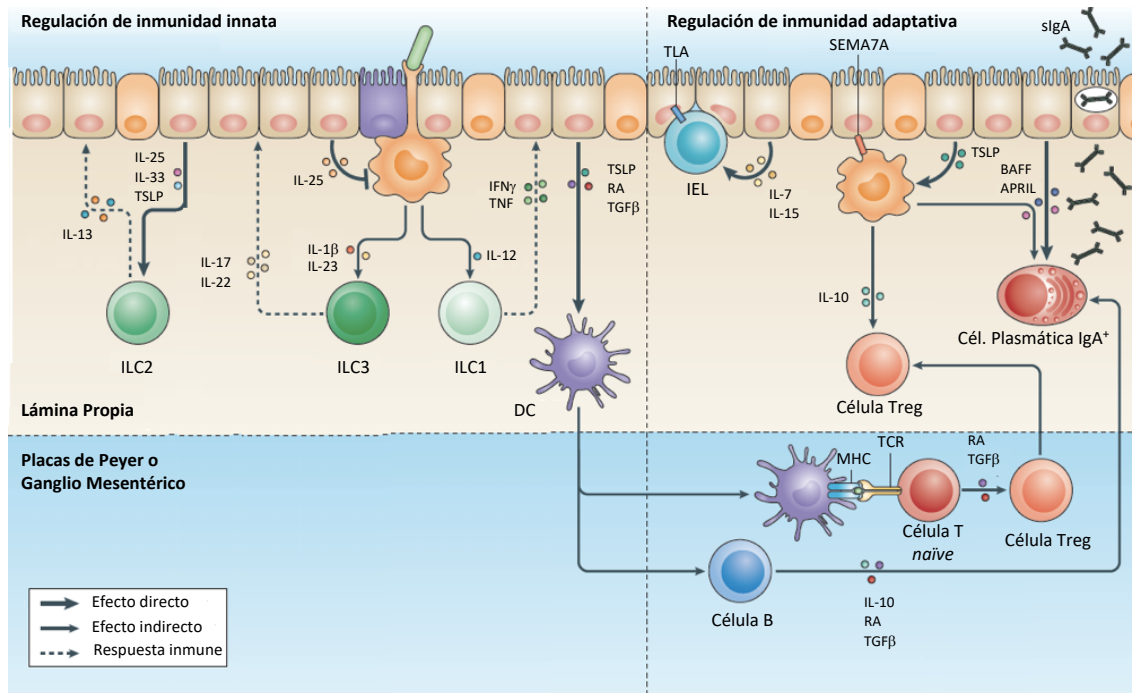


Figura 3. Regulación de la inmunidad innata y adaptativa por las IECs. Las citocinas IL-25, IL-33 y TSLP, derivadas de IECs estimulan a las células linfoides innatas del grupo 2 (ILC2), mientras que la IL-25 inhibe la función de las ILC1 e ILC3 al limitar la producción de citocinas proinflamatorias en los macrófagos. Las IECs condicionan a las DCs y a los macrófagos hacia un fenotipo tolerogénico a través de la producción de TSLP, TGFβ y RA. Estas DCs promueven la diferenciación de células T CD4⁺ vírgenes hacia células Treg y la maduración de células B a células plasmáticas secretoras de IgA, las cuales migran a la LP intestinal. Las células Treg en la LP son expandidas por los macrófagos productores de IL-10. La producción de APRIL y BAFF por las IECs y macrófagos, promueve el cambio de clase a IgA en las células B en la LP intestinal. Figura modificada de Peterson and Artis, 2014.

- Células Linfoides Innatas (ILCs)

Las ILCs son un grupo de poblaciones celulares identificadas recientemente que aunque carecen de características propias de los linfocitos T, como los receptores específicos de antígeno, poseen múltiples similitudes funcionales con ellos desempeñando un papel crucial en la homeostasis intestinal (Spits and Cupedo, 2012). Se encuentran en superficies de barrera, incluyendo pulmón (Monticelli et al., 2012), piel (Kim et al., 2013) e intestino (Tait Wojno and Artis, 2012), tanto en ratón como en humano, donde actúan como reguladores de la homeostasis del tejido, inflamación y respuesta temprana a infecciones. Las ILCs están reguladas, en parte, por señales derivadas de IECs (Figura 3), y presentan heterogeneidad fenotípica y funcional (Walker

et al., 2013). Desde un punto de vista funcional, las ILCs pueden dividirse en células con actividad citotóxica, similares a los linfocitos T CD8⁺, y células con características de linfocitos T CD4⁺. Entre las primeras encontraríamos a las células Natural Killer (NK), mientras que en las segundas podemos distinguir tres subgrupos de ILCs en función de los requerimientos para su desarrollo y de su patrón de expresión de citocinas; ILCs de grupo 1, ILCs de grupo 2, e ILCs de grupo 3, con similitudes funcionales con las poblaciones adaptativas de células T CD4⁺ Th1, Th2, y Th17, respectivamente.

El grupo 1 o **ILC1** se caracterizan por la producción de IFN γ , citocina asociada a células Th1, y de factor de necrosis tumoral (TNF), en respuesta a IL-12 e IL-15 (Spits et al., 2013). A diferencia de las NKs, las ILC1 no poseen un efecto citotóxico directo. Varios estudios recientes sugieren un posible papel de estas células en inflamación intestinal en modelos de colitis murina y en EII en humanos (Bernink et al., 2013; Fuchs et al., 2013).

El grupo 2 de ILCs, o **ILC2**, produce IL-5 e IL-13, citocinas asociadas a las células Th2 (Spits et al., 2013). Estos factores contribuyen a una respuesta innata temprana frente a infecciones intestinales por parásitos tipo helmintos y promueven una respuesta epitelial protectora, con hiperplasia de las células de Goblet y una secreción de moco aumentada. La producción por el IEp de las citocinas IL-25, IL-33 y TSLP en respuesta a señales de la microbiota, favorecen la proliferación y activación de las ILC2, lo que refuerza la idea de que el IEp es un integrador de las señales del entorno para la regulación de la función de las células inmunológicas (Neill et al., 2010). Por otra parte, las ILC2 presentes en el pulmón están involucradas en la hiperrespuesta de las vías aéreas y la reparación tisular en modelos murinos de alergia y de infección con el virus de la gripe (Monticelli et al., 2011). Esto sugiere que las ILC2 podrían tener una función análoga en el intestino, en la alergia alimentaria o en la reparación de heridas, aunque aún no hay evidencias descritas de estos procesos.

El grupo 3 de ILCs, incluye células linfoides innatas 3 (**ILC3**) y células inductoras de tejido linfóide (**LTi**). Estas últimas intervienen de forma decisiva en la organogénesis de tejido linfóide secundario, mediada por la interacción con células estromales durante el desarrollo embrionario (Mebius et al., 1997). Producen IL-17 e IL-22, citocinas asociadas a las células Th17 y Th22, en respuesta a la estimulación por IL-23 (Spits et al., 2013). La

IL-22 tiene un papel muy importante en la protección del IEP tras el daño o tras infección por bacterias patógenas (Zenewicz et al., 2008), mientras que la IL-17 derivada de ILC3s tiene un efecto pro-inflamatorio en el intestino, y se ha implicado tanto en colitis murina como en EII en humanos (Buonocore et al., 2010). Las IECs intestinales juegan un papel indirecto en la regulación de las ILC3s en respuesta a señales derivadas de bacterias comensales. Por ejemplo, la IL-25 producida por las IECs suprime la producción de IL-23 en los macrófagos y disminuye la producción de IL-22 en las IECs (Sawa et al., 2011). Por el contrario, también se ha visto que las señales derivadas de las bacterias comensales estimulan la producción de IL-7 en las IECs, lo que promueve la producción de IL-22 en las ILC3s (Vonarbourg et al., 2010). Aunque la función de las ILCs ha sido observada en numerosos modelos murinos, la importancia y contribución relativa de estas células en patología humana sigue sin estar completamente definida.

Recientemente se ha descrito un cuarto subgrupo de ILCs, las **ILCregs**, que se localizan en el intestino y secretan IL-10, que inhibe a las ILC1 e ILC3, protegiendo de la inflamación (Wang et al., 2017).

- Otras células innatas intestinales

Aunque normalmente están asociados a reacción alérgica y respuestas a parásitos, los eosinófilos y los mastocitos son sorprendentemente abundantes en la mucosa intestinal normal de la mayoría de las especies, lo que sugiere que probablemente tengan una importante labor fisiológica.

Los **eosinófilos** pueden llegar a constituir el 30% de las células mieloides de la mucosa intestinal. En el ratón, los eosinófilos son más frecuentes en el duodeno y disminuyen a lo largo del intestino (Chu et al., 2014). Se consideran células proinflamatorias, que contribuyen a la remodelación tisular y a la curación de heridas (Rothenberg and Hogan, 2006). Estudios recientes indican que los eosinófilos de la mucosa también pueden ser importantes en el cambio de clase a IgA de las células B en las PP y para el mantenimiento de las poblaciones células plasmáticas productoras de IgA, células dendríticas CD103⁺ y células Treg en la LP del intestino delgado (Chu et al., 2014).

Los **mastocitos** se encuentran principalmente en la LP y la submucosa de todo el tracto GI, aunque también encontramos una pequeña proporción en el IEp (Nishida et al., 2002). Su número decrece progresivamente desde el íleon hasta el recto (Lloyd et al., 1975), y producen mediadores que regulan la integridad de la barrera epitelial, el peristaltismo, y la permeabilidad intestinal (Bischoff, 2009). Funcionalmente, los mastocitos pueden ser diferentes en función de su localización intestinal. Así, los mastocitos del intestino parecen estar más implicados en la remodelación tisular (Miller and Pemberton, 2002), mientras que los mastocitos presentes en el colon tienen un perfil más proinflamatorio (Miller et al., 1988).

2. MICROBIOTA INTESTINAL

2.1. Composición de la microbiota intestinal

Todos los animales superiores viven en asociación con comunidades microbianas diversas, que se componen fundamentalmente de bacterias, pero también incluye arqueas, virus, hongos y protozoos. Los microorganismos cubren esencialmente todas las superficies mucosas y la piel, aunque la mayoría reside en el tracto GI. Una microbiota intestinal normal está dominada por bacterias anaerobias, cuyo número es entre 100 y 1000 veces superior al de bacterias aerobias y anaerobias facultativas (Clemente et al., 2012). En total, la microbiota intestinal se compone de más de 3500 especies, que pertenecen a varios filos bacterianos (Frank et al., 2007). Los filos más abundantes en el intestino humano son Firmicutes y Bacteroidetes, aunque también hay especies de los filos Proteobacteria, Verrumicrobia, Actinobacteria, Fusobacteria y Cyanobacteria (Qin et al., 2010).

La composición de la microbiota intestinal difiere entre individuos y puede fluctuar enormemente dentro del mismo individuo. Así, podemos observar dos gradientes de distribución microbiana en el tracto GI. En primer lugar, la densidad microbiana aumenta desde regiones más proximales del intestino hacia regiones más distales, donde alcanza una densidad de 10^{12} microorganismos por gramo de contenido en el colon. La gran mayoría de estas bacterias están presentes en el lumen, mientras que tan solo unas pocas están adheridas al epitelio o al moco intestinal (Sekirov et al., 2010). En segundo lugar, la diversidad bacteriana también aumenta siguiendo este mismo eje, siendo menos variada en el estómago, y aumentando progresivamente hasta el colon. De la misma manera, se observa un mayor número de especies bacterianas en el lumen, mientras que pocas especies, aunque muy bien adaptadas, se adhieren y residen en la capa de moco próxima al tejido (Swidsinski et al., 2005).

La colonización del huésped comienza en el nacimiento, y la composición de la microbiota intestinal va cambiando a lo largo de la vida, influenciada por gran variedad de factores, como la edad, el ambiente en el que vivimos o el uso de antibióticos. En particular, numerosos estudios han demostrado que la dieta puede tener un gran impacto

en la composición y en la diversidad de las comunidades microbianas tanto en ratones como en humanos (David et al., 2014; Tachon et al., 2014). En general, la ingesta de una dieta rica en frutas, vegetales y fibra, se asocia con un aumento en la riqueza y en la diversidad de la microbiota intestinal (Walker et al., 2011).

2.2. Mutualismo

Los microorganismos intestinales mantienen una relación simbiótica con la mucosa intestinal, llegando a ser esenciales para numerosos aspectos de la biología del huésped. Por su parte, el intestino de los mamíferos es un ambiente rico en nutrientes que se mantiene a una temperatura constante, lo que supone un hábitat óptimo para estos microorganismos, que se benefician también de esta asociación mutualista. Sin embargo, también es un hábitat dinámico, sometido a continuos cambios que pueden afectar a la composición de la microbiota intestinal (Jandhyala et al., 2015). Las fluctuaciones dinámicas en la microbiota, junto con el vasto número de células bacterianas y su proximidad al tejido epitelial, representan un gran desafío para el SI del huésped, que tiene que cumplir varios requisitos especiales. En primer lugar, debe ser no respondedor o tolerogénico frente a la elevada carga de microorganismos mutualistas residentes en el lumen intestinal. Al mismo tiempo, tiene que mantener una composición beneficiosa de la microbiota para asegurar una buena homeostasis. El SI restringe el crecimiento microbiano y reacciona a los microorganismos que penetran las barreras intestinales, modulando la secreción de sIgA, de PAMs, y la inducción de moco intestinal. Esta activación controlada del SI se conoce como inflamación fisiológica (Sommer and Bäckhed, 2013).

2.3. Aspectos funcionales de la microbiota intestinal

El uso de animales criados en condiciones libres de gérmenes o *germ-free* (GF) ha proporcionado información importante acerca del efecto de la comunidad microbiana intestinal en la fisiología del huésped. Así, se ha visto que tiene un papel fundamental en el desarrollo y la regulación de tejidos inmunológicos, de poblaciones inmunes y de mediadores inmunológicos.

2.3.1. Metabolismo de nutrientes y obesidad

En el intestino adulto, hay aproximadamente 10^{14} microorganismos, 10 veces el número de células humanas del cuerpo (Xu and Gordon, 2003). Su genoma combinado, conocido como microbioma, contiene más de 5 millones de genes, lo que supera enormemente el del huésped. Esta gran diversidad de genes proporciona un amplio rango de actividades bioquímicas y metabólicas que complementan la fisiología del huésped. Aunque la composición de la microbiota difiere significativamente entre individuos, se puede identificar un microbioma “central” o *core*, lo que subraya la importancia de interacciones funcionales metabólicas estables con el huésped (Turnbaugh et al., 2009).

Una de las principales funciones de la microflora del colon es la fermentación de carbohidratos (CH) de la dieta que de otra forma serían indigeribles (polisacáridos complejos como el almidón resistente o la celulosa), y de oligosacáridos que han escapado de la digestión proximal. Como resultado de esta fermentación, se producen gran cantidad de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs), como acetato, propionato o butirato (Macfarlane and Macfarlane, 2003). Los SCFAs representan una gran fuente de energía para el huésped y ejercen efectos muy importantes en la mucosa del colon, afectando a la absorción de fluidos, proliferación y diferenciación de los colonocitos, motilidad intestinal y con importantes funciones inmunomoduladoras (Scheppach, 1994). Además, afectan al crecimiento bacteriano, regulando la absorción del agua y disminuyendo el pH fecal (Zhang et al., 2015). En el ciego y en el colon proximal, la fermentación y la producción de SCFAs son mucho más intensas que en el colon distal, lo que conlleva un pH fecal más ácido (5-6), frente al pH casi neutro del colon distal, y un mayor crecimiento bacteriano (Fallingborg, 1999). Por otra parte, los microorganismos del colon también juegan un papel importante en la síntesis de la vitamina K y de varios componentes de la vitamina B (Hill, 1997), y en la absorción de iones en el ciego, como calcio, magnesio y hierro, la cual se ve también favorecida por la producción de SCFAs (Younes et al., 2001) (Figura 4).

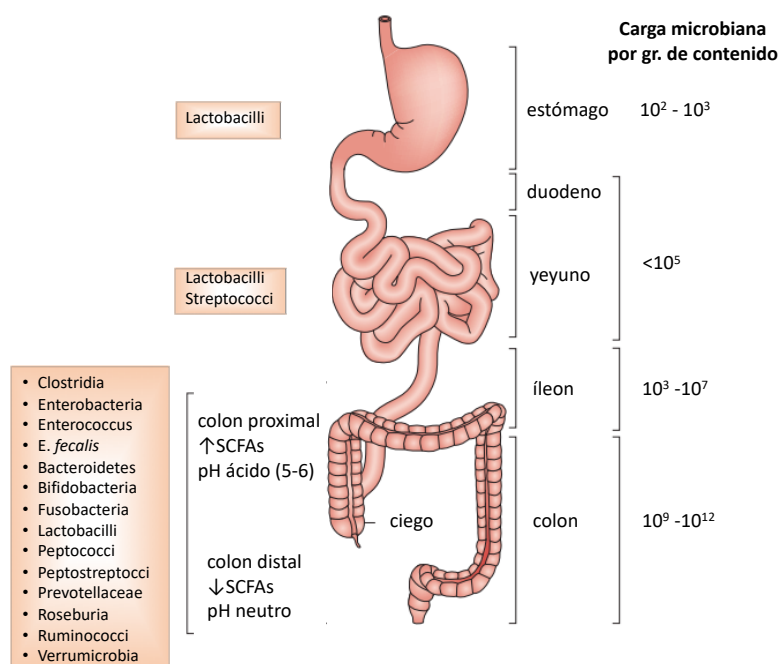


Figura 4. Distribución de la carga microbiana a lo largo del intestino. El número de microorganismos generalmente incrementa según descendemos por el tracto GI, llegando a alcanzar valores de 10^{12} por gr. de contenido intestinal en el colon. Así mismo, la diversidad de estos microorganismos es mucho mayor en el colon en el resto del tubo digestivo. El ciego es la región de mayor diversidad bacteriana, y junto con el colon distal, presentan una fermentación y producción de SCFAs mucho más intensa que el colon distal, lo que conlleva un pH más ácido y un mayor crecimiento bacteriano. Figura modificada de Mowat and Agace, 2014.

Se ha sugerido que existen diferencias en la composición de la microbiota intestinal de individuos obesos (Ley, 2010). El microbioma de ratones obesos está enriquecido en genes que codifican para enzimas del metabolismo de los CH, y tienen mayor capacidad para extraer energía de la dieta y generar SCFAs (Turnbaugh et al., 2006). Además, los obesos presentan una microbiota intestinal alterada, con una menor diversidad (Ley et al., 2006), aunque el impacto funcional de esta disminución en el desarrollo de la obesidad aún no está claro.

2.3.2. Desarrollo de estructuras linfoides

Además de la genética del huésped, numerosos factores ambientales, incluyendo el contacto con los microorganismos, influyen tanto el desarrollo como la maduración del SI. El desarrollo del GALT se inicia en el feto, un ambiente estéril, inducido por las LTIs (Mebius, 2003). La posterior maduración de estos tejidos, su aumento de tamaño y la formación de centros germinales, depende de la colonización microbiana tras el

nacimiento (Renz et al., 2011). De esta forma, las PP, los MLN y la pulpa blanca del bazo están subdesarrolladas en ratones GF (Round and Mazmanian, 2009). Lo mismo sucede con el proceso de maduración de las criptoplasmas intestinales; los ILFs no se desarrollan totalmente en los ratones GF (Hamada et al., 2002). Sin embargo, es posible inducir su formación mediante la exposición a PG, a través de la señalización por NOD1 y TLRs, lo que indica que este proceso está completamente dirigido por un patrón microbiano específico (Bouskra et al., 2008).

2.3.3. Diferenciación de poblaciones inmunológicas

La microbiota intestinal también se ha visto implicada en la regulación de la diferenciación de subconjuntos de células inmunológicas, manteniendo las interacciones homeostáticas con el huésped. Por un lado, promueve la diferenciación de células NK-like, que difieren de las NK convencionales principalmente por presentar una expresión intermedia de NK1.1⁺, no producir IL-1 β , y no destruir células tumorales (Luci et al., 2009). La presencia de la microbiota intestinal es un requisito indispensable para su diferenciación, de forma que los ratones GF presentan un menor número de células NK-like que ratones criados de manera convencional (Sanos et al., 2009). Estas células producen IL-22, que en ratones promueve la integridad de la barrera epitelial e induce la reparación epitelial, reduciendo la infiltración bacteriana (Zheng et al., 2008). También regula los niveles de las células NKT invariantes (iNKT) que son el único subconjunto de células T que presenta una cadena α invariante del receptor de células T (TCR). Las células iNKT promueven la inflamación, liberando citocinas pro-inflamatorias tras su activación (Van Kaer et al., 2011). A diferencia de las células NK-like, hay más células iNKT en el colon de los ratones GF con respecto a los ratones criados de manera convencional (Olszak et al., 2012), lo que sugiere que la microbiota mantiene la homeostasis intestinal disminuyendo los niveles de estas células proinflamatorias.

Por otro lado, se ha visto que determinados microorganismos pueden dirigir respuestas de células T específicas. Por ejemplo, la bacteria Gram negativa *Bacteroides fragilis* provoca una respuesta anti-inflamatoria, induciendo la diferenciación de células T CD4⁺ a células Treg tanto a nivel local en la LP, como a nivel sistémico (Round et al., 2011). Estas células Treg producen IL-10, que suprime la respuesta pro-inflamatoria Th17

(Maynard et al., 2007). Este proceso está mediado por el reconocimiento del polisacárido A (PSA), presente en la membrana externa de las bacterias, por TLR2 en las células T CD4⁺ (Round et al., 2011). Otras bacterias Gram positivas de la clase Clostridia tienen un efecto similar en el SI del huésped (Atarashi et al., 2011). Por el contrario, la bacteria segmentada filamentosa (SFB), que reside en el intestino delgado del ratón, en contacto directo con las IECs, provoca una respuesta pro-inflamatoria, promoviendo la diferenciación de células Th17 y, en menor medida, de células Th1 (Gaboriau-Routhiau et al., 2009; Ivanov et al., 2009). La colonización de ratones GF con SFB es suficiente para restaurar la susceptibilidad de dichos ratones a artritis y a encefalomiелitis experimental autoinmune (EAE), mediadas por Th17 (Lee et al., 2011; Wu et al., 2010). Sin embargo, aún se desconoce si la diferenciación de células Th17 se induce por mediadores derivados de IECs, por interacción directa con células presentadoras de antígenos (APCs) en la LP, o por moléculas de señalización secretadas por las propias bacterias, como metabolitos (Hooper et al., 2012) (Figura 5).

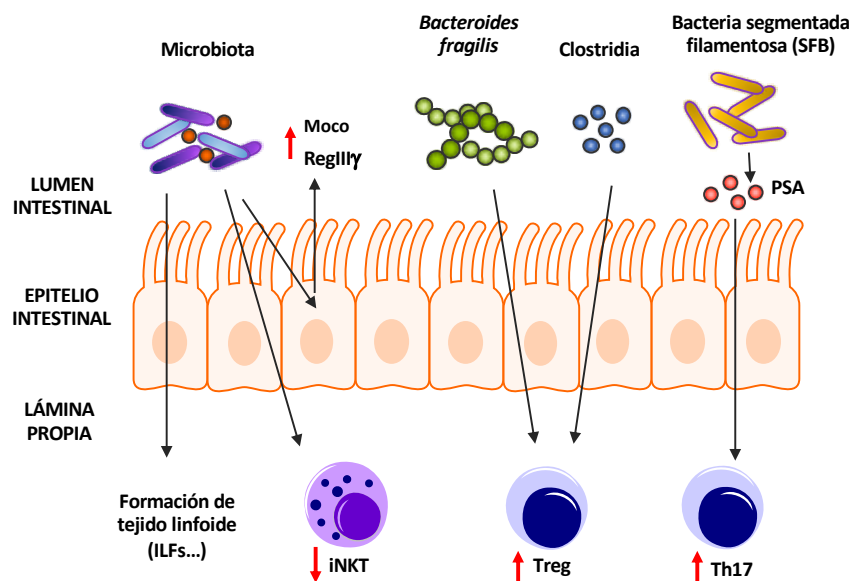


Figura 5. Impacto de la microbiota en el SI de la LP intestinal. El contacto con los microorganismos del lumen intestinal influencia el desarrollo y la maduración de las estructuras linfoides del GALT (PP, MLN, ILFs...), y modula poblaciones inmunológicas, disminuyendo el número de iNKT pro-inflamatorias. Determinadas especies bacterianas pueden dirigir la diferenciación de células T CD4⁺; *Bacteroides fragilis* y bacterias del género Clostridia inducen la diferenciación de células Treg, mientras que SFB promueve la diferenciación a células Th17. La microbiota comensal restringe el crecimiento de patógenos en parte induciendo la producción de PAMs en las IECs y la producción de moco en las células de Goblet.

2.3.4. Producción de mediadores inmunológicos

La microbiota comensal restringe el crecimiento de patógenos en parte mediante la producción local de sIgA. La diferenciación de células B a células plasmáticas productoras de IgA se induce con la detección de flagelina derivada de los microorganismos en las DCs de la LP (Uematsu et al., 2008). La IgA tiene un papel clave en la homeostasis, de manera que ratones deficientes en IgA producen anticuerpos IgG séricos específicos frente a microbiota, lo que indica la existencia de una brecha en la barrera mucosa de estos ratones y por tanto una inducción del SI sistémico (Macpherson et al., 2000). En un estudio reciente se ha visto que la regulación microbiana de la producción de la IgA depende en parte de la proteína del huésped PD1 (proteína de muerte programada 1), la cual se expresa en las células T foliculares (TFh) de los centros germinales. Los ratones deficientes en PD1 presentan un repertorio alterado de IgAs debido a cambios en la maduración de las células B, lo que da lugar a cambios en la composición normal de la microbiota intestinal, con una reducción en el número de bacterias de los géneros *Bacteroides* y *Bifidobacterium*, y un aumento del número de enterobacterias (Kawamoto et al., 2012).

Además, la microbiota intestinal también regula la producción PAMs en las IECs. Aunque algunos PAMs como las α -defensinas o la β -defensina-1, se expresan de forma constitutiva (Putsep et al., 2000), otros como ANG4 (angiogenina-4) y Reg3 γ , se inducen tras el encuentro con los microorganismos (Hooper et al., 2003) (Figura 5), a través de mecanismos tanto dependientes como independientes de la señalización por PRRs (Franchi et al., 2012). En este punto juegan un papel muy importante los SCFAs producto de la fermentación bacteriana, que son capaces de inducir la producción de PAMs vía señalización de MEK/ERK (Schauber et al., 2003).

2.3.5. Producción de moco

La capa de moco representa un hábitat microbiano selectivo dado que sólo algunas bacterias específicas expresan las lectinas y glicosidasas necesarias para su adhesión (Juge, 2012). Por su parte, los microorganismos tienen un efecto importante en el grosor de la capa de moco y en su composición, como demuestra el hecho de que animales criados en condiciones GF presenten menos CG y una capa de moco más delgada en el

colon que los criados de manera convencional (Sharma et al., 1995). Además, la estimulación con productos bacterianos como el lipopolisacárido (LPS) y el PG, es suficiente para establecer las propiedades habituales de la capa de moco en los ratones GF (Petersson et al., 2011). Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos por los cuales la microbiota modula a las CG y las características de la capa de moco.

2.4. Microbiota intestinal y EII

En condiciones fisiológicas, las bacterias comensales mantienen una relación simbiótica con el huésped, modulando el SI innato y adaptativo. Sin embargo, pueden ser potencialmente perjudiciales cuando el ecosistema se ve sometido a cambios anormales. La homeostasis intestinal se ve influenciada por gran variedad de factores, tanto genéticos como ambientales (Ananthakrishnan, 2015). La disbiosis de las comunidades bacterianas intestinales puede dar lugar a respuestas aberrantes frente a la microbiota comensal en individuos genéticamente susceptibles, lo que resulta en una situación de inflamación crónica intestinal (Packey and Sartor, 2008). No obstante, a día de hoy, no se ha establecido una relación rigurosa de causa-efecto entre disbiosis intestinal y EII.

Dentro de las EII, se pueden distinguir dos grandes patologías: la colitis ulcerosa (UC), que normalmente se limita al colon, y la enfermedad de Crohn (CD), que se extiende a lo largo de todo el tracto digestivo. En general, las bacterias intestinales tienen un papel crítico en el desarrollo de las EII, a través de la regulación de la inflamación. En ratones tratados con DSS se produce un daño en la barrera intestinal, que genera una inflamación aguda muy similar a la UC. Dicha inflamación está potenciada por las bacterias intestinales, como evidencia el hecho de que ratones GF y ratones tratados con antibióticos, apenas presentan inflamación (Tlaskalova-Hogenova et al., 2005). La inducción de colitis por DSS se caracteriza por un cambio hacia una microflora más pro-inflamatoria, con un aumento en la carga de *Escherichia coli*, que puede servir como biomarcador de la severidad del proceso. Los productos bacterianos pueden exacerbar la inflamación a través de la señalización por TLR2 y TLR4, desencadenando la acumulación de neutrófilos y células T en la mucosa intestinal (Heimesaat et al., 2007). Por otra parte, se ha visto que los pacientes con UC presentan perfiles de expresión génica diferentes

que controles sanos y una menor biodiversidad bacteriana. Ésta se caracteriza por una disminución en las especies potencialmente protectoras y una reducción significativa de especies productoras de butirato, pertenecientes al filo Firmicutes, las cuales mantienen una correlación inversa con la actividad de la enfermedad (Machiels et al., 2014). En un estudio reciente, se ha observado que pacientes con loci de riesgo para EII también presentan una menor abundancia de especies productoras de butirato (Imhann et al., 2018), lo que sugiere que los loci de riesgo afectan a la composición de la microbiota intestinal, independientemente de las características de la enfermedad. Los pacientes con CD también presentan grandes diferencias en su composición microbiana con respecto a sus controles sanos. La disbiosis en estos pacientes se caracteriza por el incremento en especies bacterianas degradadoras de mucinas y no por la pérdida de especies productoras de butirato. (Joossens et al., 2011)

Varios estudios han mostrado que el uso de probióticos combinados con prebióticos, tiene un efecto beneficioso en estos pacientes con EII y promueven la remisión de la enfermedad (Eom et al., 2018)

2.5. Microbiota intestinal y desarrollo de cáncer

La microbiota intestinal tiene efectos directos en la proliferación y migración celular a lo largo del eje de la cripta en el intestino delgado y en la apoptosis (Abrams et al., 1963; Crawford and Gordon, 2005). Un desequilibrio en esta homeostasis puede dar lugar a desarrollo de cáncer, en el que la inflamación juega un papel fundamental, tanto en su inicio como en su progresión. Los microorganismos pueden modular la inflamación, y por tanto la carcinogénesis (Hope et al., 2005).

La composición de las comunidades de bacterias intestinales es diferente entre individuos con cáncer colorrectal (CRC) e individuos sanos. Varios géneros de bacterias productoras de butirato están menos representados en muestras de heces de pacientes enfermos, por lo que los niveles de butirato en estos pacientes se ven significativamente reducidos. El butirato es un nutriente esencial para las células normales del colon y se ha visto que es capaz de reducir la proliferación e inducir la apoptosis de células de carcinoma

de colon, sólo o en combinación con el propionato (Weir et al., 2013). Sin embargo, tanto la carga como la diversidad microbiana están aumentadas en pacientes con adenoma o CRC (Sanapareddy et al., 2012; Swidsinski et al., 1998). De hecho, en algunos modelos de carcinogénesis, los ratones GF están protegidos o presentan un menor desarrollo de CRC comparado con ratones criados de manera convencional (Dove et al., 1997; Uronis and Jobin, 2009).

Por otra parte, algunas especies microbianas se han asociado con el desarrollo de CRC (Abdulmir et al., 2011; Kostic et al., 2012; Toprak et al., 2006), y la administración de probióticos, como *Bifidobacterium longum*, es capaz de suprimir significativamente la incidencia del CRC, la multiplicidad y el volumen del tumor, en un modelo de carcinogénesis inducida por Azoximetano (AOM) (Singh et al., 1997). Esto sugiere que la manipulación selectiva de la microbiota intestinal podría proporcionar nuevas vías para prevenir la carcinogénesis.

3. LA SUPERFAMILIA DE FACTORES DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE- β (TGF β)

En la regulación de los procesos de intercomunicación y el mantenimiento de la homeostasis intestinal adquiere gran importancia la citocina TGF β . La superfamilia de TGF β es un grupo de factores de crecimiento con una estructura altamente conservada en todo el reino animal, y que ejerce efectos pleiotrópicos, regulando una gran variedad de procesos biológicos, como la diferenciación, proliferación y supervivencia celular (Beebe et al., 2004). Está compuesta por más de 30 miembros que incluyen, además de los TGF β s, a los BMPs (*Bone morphogenetic proteins*), las Activinas, Nodal, GDFs (*Growth and differentiation factors*), y la hormona antimülleriana (AMH) (Weiss and Attisano, 2013). Este apartado se centrará en los aspectos relacionados con los miembros de la subfamilia TGF β , aunque algunos de ellos pueden ser similares para otros miembros de la superfamilia.

En mamíferos, la familia de los TGF β s está compuesta por tres isoformas, TGF β 1, TGF β 2 y TGF β 3, codificadas por genes diferentes. Son secretadas por multitud de tipos celulares y juegan un papel fundamental en el desarrollo, la determinación del destino celular, la cicatrización, la respuesta inmune y la apoptosis (Javelaud and Mauviel, 2004). Aunque las tres isoformas presentan una elevada homología, gracias al estudio con ratones deficientes en cada una de ellas se ha visto que algunas de sus funciones no son redundantes (Annes et al., 2003). Así TGF β 1 está implicado en hematopoyesis, vasculogénesis y en procesos de inflamación y autoinmunidad. TGF β 2 afecta al desarrollo del corazón, pulmón, extremidades, ojos, oídos y sistema urogenital. Por último, TGF β 3 se ha relacionado con el desarrollo del paladar y el desarrollo pulmonar (Goumans and Mummery, 2000). La isoforma más abundante en tejidos humanos es TGF β 1, y ha servido como modelo para estudiar los mecanismos de activación de receptores por ligando y las vías de señalización. Mutaciones en TGF β 1 en ratones, provocan respuestas inflamatorias multiorgánicas severas, y una letalidad embrionaria del 50%. Mutaciones en las otras dos isoformas resultan en anormalidades en el desarrollo y mortalidad perinatal (Dickson et al., 1995; Kaartinen et al., 1995; Sanford et al., 1997).

3.1. Síntesis de TGFβs

Las tres isoformas de TGFβs se sintetizan inicialmente como precursores monoméricos grandes, denominados pre-pro-TGFβ, y que se componen de un péptido señal (PS) hidrofóbico en la región N-terminal, un péptido asociado a latencia (LAP) y una secuencia C-terminal que constituye la forma potencialmente bioactiva (Gentry and Nash, 1990). Etapas sucesivas conllevan la proteólisis y escisión del PS y la dimerización de dos monómeros mediante puentes disulfuro (Gentry et al., 1988), dando lugar al homodímero pro-TGFβ. A continuación, es procesado por proteasas de tipo furina en el aparato de Golgi, que separan las dos cadenas LAP de las dos cadenas de TGFβ (Kusakabe et al., 2008). Así, se forma el pequeño complejo latente de TGFβ (*small latent complex*, SLC), que permanece unido a las cadenas LAP a través de uniones no covalentes (Todorovic et al., 2005). Éstas, mantienen al TGFβ en su forma inactiva e impiden su interacción con sus receptores (Annes et al., 2003). Además, el SLC puede unirse por puentes disulfuro a cisteínas de glicoproteínas denominadas LTBP (*Latent-TGFβ-binding proteins*), formando un gran complejo latente (*large latent complex*, LLC), que es posteriormente secretado (Chen et al., 2005).

Tras su secreción, el LLC es capaz de interactuar con componentes de la matriz extracelular (ECM), mediante la unión de las LTBP con fibrilinas o fibronectina (FN), lo que promueve su anclaje a la ECM por enlaces covalentes (Chaudhry et al., 2007; Horiguchi et al., 2012). Finalmente, este complejo debe ser procesado para liberar el TGFβ activo y permitir su unión al receptor.

3.2. Activación de los TGFβs latentes

La conversión del TGFβ latente a TGFβ activo puede darse de varias maneras. En general este proceso se dirige directamente al LAP, e implica principalmente la acción de numerosas proteasas y metaloproteasas, entre las que se incluyen la plasmina, la catepsina D, la MMP-2 (*Matrix metalloproteinase 2*) o la MMP-9. El proceso de activación del TGFβ consiste en la liberación del LLC de la ECM, seguido de la proteólisis del LAP para liberar el TGFβ, que podrá unirse a sus receptores (Yu and Stamenkovic, 2000). Sin embargo, a pesar de la importancia de MMP-2 y MMP-9 en la activación de TGFβ, se ha

visto que ratones con mutaciones en estas enzimas aún son capaces de activar este proceso y no muestran ningún fenotipo acorde con la deficiencia de TGF β , lo que sugiere que otras proteasas puedan estar implicadas (Annes et al., 2003).

Otras moléculas como la trombospondina 1 (THBS1) y las ROS también son capaces de interaccionar directamente con el LAP sin necesidad de digestión proteolítica. Promueven cambios conformacionales y modificaciones estructurales en el LAP, alterando su unión con el TGF β , el cual queda libre en su forma activa (Barcellos-Hoff and Dix, 1996; Murphy-Ullrich and Poczatek, 2000). Lo mismo sucede con algunas integrinas; el LAP contiene un sitio de unión a integrinas α_v , conocido como región RGD (Worthington et al., 2011). Por ejemplo, $\alpha_v\beta_6$ y $\alpha_v\beta_8$ son activadores directos de TGF β_1 y TGF β_3 a través de la unión a la región RGD, induciendo un cambio conformacional en el LAP, que permite la liberación de TGF β de su complejo de latencia (Annes et al., 2004; Wipff and Hinz, 2008). Por otra parte, condiciones de pH extremas también pueden desnaturalizar el LAP, dando lugar a una activación significativa de TGF β (Lyons et al., 1988; Poniatowski et al., 2015).

3.3. Receptores y señalización de TGF β s

Una vez que el TGF β bioactivo está libre en el medio extracelular, puede señalizar a través de distintos tipos de receptores. En función de sus características estructurales y funcionales, los receptores se dividen en dos subfamilias: receptores tipo I o ALK (*Activin-receptor like kinases*), y receptores tipo II. Existen distintos tipos de receptores I y II específicos para la unión de los diferentes miembros de la superfamilia de TGF β . Así, TGF β interacciona con un receptor heterotetramérico compuesto por dos subunidades del receptor de tipo I T β RI y dos subunidades del receptor de tipo II T β RII (Wanjun Chen and Ten Dijke, 2016). Ambos receptores son glicoproteínas transmembrana, cuya región intracelular contiene un dominio con actividad quinasa en serinas y treoninas (Hinck, 2012). Para la transducción de la señal, en primer lugar, los dímeros de TGF β libres se unen a los T β RII, que son constitutivamente activos y que sufren un proceso de autofosforilación. A continuación, se recluta a los T β RI, los cuales son fosforilados por T β RII en una región conservada rica en serinas y glicinas, denominada dominio GS. Esta fosforilación provoca un cambio conformacional en el T β RI, promoviendo su actividad

serina/treonina quinasa, siendo así capaz de propagar la señal al interior de la célula (Poniatowski et al., 2015; Wrana et al., 1994).

Existe además otro receptor de tipo III (T β RIII), conocido también como betaglicano, que está anclado a la membrana (Cheifetz et al., 1988) y que es capaz de interactuar con las tres isoformas de TGF β , presentando mayor afinidad por TGF β 2 (Mitchell et al., 1992). Sin embargo no es capaz de transmitir la señal, puesto que carece del dominio con actividad serina/treonina quinasa. T β RIII funciona como un correceptor, presentando el ligando al complejo formado por T β RI y T β RII (Esparza-Lopez et al., 2001). De manera similar, se ha descrito una glicoproteína homodimérica de superficie celular, la endoglina, con una función similar al T β RIII, aunque sin afinidad por la isoforma TGF β 2 (Yamashita et al., 2008).

La señalización intracelular puede darse por distintas vías, que se detallan a continuación.

3.4. Ruta canónica: señalización por proteínas Smad

La señalización mediada por proteínas Smad representa una cascada de señalización muy conservada en el reino animal (Moustakas and Heldin, 2009). En vertebrados se han descrito 9 proteínas Smad diferentes, que se clasifican en distintos subtipos según su función. Los primeros sustratos de fosforilación son las **R-Smads** (*receptor-activated Smads*), que se asocian con los receptores tipo I activados. Por norma general, las R-Smad que son fosforiladas por los receptores de TGF β y activinas son Smad2 y 3, mientras que Smad 1, 5 y 8 lo son por los receptores de BMP (Weiss and Attisano, 2013). La unión de Smad2/3 a los T β RI está regulada por una proteína adaptadora denominada SARA (*Smad anchor for receptor activation*), que interactúa con las Smad2/3 inactivos residentes en el citoplasma de la célula, y los presenta al receptor (Itoh et al., 2002). La activación de las R-Smad mediante fosforilación induce su interacción con la **Co-Smad** (*common-mediator Smads*) Smad4, formando un complejo heteromérico que se transloca al núcleo, dónde van a modular la transcripción génica uniéndose a una secuencia de DNA conocida como SBE (*Smad binding element*) (Piek et al., 1999). Sin embargo, esta unión es de baja afinidad y se requiere la unión de otros factores de transcripción (TF) para mejorar la especificidad

y afinidad de la unión al DNA (Ross and Hill, 2008). Finalmente, las R-Smads son desfosforiladas, lo que provoca su regreso al citoplasma, volviendo a estar disponibles para una posible nueva fosforilación mediada por receptor, y su translocación al núcleo celular (Inman et al., 2002).

El tercer y último tipo de la familia son las **I-Smads** (*inhibitory Smads*), Smad6 y 7. Éstas actúan como reguladores negativos de la vía, compitiendo con las R-Smads por la unión a los receptores de tipo I y a las Co-Smad, bloqueando así su fosforilación y la propagación de la señal (Hayashi et al., 1997; Imamura et al., 1997). También son capaces de asociarse con la ubiquitin ligasa Smurf1 (*Smad ubiquitination regulatory factor-1*), que induce la degradación de los receptores de tipo I (Ebisawa et al., 2001). Smad7 inhibe preferentemente la vía de señalización de TGF β mientras que Smad6 actúa sobre la vía de BMP (Santibanez et al., 2011).

3.5. Rutas no canónicas

Además de la ruta mediada por las proteínas Smad, TGF β también puede transducir la señal a través de otras rutas independientes de Smads, que pueden tener gran importancia a la hora de ejercer distintos efectos biológicos en función del contexto (Weiss and Attisano, 2013). Entre estas rutas se encuentran la vía de las MAPKs ERK y JNK/p38, la vía de las GTPasas tipo Rho y la vía de PI3K/AKT.

3.5.1. Señalización a través de ERK

Aunque T β RI y T β RII se caracterizan por su actividad serina/treonina quinasa, también se ha descrito que, tras la unión con el ligando, pueden sufrir fosforilación en residuos de tirosina, si bien esto sucede a un nivel mucho menor que en los residuos de serina y treonina (Lawler et al., 1997). Esto permite que T β RI pueda reclutar y fosforilar a la proteína adaptadora ShcA, promoviendo la formación de un complejo ShcA/Grb2/SOS, capaz de activar a Ras en la membrana plasmática, dando lugar a la activación secuencial de c-Raf, MEK y ERK (Lee et al., 2007).

La activación de esta ruta tiene importancia en la transición epitelio-mesénquima (EMT), que es una de las principales funciones de TGF β en el desarrollo embrionario y en

la curación de heridas, pero que también está relacionada con procesos de fibrosis, con la progresión tumoral y el desarrollo de metástasis (Zhang, 2009). Además, la activación de ERK puede regular la actividad de las Smads 1, 2 y 3, mediante su fosforilación en sitios diferentes a los sitios de activación por T β RI (Zhang, 2009).

3.5.2. Señalización a través de JNK/p38

En esta vía de señalización tiene un papel fundamental la proteína TRAF6, que se une al complejo activado de receptores T β RI y T β RII, lo que promueve la poliubiquitinización y asociación de TRAF6 con TAK1 (*TGF β activated kinase 1*). Esta interacción induce también la poliubiquitinización y activación de TAK1 (Sorrentino et al., 2008), que, además de activar la vía de NF- κ B como mencionamos anteriormente, activa a las MKKS (*Map Kinases Kinases*) MKK4 y MKK3/6, que seguidamente activan a JNK y p38 respectivamente (Zhang, 2009). La importancia de TAK1 en esta señalización, queda reflejada por el defecto en la activación de JNK en ausencia de TAK1 (Shim et al., 2005).

La señalización a través de esta ruta, junto con la vía de señalización dependiente de proteínas Smad, participa en la supresión tumoral mediante la inducción de apoptosis mediada por TGF β (Edlund et al., 2003). De manera similar, la vía TRAF6-TAK1-JNK/p38 también desempeña un papel importante en la EMT inducida por TGF β (Zhang, 2009).

3.5.3. Señalización a través de GTPasas tipo Rho

La activación de GTPasas tipo Rho por TGF β , incluyendo RhoA, Rac y Cdc42, juega un papel importante en la organización dinámica del citoesqueleto y la motilidad celular (Bhowmick et al., 2001). Además, RhoA está también implicada en el efecto de TGF β sobre la EMT, puesto que es necesaria una disminución de los niveles de RhoA en las uniones estrechas, que permitan la disolución de las mismas. Par6 es una proteína de andamiaje que interacciona con los receptores activos T β RI en las uniones estrechas, y es fosforilada

por T β RII. A continuación, recluta a Smurf1, mediando así la ubiquitinización y degradación de RhoA (Ozdamar et al., 2005).

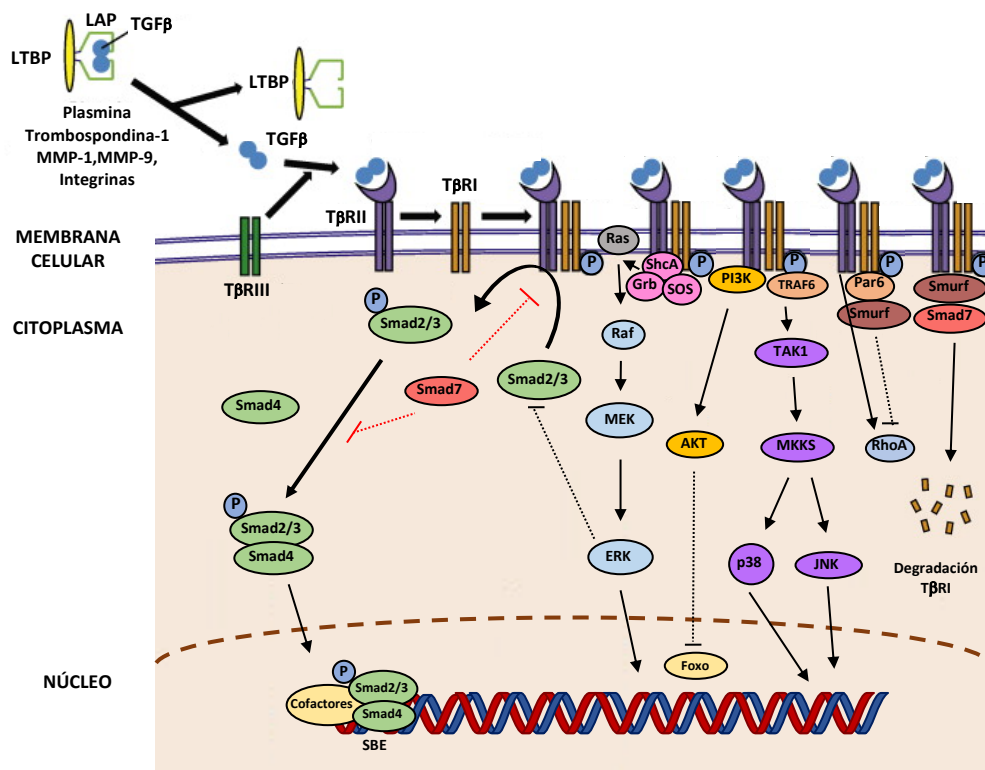


Figura 6. Activación y señalización del TGF β . TGF β se secreta como parte de un gran complejo LLC, que incluye a proteínas LTBP y al péptido LAP. Distintas proteasas e integrinas expresadas en la superficie de las IECs, DCs y de los miofibroblastos, favorecen la liberación del TGF β del complejo, dando lugar a su activación. T β RIII promueve la interacción del TGF β activo con el receptor homodimérico T β RII, que forma a su vez un heterocomplejo con el receptor homodimérico T β RI, al cual fosforila y activa. La señalización está mediada por los dominios quinasa de estos receptores y activa rutas canónicas Smad y rutas no canónicas Smad independientes. En la ruta canónica, las R-Smad (2,3) son fosforiladas por T β RI y se unen a Smad4 y se translocan al núcleo, donde se unen a las regiones SBE de sus genes diana junto con distintos cofactores y TFs. La activación de las rutas no canónicas incluyen la activación de ERK, JNK o p38 MAPK, donde intervienen también TAK1 y TRAF6, de gran importancia en la inducción de apoptosis y diferenciación; Par6, que inhibe a RhoA en las uniones estrechas, influyendo en la EMT; y la ruta de PI3K/AKT, antagonista de la vía de las proteínas Smad. Figura modificada de Biancheri et al., 2013.

3.5.4. Señalización a través de PI3K/AKT

TGF β puede activar a PI3K y a su efector AKT mediante la interacción directa del receptor T β RII con la subunidad p85 de PI3K, a la que se encuentra constitutivamente asociado (Yi et al., 2005). TGF β también puede activar esta ruta de manera indirecta, induciendo la expresión de TGF α , que activa a los receptores de EGF, lo que conlleva la

activación de PI3K y AKT (Vinals and Pouyssegur, 2001). Sin embargo, TGF β también es capaz de inhibir esta señalización mediante la expresión de la fosfatasa lipídica SHIP1, por un mecanismo dependiente de proteínas Smad (Valderrama-Carvajal et al., 2002).

La señalización PI3K/AKT también contribuye a la EMT inducida por TGF β , reorganizando los filamentos de actina para la migración celular (Bakin et al., 2000). No obstante, esta señalización también tiene efectos antagónicos en las respuestas mediadas por proteínas Smad. Así, la activación de PI3K/AKT protege a las células de la apoptosis y la inhibición de la proliferación celular mediadas por TGF β , posiblemente mediante una interacción física entre AKT y Smad3, que impide la fosforilación y activación de Smad3 (Conery et al., 2004). Además, AKT puede fosforilar al factor de transcripción Foxo, necesario para el efecto antiproliferativo del complejo Smad3-Smad4, inhibiendo su localización nuclear, y por tanto previniendo que dicho complejo actúe sobre sus genes diana (Seoane et al., 2004).

3.6. Regulación de la señalización por TGF β

Todos los componentes de la vía de señalización de TGF β están sujetos a una estrecha regulación a distintos niveles. Muchos factores controlan la cantidad, la disponibilidad y la actividad de los diferentes ligandos y receptores, lo que va a regular la intensidad de la señal en el núcleo (Kang et al., 2009).

El primer punto de regulación se encuentra a nivel extracelular, donde TGF β se secreta como LLC unido a proteínas de la ECM, y su biodisponibilidad depende de la activación de las distintas vías de procesamiento para la escisión del TGF β bioactivo. Existen también distintas moléculas solubles que regulan la disponibilidad de los ligandos. Estas moléculas se unen a los diferentes ligandos, limitando por tanto su acceso a los receptores de membrana. Entre ellas, Decorina y α 2-macroglobulina actúan inhibiendo al TGF β ; Folistatina actúa inhibiendo a BMPs y Activinas; y Nogina y Cordinina antagonizan ligandos de BMPs. Además, la familia de proteínas solubles DAN, que incluye miembros como Dante, Gremlin y Cerberus, inhiben ligandos específicos de la familia de BMPs y TGF β s (Massague and Chen, 2000; Shi and Massagué, 2003). Otros moduladores

compiten con el ligando por la unión al receptor, como es el caso de las Inhibinas y de Lefty, dos inhibidores de activinas (Miyazono, 2000).

Como mencionamos anteriormente, en la membrana plasmática existen receptores accesorios encargados de modular la intensidad de la señal, como el betaglicano, o T β RIII, que aumenta la afinidad del TGF β y de BMPs por el complejo de receptores, especialmente de TGF β 2 (Cheifetz et al., 1988). En este punto es importante BAMBI (*BMP and Activin Membrane-Bound Inhibitor*), un regulador negativo de la señalización por TGF β s, BMPs y Activinas, el cual describiremos ampliamente en el siguiente subapartado.

Al igual que otros receptores de superficie, los receptores de TGF β se internalizan al interior de la célula por endocitosis, y este proceso juega un papel importante en la regulación de la señalización por TGF β . Esta endocitosis puede estar mediada por vesículas de clatrina, y, aunque no es esencial para que se propague la señalización, promueve la activación de Smads inducida por TGF β , y la transcripción de los genes diana (Penheiter et al., 2002). La mayoría de los receptores de TGF β se reciclan de nuevo a la superficie celular tras la internalización, y estos procesos pueden tener lugar también en ausencia de ligando (Di Guglielmo et al., 2003). Por otra parte, la internalización de los receptores también puede estar mediada a través de balsas lipídicas caveolina positivas, lo que en este caso promueve la poliubiquitinación de los receptores por Smurf1 y su degradación en el proteasoma, apagando por tanto la señalización por TGF β (Chen, 2009; Razani et al., 2001).

A nivel intracelular, también existen distintas moléculas implicadas en la regulación de la señalización. Por ejemplo, la proteína adaptadora SARA, también mencionada previamente, es un regulador positivo de la transducción de la señal puesto que facilita la unión de las R-Smads a los receptores de tipo I, promoviendo su fosforilación (Itoh et al., 2002). Por el contrario, FKBP12 es un regulador negativo de la señalización, que se une al dominio GS de los receptores de tipo I. La pérdida de esta unión, conduce a la activación espontánea de los receptores en ausencia de ligando, por lo que FKBP12 podría estar actuando como salvaguarda, protegiendo de la activación independiente de ligando de T β RI por T β RII (Chen et al., 1997; Wang et al., 1996). Las I-Smads también inhiben la señalización al competir con las R-Smads por la unión a los receptores de tipo I y a las Co-

Smads (Hayashi et al., 1997; Imamura et al., 1997), y al reclutar a proteínas Smurf, que ubiquitinizan a los receptores de tipo I, induciendo su degradación (Ebisawa et al., 2001).

Por último, el estado epigenético de la célula, como la metilación del DNA, la modificación de histonas, o los pequeños RNAs no codificantes o micro-RNAs (miRNAs), van a determinar los genes que son susceptibles de ser expresados, y por tanto, regulados. Los miRNAs son capaces de inhibir los mRNAs de los receptores de la familia de TGF β o de inducir su degradación (Bartel, 2004; Inui et al., 2010).

3.6.1. BAMBI

Entre los mecanismos que regulan la señalización mediada por TGF β destaca la proteína BAMBI, un inhibidor de la señalización por BMPs, Activinas y TGF β s. El gen *bambi* (similar al gen *nma* en humanos) codifica para una glicoproteína transmembrana muy conservada en vertebrados, cuyo dominio extracelular es muy similar al de los receptores tipo I de TGF β , con los cuales dimeriza, interfiriendo con la unión de los receptores a los ligandos. Además, la región intracelular carece de la actividad serina treonina quinasa propia de dichos receptores, lo que convierte a BAMBI en un pseudo-receptor incapaz de transmitir la señal al interior de la célula, y por tanto inhibe la señalización de los miembros de la superfamilia de TGF β (Onichtchouk et al., 1999). Por otra parte, BAMBI también es capaz de cooperar con Smad7, formando un complejo ternario con T β RI, impidiendo su interacción con Smad3, y regulando negativamente la señalización por TGF β (Yan et al., 2009).

BAMBI se expresa en corazón, pulmón y testículo, y también está presente, aunque en menor medida, en cerebro, hígado y riñón (Knight et al., 2001). Su expresión es inducida por BMP4 durante el desarrollo embrionario de distintas especies (Onichtchouk et al., 1999) y por TGF β en células de carcinoma hepático (Sekiya et al., 2004), y por tanto participa en un bucle de retroalimentación negativa de la señalización por TGF β s. También se ha descrito que TGF β puede regular negativamente a BAMBI en odontoblastos (Gonzales et al., 2010), lo que sugiere que TGF β podría regular a BAMBI, tanto positiva como negativamente, en función del contexto.

También se ha observado que BAMBI es capaz de activar la ruta de señalización de Wnt/ β -catenina, la cual es muy importante en procesos de embriogénesis, proliferación celular y desarrollo tímico. Se ha demostrado que BAMBI se une al receptor Frizzled5 y a la proteína Dishevelled, facilitando la unión entre ambos y promoviendo así la liberación y activación de β -catenina. (Lin et al., 2008). BAMBI a su vez es inducido por β -catenina en células de cáncer colorrectal (Sekiya et al., 2004). Se ha propuesto que la inducción de BAMBI en este tipo de cáncer podría por un lado estar bloqueando los efectos anti-proliferativos mediados por TGF β , y por otro lado induciendo la proliferación celular a través de la activación de la señalización por Wnt/ β -catenina, permitiendo de esta manera que aumente la capacidad de invasión de las células tumorales (Togo et al., 2008).

En ratones, la eliminación de BAMBI no produce alteraciones significativas en el desarrollo embrionario y postnatal. Los ratones deficientes en BAMBI tampoco presentan fenotipos morfológicos o de conducta diferentes, por lo que la función fisiológica de BAMBI permanece en gran parte desconocida (Chen et al., 2007). Sin embargo, cada vez son más los estudios que relacionan a BAMBI con varios procesos fisiológicos y patológicos. Ejemplo de ello es que la deficiencia en BAMBI promueve un aumento de la liberación de péptidos opiodes endógenos mediado por TGF β , que resulta en una menor sensibilidad nociceptiva en estos ratones (Tramullas et al., 2010). BAMBI también protege frente al efecto pro-fibrótico del TGF β en el remodelado ventricular, y por tanto del fallo cardíaco (Villar et al., 2013). Recientemente se ha demostrado que BAMBI también se expresa en células endoteliales, donde participa en la homeostasis vascular, limitando la angiogénesis, interfiriendo con las vías no canónicas de la señalización de TGF β (Guillot et al., 2012). Por otro lado, BAMBI se encuentra sobreexpresado en diversos tipos de tumores, como es el caso de la mayoría de los cánceres de ovario, del osteosarcoma, del cáncer de colon y del cáncer gástrico, lo que se ha relacionado con un aumento de la proliferación celular y de la capacidad invasiva de las células tumorales, y con la posible aparición de metástasis (Liu et al., 2014; Pils et al., 2010; Zhou et al., 2013). Por el contrario, en cáncer de pulmón, la disminución de la expresión de BAMBI se correlaciona con una mayor capacidad invasiva de las células tumorales, debido al aumento de la EMT mediada por TGF β (Marwitz et al., 2016). De la misma manera, en las células epiteliales de la

próstata, la disminución de la expresión de BAMBI favorece el desarrollo de hiperplasia prostática benigna (He et al., 2016).

En los últimos años, en nuestro laboratorio, hemos comenzado a caracterizar el posible papel de BAMBI en el SI. Nuestros resultados muestran que BAMBI se expresa en linfocitos T CD4⁺ tras la activación vía TCR, y que su expresión aumenta en presencia de TGFβ. BAMBI actúa como regulador de la señalización por TGFβ, de forma que la ausencia de BAMBI en los linfocitos T CD4⁺ potencia las rutas de señalización por TGFβ, tanto dependientes como independientes de proteínas Smad. Además, de acuerdo con estas observaciones, BAMBI juega un papel esencial en los procesos de diferenciación funcional de los linfocitos T CD4⁺ tanto *in vivo* como *in vitro*. Así, la deficiencia en BAMBI en linfocitos T CD4⁺ de ratones BAMBI-KO promueve un aumento en la diferenciación hacia células Treg, e inhibe la diferenciación hacia células Th17, pero no modifica la diferenciación hacia Th1 y Th2. Lo mismo sucede al inhibir BAMBI con un anticuerpo monoclonal (AcM) anti-BAMBI, desarrollado también en nuestro laboratorio, en linfocitos T CD4⁺ de ratones WT. Estos efectos están mediados por la potenciación de la señalización de IL-2 a través de un aumento en la expresión de CD25 en los linfocitos T CD4⁺, por un mecanismo dependiente de Smad3. En correlación con estos hallazgos, los ratones BAMBI-KO están protegidos frente al desarrollo de artritis inducida por colágeno tipo II bovino (CIA), de artritis psoriásica inducida por manano de *Saccharomyces cerevisiae*, y frente al desarrollo de artritis cutánea inducida tras la aplicación tópica de imiquimod, por un mecanismo dependiente de TGFβ y de células Treg (Postigo et al, 2016; Álvarez, 2017). En otro estudio reciente, se ha descrito un aumento en la expresión de BAMBI en los linfocitos T CD4⁺ circulantes y en plasma de pacientes con enfermedad obstructiva crónica con respecto a individuos sanos, y un aumento del ratio Th17/Treg en la sangre de estos pacientes (Zhang et al., 2016). Estos resultados sustentan que una señalización por TGFβ alterada pueda provocar un desequilibrio entre células Treg y Th17, que daría lugar al desarrollo de patologías, y sugieren que BAMBI está jugando un papel fundamental en el control de la homeostasis.

El papel de BAMBI en la funcionalidad del SI no se restringe a su capacidad para regular la diferenciación Treg y Th17. En un estudio reciente, hemos demostrado que la

deficiencia en BAMBI potencia las respuestas inmunes humores T-dependientes e independientes. Al igual que en las células T CD4⁺, la expresión de BAMBI se induce en los linfocitos B tras su activación y regula la actividad proliferativa de estas células y su capacidad de establecer interacciones con los linfocitos TFh (Augustín, 2017).

3.7. TGFβ en el tubo digestivo

TGFβ ejerce sus potentes propiedades inmunomoduladoras en varios órganos, entre ellos el intestino (Letterio and Roberts, 1998). En el intestino, la mayoría de los tipos celulares pueden producir y responder a TGFβ. Así, en la mucosa intestinal, el TGFβ es decisivo en el mantenimiento de la homeostasis inmune, previniendo respuestas aberrantes frente a la microbiota comensal (Konkel and Chen, 2011), y está implicado en los procesos fisiológicos de remodelación intestinal y reparación de heridas (Iizuka and Konno, 2011).

Una señalización alterada de TGFβ se asocia con numerosos trastornos intestinales mediados por el SI, como la EII (Benahmed et al., 2007; Feagins, 2010; Giovanni Monteleone et al., 2004).

3.7.1. TGFβ en el SI asociado a mucosa intestinal

TGFβ tiene un papel esencial en el mantenimiento de la tolerancia intestinal, inhibiendo el desarrollo de células Th1 proinflamatorias (Li et al., 2007), e induciendo la diferenciación de células T CD4⁺ vírgenes a células Treg Foxp3⁺ (Chen et al., 2003), las cuales son capaces de suprimir respuestas autoinmunes y de bloquear la colitis experimental (Izcue et al., 2009). La diferenciación a Treg en el intestino es promovida por las DCs CD103⁺ tolerogénicas de la LP, que liberan TGFβ y RA (Coombes et al., 2007). Éstas a su vez se desarrollan bajo la acción del TGFβ, RA y TSLP derivados del IEp (Rescigno and Di Sabatino, 2009). La producción de TGFβ en las DCs está asociada con un aumento de la expresión de αvβ8, que activa a TGFβ induciendo su liberación del LAP. De hecho, la ausencia de αvβ8 en las DCs murinas hace que sean incapaces de inducir la diferenciación a Treg *in vitro*, y está asociado con el desarrollo de colitis severa (Travis et al., 2007). TGFβ

también induce la expresión de Foxp3 en las células iNKT, llevándolas a adquirir un fenotipo inmunorregulador (Monteiro et al., 2010) (Figura 7).

Numerosos estudios evidencian la importancia de TGF β en la supresión de la inflamación intestinal. Ratones deficientes en TGF β 1 desarrollan inflamación en múltiples órganos, entre los que se encuentra el intestino (Kulkarni and Karlsson, 1993; Shull et al., 1992), y el bloqueo de T β RII promueve la diferenciación de células efectoras y el desarrollo de colitis e inflamación pulmonar (Gorelik and Flavell, 2000). Además, animales con una disrupción en Smad3 muestran una función inmune anormal y desarrollan inflamación crónica intestinal junto con una inflamación severa en varios órganos (Yang et al., 1999).

Por otro lado, TGF β también parece tener un papel pro-inflamatorio, interviniendo en la diferenciación a Th17 en el intestino. Se ha descrito que, en presencia de la citocina proinflamatoria IL-6, TGF β promueve el desarrollo de células Th17 en células murinas del bazo, induciendo la expresión de los factores de transcripción ROR γ t y ROR- α (Yang et al., 2008). IL-23 es la encargada del mantenimiento de las células Th17, y la señalización por TGF β es capaz de aumentar la expresión del receptor de la IL-23, mejorando la respuesta de las células Th17 a esta citocina (Mangan et al., 2006). La importancia de TGF β para el mantenimiento de la población de Th17 está sustentada por la observación de que las células Th17 murinas de bazo y ganglios, en ausencia de TGF β , dejan de producir IL-17 *in vitro* y comienzan a producir IFN γ , propio de una respuesta Th1 (Lee et al., 2009). Por otro lado, hay otros estudios que demuestran que TGF β promueve la diferenciación de Th17 de manera indirecta, a través de la supresión del desarrollo de Th1 y Th2 (Das et al., 2009).

Además, TGF β es una citocina muy implicada en la producción de la IgA secretora. TGF β 1 actúa en sinergia con el RA favoreciendo el cambio de clase a IgA en los centros germinales, en cooperación con BAFF, APRIL e IL-10 (Cerutti and Rescigno, 2008; Seo et al., 2013). Este efecto es promovido por las DCs, que inducen un aumento de la expresión de T β RII en las células B, a través de la producción de la oxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (Tezuka et al., 2007). El papel de TGF β en la generación de IgA se ha demostrado en diferentes modelos experimentales. Por ejemplo, ratones deficientes en Smad7 muestran un incremento del cambio de clase a IgA (Li et al., 2006), y este proceso está

alterado en ratones deficientes en Smad2 (Klein et al., 2006). De acuerdo con esto, ratones deficientes en T β RII presentan una deficiencia significativa de IgA en el suero, tanto en estado basal, como tras la estimulación (Cazac and Roes, 2000).

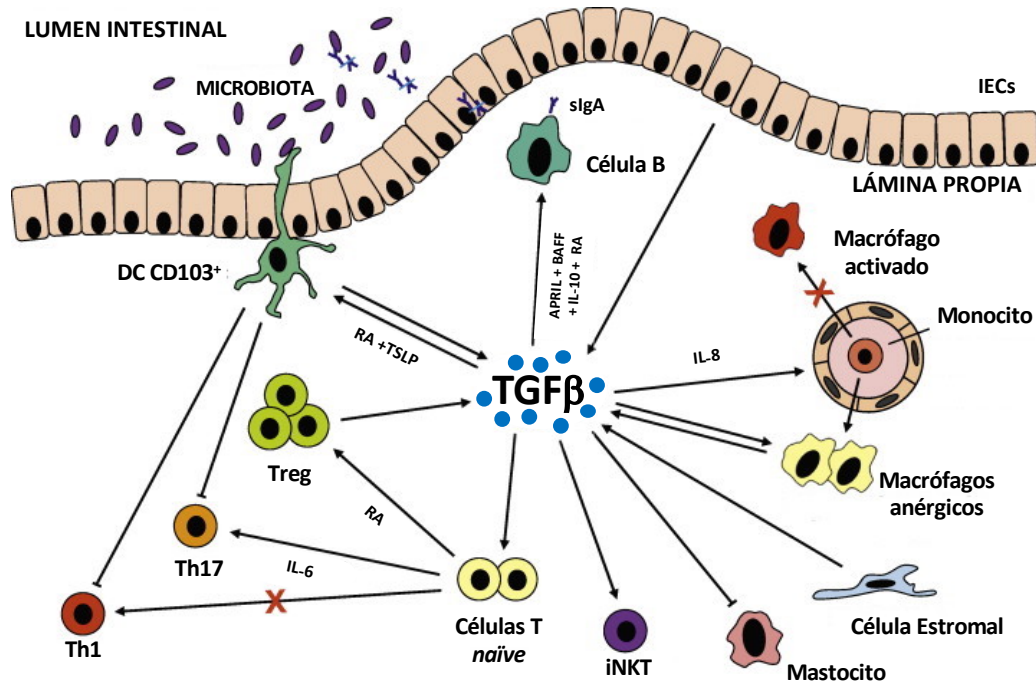


Figura 7. Papel del TGFβ en la homeostasis inmune de la mucosa intestinal. El TGFβ derivado del IEP, junto con el RA y LA TSLP, promueve el desarrollo de DCs CD103⁺ tolerogénicas. Además, TGFβ en sinergia con el RA, induce la diferenciación de células Treg a partir de células T naïve. En presencia de IL-6, TGFβ dirige la diferenciación a célula Th17 mientras que inhibe el desarrollo de células Th1 pro-inflamatorias. Tanto las células Th1 como las Th17 son suprimidas por la acción de las DCs CD103⁺ tolerogénicas. TGFβ induce la expresión de Foxp3 en las células iNKT, las cuales adquieren funciones reguladoras similares a las de las Treg, y disminuye la liberación de mediadores pro-inflamatorios de los mastocitos. El TGFβ derivado de las células estromales, junto con IL-8, recluta monocitos circulantes hacia la lámina propia, donde, en condiciones homeostáticas, se diferencian preferentemente en macrófagos anérgicos que a su vez producen TGFβ. Finalmente, TGFβ se requiere para la inducción del cambio de clase a IgA secretora en las células B, además de otros factores como APRIL, BAFF, IL-10 y RA. Figura modificada de Biancheri et al., 2013.

Finalmente, TGFβ también tiene un papel en células de la RI innata de la mucosa intestinal. Junto con IL-18, actúa como una quimiocina para los monocitos circulantes, reclutándolos a la LP (Smythies et al., 2006), donde durante la homeostasis se diferencian a macrófagos intestinales anérgicos (Smith et al., 2011). TGFβ1 también tiene efectos inmunomoduladores en mastocitos humanos limitando su proliferación y promoviendo la apoptosis. Así mismo, es capaz de controlar la liberación de los mediadores

proinflamatorios, histamina, cisteinil-leucotrienos y $\text{TNF}\alpha$, probablemente modulando la expresión de los receptores de IgE de membrana (Gebhardt et al., 2005).

3.7.2. TGF β en el epitelio intestinal

Varios estudios han demostrado que TGF β tiene efectos protectores en la función de barrera intestinal, la cual es esencial para el mantenimiento de la homeostasis (Suzuki, 2013). En primer lugar, TGF β desempeña un papel en la regulación de la permeabilidad de la barrera epitelial. Se ha visto que TGF β aumenta la resistencia eléctrica transepitelial basal (TER) en líneas celulares de colon humano, de manera dependiente de dosis y de tiempo. La TER es una medida de la permeabilidad paracelular, y su incremento está mediado por un aumento de la expresión de Claudina-1, inducido a través de la activación de MEK/ERK y de proteínas Smad por TGF β (Howe et al., 2005). TGF β también es capaz de inducir la expresión de Claudina-4, potenciando la función de barrera (Hering et al., 2011), y protege del daño que pueden generar ciertas infecciones en la barrera intestinal, que actúan modificando la expresión y distribución de proteínas de uniones estrechas (Howe et al., 2005).

Por otro lado, TGF β juega un papel esencial en la cicatrización de heridas y en la remodelación tisular, caracterizadas por procesos de deposición y regeneración de componentes de la ECM. Estos procesos son controlados por la acción equilibrada de MMPs y de inhibidores tisulares de las MMPs (TIMPs) (Biancheri et al., 2013), que en condiciones homeostáticas se encuentran estrechamente regulados y juegan un papel en la migración de células a la mucosa intestinal y en el proceso de re-epitelización (Sorokin, 2010). TGF β induce la expresión de MMP-1 y MMP-10, lo que promueve la migración de células epiteliales a través del borde de la herida (Salmela et al., 2004). Además, TGF β induce la activación de células mesenquimales y la diferenciación a miofibroblastos, los cuales se caracterizan por un lado por la producción de MMP-1 y proteínas de la ECM como colágeno y fibronectina, y por otro lado por expresar α -SMA (*α -smooth muscle actin*), que les permite contraerse, facilitando el cierre de los márgenes de la herida (Hinz et al., 2012). Dicha contracción ayuda también a la liberación y activación del TGF β latente anclado a la ECM, tras su interacción con integrinas de los miofibroblastos (Wipff et al., 2007). Así, ratones deficientes en ITGB2, que codifica para la cadena 2 de la integrina β ,

presentan alteraciones en la reparación de heridas, debido a una reducción del TGF β 1 activo y a una marcada escasez de miofibroblastos (Peters et al., 2005). Una vez que el proceso de re-epitelización está completo, los miofibroblastos desaparecen por apoptosis (Gabbiani, 2003).

Mientras que niveles controlados de TGF β tienen un papel protector en procesos de curación de heridas, niveles muy elevados de TGF β pueden suprimir la actividad de las MMPs, dando lugar a una excesiva producción, deposición y contracción de la ECM, que conlleva al desarrollo de fibrosis y constricciones intestinales (Vaday et al., 2001).

2.7.3. TGF β en patología intestinal

Se ha postulado que la EII es consecuencia de una excesiva RI frente a los constituyentes de la microbiota comensal, y se caracteriza por un incremento de los niveles de citocinas proinflamatorias en la mucosa intestinal, como TNF α , IFN γ e IL-17, además de fallos en los mecanismos inmunorreguladores (Di Sabatino et al., 2012). El proceso inflamatorio crónico determina una producción desequilibrada de MMPs y TIMPs, lo que causa en última instancia daño tisular, erosiones y ulceraciones (Biancheri et al., 2013). Sorprendentemente, la expresión de TGF β -1 está aumentada en el intestino inflamado de pacientes con EII activa comparado con mucosa no inflamada (Babyatsky et al., 1996). Sin embargo, los bajos niveles de Smad3 fosforilado y de complejos Smad3-Smad4 presentes en la mucosa inflamada, indican que la señalización por TGF β está alterada (Monteleone et al., 2001). En estos pacientes, se observa una marcada sobreexpresión de Smad7 en las células de la mucosa intestinal, debido a modificaciones post-transcripcionales de Smad7 que previenen su ubiquitinización y degradación en el proteasoma, perjudicando de forma crítica la señalización por TGF β (Monteleone et al., 2005). El bloqueo de Smad7 con oligonucleótidos antisentido aumenta los niveles de Smad3 fosforilado en biopsias de pacientes con CD y reduce la producción de citocinas proinflamatorias (Monteleone et al., 2001). De la misma manera, se ha visto que la sobreexpresión de Smad7 en células T en ratones, les vuelve más susceptibles al desarrollo de colitis inducida por DSS (Rizzo et al., 2011).

Las células Treg, aunque están reducidas en la sangre periférica de pacientes con EII activa, están incrementadas en la mucosa inflamada (Maul et al., 2005). Sin embargo, las células T efectoras de la mucosa intestinal de pacientes con EII son hiporrespondedoras a la acción supresora mediada por las Treg. Esto es debido a la mala señalización de TGF β por la elevada expresión de Smad7, de forma que la respuesta de las células T frente a las Treg también se reestablece con el uso de oligonucleótidos anti-sentido de Smad7 (Fantini et al., 2009). Curiosamente TGF β es capaz de inducir el desarrollo de células T Foxp3⁺ productoras de IL-17, que ejercen una acción supresora *in vitro* similar a la de las Treg, y están muy incrementadas en la mucosa inflamada de los pacientes con CD (Hovhannisyan et al., 2011).

En la CD, en la que la inflamación es transmural, los procesos de daño y reparación causan distorsión arquitectónica y espesamiento de todas las capas de la pared intestinal, llevando así a la fibrosis y al desarrollo de constricciones (Burke et al., 2007). Los miofibroblastos de estas regiones expresan mayores niveles de TGF β -1 que en las regiones no inflamadas, sin constricción. También se observa un descenso de los niveles de proteasas degradadoras de tejido, como MMP-3 y MMP-12, y un incremento de las TIMPs, que podrían contribuir a la acumulación anormal de ECM, característica de la fibrosis intestinal de la CD (Di Sabatino et al., 2009). El bloqueo con Ac neutralizantes de TGF β , promueve la producción de MMP-12 y la migración de los miofibroblastos en biopsias de estos pacientes, lo que confirma la importancia de TGF β en los procesos de fibrosis intestinal (Di Sabatino et al., 2009).

3.7.4 TGF β y CRC

El cáncer colorrectal (CRC) es la tercera causa de cáncer y suma el 9% de las muertes asociadas a cáncer (Siegel et al., 2016). La complicación más grave asociada a Enfermedad Inflamatoria Intestinal, fundamentalmente a la UC, es el desarrollo de CRC (Yashiro, 2014).

La señalización por TGF β juega un papel importante en el desarrollo de varios tipos de cáncer, incluyendo el CRC. De hecho, TGF β ejerce un papel dual; hay datos que sugieren que TGF β puede actuar tanto como un supresor, como un promotor tumoral, dependiendo del momento de su activación en el proceso de carcinogénesis. Por un lado,

TGF β inhibe la proliferación de células tumorales en estadios tempranos de la enfermedad, pero por otro lado puede promover la progresión tumoral en estadios más avanzados (Feagins, 2010). Los mecanismos moleculares que conducen a este cambio no se conocen completamente, pero se ha postulado que la activación de vías alternativas de la señalización por TGF β o mutaciones en mediadores implicados en su función supresora del crecimiento celular, podrían explicar este papel dual, al menos en parte (Wakefield and Hill, 2013). Por otra parte, TGF β promueve la EMT, y por tanto la invasión celular. Se ha visto que TGF β disminuye la expresión de proteínas de adhesión celular e induce la expresión de integrinas asociadas a invasión, potenciando la capacidad migratoria de las células tumorales y favoreciendo así los procesos de metástasis (Scheel and Weinberg, 2012). Además, niveles altos de TGF β provocan un aumento de la actividad proteolítica de las células tumorales (Elliott and Blobel, 2005).

La mutación en T β RII es una de las alteraciones más comunes en la señalización por TGF β en células de CRC (Souza et al., 1997), y aunque mutaciones en T β RI no se han relacionado con CRC, un polimorfismo de este receptor se ha asociado con susceptibilidad al desarrollo varios tipos de cáncer, entre ellos CRC (Xu and Pasche, 2007). En modelos animales, el bloqueo de la actividad quinasa de los receptores inhibe el crecimiento de carcinomas de colon, de mama y hepáticos (Herbertz et al., 2015). También se conocen efectores de la señalización intracelular de la vía implicados en la progresión tumoral, como las proteínas Smad. La pérdida de expresión de Smad4 es frecuente en CRC avanzados y se asocia con cáncer de mal pronóstico y metástasis hepática (Alazzouzi et al., 2005; Miyaki et al., 1999). Además, la deficiencia de Smad4 también altera la señalización por BMP, promoviendo el desarrollo de metástasis del CRC vía activación de Rho (Voorneveld et al., 2014). Si bien la fosforilación de Smad3 por T β RI tiene un efecto antiproliferativo, TGF β también puede mediar su fosforilación en un sitio distinto a través de la señalización por JNK, promoviendo en este caso la proliferación celular. Se han descrito niveles elevados de esta fosfoisoforma de Smad3 en displasia, en cáncer y en el modelo de colitis en ratones deficientes en IL-10, y se ha sugerido que durante la carcinogénesis, un cambio en la señalización por TGF β hacia una señalización dependiente de JNK podría proporcionar una ventaja de crecimiento celular, permitiendo por tanto el cambio hacia una señalización proliferativa (Hachimine et al., 2008). Aunque las

mutaciones en Smad3 son poco frecuentes en el desarrollo de CRC esporádico, estas mutaciones parecen contribuir al desarrollo de CRC secundario a inflamación (Ku et al., 2007).

Cabe destacar también la importancia de TGF β en la inducción de angiogénesis y vasculogénesis en células endoteliales y en los pericitos, no solamente durante el desarrollo embrionario, sino también en la carcinogénesis, lo que favorece a su vez la migración y supervivencia de las células tumorales (Gille et al., 2001; van Meeteren and ten Dijke, 2012). Por todo esto, se ha considerado a TGF β como una posible diana para prevenir el crecimiento tumoral y la metástasis.

II. OBJETIVOS

II- OBJETIVOS

Recientemente en nuestro laboratorio se ha demostrado que BAMBI, un inhibidor de la señalización por TGF β a nivel de la membrana celular, se induce en las células T CD4⁺ tras su activación, y modulando la intensidad de la señalización de TGF β , regula positivamente la diferenciación a células Th17 y negativamente la de las células Treg. A su vez hemos observado que la ausencia de BAMBI incrementa la diferenciación a células Treg y los ratones deficientes en BAMBI están protegidos frente al desarrollo de distintas patologías autoinmunes como la CIA o la psoriasis (Postigo et al., 2016; Álvarez, 2017). Así mismo, hemos observado que BAMBI es un regulador de la actividad de los linfocitos B y que la deficiencia en BAMBI potencia las respuestas inmunes humorales *in vivo* frente a antígenos T-dependientes e independientes. (Augustín, 2017). Todos estos resultados indican que BAMBI desempeña un papel esencial en la regulación de la funcionalidad del sistema inmune adaptativo a múltiples niveles. Debido a la abundancia de las poblaciones de linfocitos Treg, Th17 y B en el GALT, en el presente trabajo de Tesis Doctoral nos hemos planteado los siguientes objetivos:

- 1- Comparar la distribución de poblaciones celulares inmunes innatas y adaptativas en el GALT y el perfil de expresión de citocinas en íleon y colon entre los ratones BAMBI-KO y controles WT, en condiciones homeostáticas y durante la inflamación.
- 2- Evaluar el papel de BAMBI en el desarrollo de patología inflamatoria intestinal. Para ello, se estudiará el desarrollo de colitis-DSS en ratones BAMBI-KO y controles WT.
- 3- Estudiar los posibles mecanismos implicados en el fenotipo observado durante el desarrollo de la patología inflamatoria intestinal mencionada anteriormente.
- 4- Analizar la expresión de BAMBI en el IEp del tubo digestivo.
- 5- Evaluar el papel de la microbiota intestinal y de NOD2 en los ratones BAMBI-KO durante el desarrollo de colitis-DSS.
- 6- Estudiar el papel de BAMBI en el desarrollo de cáncer colorrectal asociado a inflamación crónica.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III- MATERIAL Y MÉTODOS

1. RATONES

Para la realización del presente trabajo se emplearon las siguientes estirpes de ratones:

1.1. Ratones cosanguíneos:

- C57BL/6 (**WT**). Utilizados como controles, con fondo genético no predispuesto al desarrollo de autoinmunidad. Suministrados por Harlan-Olac (Barcelona).

1.2. Ratones deficientes (gene knock-out):

- C57BL/6 deficientes en BAMBI (**BAMBI-KO**). Cedido generosamente por el Dr. Juan Carlos Izpisua-Belmonte en el Salk Institute for Biological Studies (La Jolla, California, USA). Los ratones fueron generados por recombinación homóloga en células madre embrionarias, para crear la línea 129SvJ x C57BL/6, en la que los exones 2 y 3 del gen BAMBI fueron eliminados y sustituidos con un marcador de resistencia a neomicina. El exón 1 restante contiene la región 5' no traducida y los primeros 14 aminoácidos que son parte del péptido señal característico de proteínas de membrana o solubles (ver figura 1). Los ratones mutantes fueron cruzados con ratones C57BL/6 durante más de 12 generaciones para transferir la mutación a este fondo genético. El cruzamiento entre ratones BAMBI^{+/-} resultó en mutantes homocigotos (Tramullas et al., 2010).
- C57BL/6 deficientes en NOD2 (**NOD2-KO**). Los ratones NOD2-KO fueron cedidos amablemente por el Profesor Gabriel Núñez (Department of Pathology, University of Michigan) (Kobayashi et al., 2005)
- C57BL/6 deficientes en BAMBI y en NOD2 (**BAMBI-KO/NOD2-KO**). Fueron obtenidos en nuestro laboratorio mediante cruce de ratones BAMBI-KO con ratones NOD2-KO. Los ratones heterocigotos para BAMBI y NOD2 se usaron para obtener los dobles mutantes.

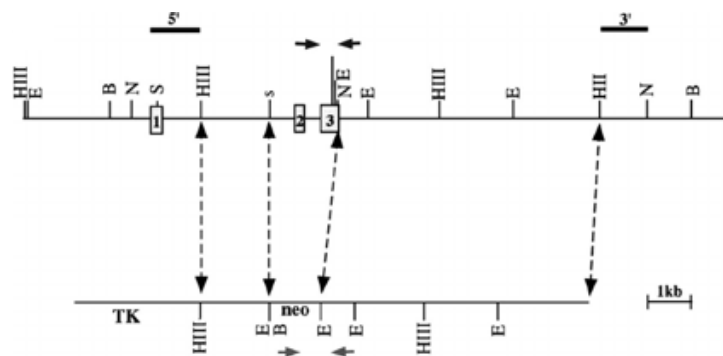


Figura 1. Interrupción dirigida del gen Bambi por recombinación homóloga. Arriba el locus WT de BAMB1 con los 3 exones (recuadros 1-3). Abajo, vector en el que se han reemplazado los exones 2 y 3 con el marcador de resistencia a neomicina (neo). Las flechas indican la posición de los *primers* usados para el genotipado. Figura de Tramullas et al., 2010.

1.3. Otros ratones

- *Athymic Nu/Nu*: denominados **Nude**. Portan una mutación que afecta al desarrollo de la tercera bolsa faríngea, que impide la formación del epitelio cortical del timo, por lo que no generan linfocitos T convencionales.

2. MANTENIMIENTO Y MANIPULACIÓN DE LOS ANIMALES.

Los animales empleados en el presente trabajo fueron mantenidos y manipulados en instalaciones del Servicio de Experimentación y Estabulación Animal de la Universidad de Cantabria. Se utilizaron 2 tipos diferentes de instalaciones: la que hemos denominado como animalario convencional, situada en la Facultad de Medicina y el animalario libre de patógenos específicos (SPF) del Instituto del Biomedicina y Biotecnología de Cantabria. Los animales inmunodeficientes (por ej. los ratones quiméricos o *Nude*) se alojaron en cuartos libres de patógenos, con agua y comida esterilizados. La manipulación se realizó siguiendo en todo momento la normativa del Real Decreto 53/2013.

Cuando fue necesaria una anestesia ligera, los ratones fueron introducidos en una cámara con éter dietílico (Panreac), dentro de una campana de extracción de gases.

3. CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA MEDIANTE PCR.

Para identificar los ratones en BAMBI y en NOD2 se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de DNA genómico, el cual se extrajo de una muestra de 0,3-0,5 cm de la cola de los ratones anestesiados de 3-4 semanas de edad, utilizando el protocolo del *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche).

3.1. Ratones BAMBI-KO

Se utilizaron 2 μ l de DNA por reacción en un volumen final de 25 μ l, y las siguientes concentraciones finales de reactivos: 0,02 U de Biotaq DNA pol (Bioline), 2 mM de $MgCl_2$ (Bioline), 0,2 mM dNTPs (Bioline) y 1 μ M de cada uno de los cuatro *primers*, cuya secuencia se muestra en la tabla 1. Los *primers* 1 y 2 fueron diseñados para amplificar un fragmento de 398 pares de bases (pb) de la región eliminada del alelo WT, y los *primers* 3 y 4 para amplificar un fragmento de 524 pb del cassette de neomicina insertado. Las muestras se sometieron al siguiente protocolo de amplificación: 94°C-3'; 40 ciclos (95°C-30''; 58°C-30''; 72°C-30''); 72°C-10', y mantenerlo a 4°C. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% [diluída en TBE-0,5% (ver apartado 19.1) que contenía un volumen 1:20000 de una solución marcadora de ácidos nucleicos (*RedSafe*, Intron Biotechnology)] en presencia de un marcador de peso molecular (*GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder*, ThermoFisher). Al someter al gel a radiación ultravioleta (UV) en un equipo documentador de imágenes (Gel Doc, Biorad), en los ratones WT se observó una banda de 398 pb y en los ratones BAMBI-KO una de 524 pb (Figura 2).

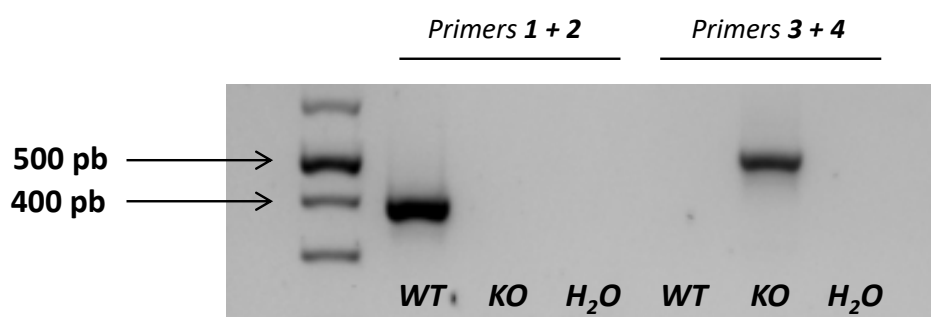


Figura 2. Caracterización de los ratones BAMBI-KO (KO). Calle 1: marcador de peso molecular; calles 2-4: PCR con *primers* 1 y 2; calles 5-7: PCR con *primers* 3 y 4.

3.2. Ratones NOD2-KO

Los ratones NOD2-KO se genotiparon siguiendo un protocolo previamente descrito (Kobayashi et al., 2005). Se utilizaron 4 µl de DNA por reacción en un volumen final de 25 µl, y las siguientes concentraciones finales de reactivos: 0,03 U de Biotaq DNA pol (Bioline), 2,6 mM de MgCl₂ (Bioline), 0,26 mM dNTPs (Bioline) y 5 µM de cada uno de los *primers*, cuya secuencia se muestra en la tabla 1. Las muestras se sometieron al siguiente protocolo de amplificación: 94°C-3'; 40 ciclos (95°C-30''; 60°C-30''; 72°C-30''); 72°C-10', y mantenerlo a 4°C. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% [diluída en TBE-0,5% que contenía un volumen 1:20000 de una solución marcadora de ácidos nucleicos (*RedSafe*, Intron Biotechnology)] en presencia de un marcador de peso molecular (*GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder*, ThermoFisher). Al someter al gel a radiación UV en un equipo documentador de imágenes (Gel Doc, Biorad), en los ratones WT se observó una banda de 894 pb y en los ratones NOD2-KO una de 1000 pb.

	Primer	Secuencia
BAMBI	1	5'-TGTGATAGCGGTTCCCATTGC-3'
	2	5'-CGAGATAAAAGTGCTCCTGTCAGC-3'
	3	5'-TTCGCCAATGACAAGACGCTGG-3'
	4	5'-GGACACAAAGAACCCTGGGAAAG-3'
NOD2	1	5'-TGGAGAAGGTTGAAGAGCAGAGTC-3'
	2	5'-TGACTGTGGCTAATGTCCTTTGTG-3'
	3	5'-TTCCGCCTTCTTGACGAGTTC-3'

Tabla 1. Secuencias de los diferentes *primers* utilizados en PCR para la caracterización de los ratones.

4. OBTENCIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS Y SUSPENSIONES CELULARES.

4.1. Muestras sanguíneas: sangre y plasma

Sangre. Para estudios de citometría de flujo en sangre, se recogieron, previa anestesia con éter dietílico, unos 200 µl de sangre mediante la punción con un capilar en el seno retroorbitario en tubos que contenían 100 µl de heparina sódica (Heparina Mayne 5%, 50 mg/ml, Mayne Pharma), a una concentración de 1 mg/ml. Tras un lavado con 2 ml de PBS/tubo, se descartó el sobrenadante (SN) y se tomaron 75 µl del pellet de células (aprox. 10^6 células) para pasarlos a tubos de citometría.

Plasma. Tras anestesiar a los ratones con éter dietílico, se extrajeron unos 200 µl de sangre mediante la punción con un capilar en el seno retroorbitario en un eppendorf de 1,5ml previamente tratado con 10 µl de heparina pura (Heparina Mayne 5%, 50 mg/ml, Mayne Pharma). Las muestras fueron centrifugadas durante 5' a 3000 rpm, obteniéndose el plasma. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta el momento de su uso.

4.2. Suspensiones celulares

Cuando se realizaron estudios de citometría de flujo de órganos linfoides (PP, MLN), se utilizaron suspensiones celulares de los mismos siguiendo el protocolo descrito a continuación:

Tras sacrificar al ratón por dislocación cervical, los órganos fueron extraídos y sumergidos en PBS a 4°C. A continuación se procedió a su maceración en PBS estéril y las suspensiones celulares se lavaron en PBS-1%BSA mediante centrifugación a 2000 rpm, 3' a 4°C. Tras dos lavados, las células se resuspendieron para su recuento en una cámara de Neubauer, descartando las células muertas por tinción con Azul Tripán (Sigma).

4.2.1. Obtención de células de la LP

En el caso de las suspensiones celulares obtenidas de la LP, se procedió de la siguiente manera: tras sacrificar al ratón por dislocación cervical, se extrajo el colon y se enjuagó con PBS hasta limpiar todo el contenido del lumen intestinal. Con ayuda de unas pinzas y

unas tijeras, se abrió el colon y se cortó en pequeños trozos que se introdujeron en un matraz con 20 ml de solución de desepitelización [HBSS 1x (Sigma), Hepes 1 mM (Sigma), 2% FBS (Sigma), EDTA pH8 5 mM (Serva), DTT 1 mM (Thermo Scientific)], y se mantuvo en agitación magnética 5' a temperatura ambiente (RT) para limpiar la muestra de posibles restos. A continuación, se desechó la solución y se añadieron de nuevo 30 ml de solución de desepitelización, que se mantuvieron durante 30' a 37°C en un agitador orbital, para separar las células epiteliales del resto del intestino. De nuevo se desechó la solución de desepitelización y después se lavaron tres veces las muestras con 10 ml de solución de lavado [RPMI1640 (Sigma) suplementado sin β -mercaptoetanol, 10% FBS (Sigma)], de forma que no quedasen restos de EDTA que pudiesen interferir en los pasos siguientes de digestión. Tras los lavados, se añadieron 30 ml de solución de digestión [solución de lavado, CaCl₂ 1 mM (Merck), Colagenasa IV 0,5 mg/ml (Worthington), Dispasa II 0,5 mg/ml (Sigma), DNasa I 40 μ g/ml (Roche)], y se mantuvieron las muestras en agitación orbital a 37°C durante 1 hora. Si al finalizar el tiempo de digestión, los trozos de intestino no se hubieran disgregado, se dejan las muestras en agitación magnética a RT durante 5' o hasta que el tejido se disgregue. Finalmente se filtró la suspensión con un filtro de nylon de 70 μ m y se centrifugó a 3000 rpm, 5' a 4°C, y las células se resuspendieron para su recuento en la cámara de Neubauer.

5. CARACTERIZACIÓN DE LAS POBLACIONES INMUNOLÓGICAS DE LOS ÓRGANOS LINFOIDES Y DE LA LP

Las poblaciones inmunológicas de los órganos linfoides de ratones WT y BAMBI-KO se analizaron mediante citometría de flujo. 10⁶ células de las diferentes suspensiones celulares fueron incubadas durante 10' a RT con 30 μ l de una dilución 1:100 del SN del cultivo IgG2b de rata anti-Fc γ RII (hibridoma H2B4, clon 2.4G2), con el fin de bloquear los receptores de Fc. Posteriormente, se añadieron 50 μ l de las diluciones apropiadas (en PBS) de los diferentes AcMs (Tabla 2), que reconocen moléculas de superficie celular, conjugados a distintos fluorocromos : FITC (fluoresceína isotiocianato), PE (ficoeritrina), PercP (proteína peridín-clorofila), APC (aloficocianina), APC-Cy7 (aloficocianina-cianina 7)

y PB (azul pacífico). Tras una incubación de 30' a 4°C en oscuridad, las células se lavaron dos veces con PBS a 2000 rpm. En el caso del marcaje de proteínas intracelulares (Foxp3, IL-17A), las células, tras el marcaje de superficie, fueron incubadas con 200 µl de una solución fijadora/permeabilizadora [mezcla de diluyente y concentrado (*Fixation/permeabilization diluent and concentrate*, eBioscience) en relación 3:1 en el caso de Foxp3, y *Fixation and permeabilization solution* (Cytofix/Cytoperm, BD) para la IL-17A], a 4°C en oscuridad durante 30' o durante toda la noche (o/n). Tras un lavado con 1 ml de buffer de permeabilización (*10X Permeabilization Buffer*, eBioscience; diluido a 1X en dH₂O), las suspensiones celulares fueron incubadas con 25 µl de los AcMs diluidos en buffer de permeabilización durante 30' a 4°C.

Después del marcaje (extracelular, intracelular, o ambos), las células fueron resuspendidas en 250 µl de PBS y conservadas a 4°C hasta el momento de su análisis, que fue realizado con un citómetro de flujo FACScanto (Becton-Dickinson, Palo Alto, CA, USA). En general, se adquirieron 3-4 x 10⁴ células en la región de células mononucleares viables acotada en base a los parámetros de tamaño (FSC) y complejidad (SSC). El estudio fenotípico de las poblaciones inmunológicas se realizó utilizando el programa FACS Diva, en base al perfil de expresión simultánea de un conjunto de marcadores. Las poblaciones analizadas en fueron las siguientes:

- Células T (CD3⁺); Tcitotóxicas (CD3⁺ CD8⁺), *Thelper* (CD3⁺ CD4⁺)
- Células Treg (CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺)
- Células Th17 (CD3⁺ CD4⁺ IL17A⁺)
- Células B (B220⁺), B-CG (B220⁺ PNA⁺ FAS⁺)
- Células NK (CD3⁻ CD4⁻ NK1.1⁺)
- Macrófagos (Ia^{b+} CD11b⁺ F4/80⁺)
- DCs (Ia^{b+} CD11c⁺, CD103^{+/-})

En la LP, los marcajes se combinaron con un AcM anti-CD45.2 para diferenciar las células del SI del resto de células no inmunes.

AcM	Isotipo	Clon	Fluorocromo	Laboratorio
Anti- CD3ε murino	IgG1, κ de hámster	145-2C11	APC	Tonbo
Anti-CD4 murino	IgG2a, κ de rata	RM4-5	PercP	Biolegend
	IgG2b, κ de rata	GK1.5	FITC	Biolegend
Anti-CD8a murino	IgG2a, κ de rata	53-6.7	PE	Tonbo
Anti-CD45.2 murino	IgG2a, κ de rata	104	FITC	Tonbo
			APC-Cy7	Biolegend
Anti-CD25 murino	IgG1, λ de rata	PC61.5	APC	Tonbo
Anti-Foxp3 de rata/ratón	IgG2a, κ de rata	3G3	PE	Tonbo
Anti-IL17A murina	IgG1, κ de rata	TC11-18H10	PE	Biolegend
Anti-CD45R/B220 murino/humano	IgG2a, κ de rata	RA3-6B2	PercP	Biolegend
Anti-CD95/Fas murino	IgG2, λ2 de hámster	Jo2	PE	BD-Pharmigen
PNA			FITC	Vector
Anti-Ia ^b murino	IgG2a, κ de ratón	25-9-17	FITC	BD-Pharmigen
Anti-CD11b murino	IgG2b, κ de rata	M1/70	PE	Biolegend
Anti-CD11c murino	IgG, κ de hámster	N418	biotina	Tonbo
Estreptavidina			PercP	BD-Pharmigen
Anti-CD103 murino	IgG, κ de hámster	2E7	APC	Biolegend
Anti-F4/80 murino	IgG2a, κ de rata	13M8	PB	Biolegend
Anti-NK1.1 murino	IgG2a, κ de ratón	PK136	PB	Biolegend

Tabla 2. AcMs utilizados para la caracterización de poblaciones linfocitarias por citometría de flujo.

6. SEPARACIÓN DEL EPITELIO INTESTINAL DEL MESÉNQUIMA

Se obtuvieron muestras de epitelio intestinal siguiendo un protocolo previamente descrito (Nik and Carlsson, 2013). En primer lugar, se extrajo un trozo de intestino de unos 5 cm de longitud de la región deseada y se enjuagó varias veces con PBS frío. A continuación se invirtió el intestino con ayuda de un alambre (Figura 3A) y se lavó pipeteando PBS frío encima de cada pieza con el fin de eliminar todo el moco y los contenidos intestinales restantes. Una vez lavado, un extremo del intestino se ligó con una sutura y el otro extremo se ajustó a una punta *Eppendorf Combitip Plus* (Eppendorf) de 0,5 ml, asegurada con una sutura, con el émbolo hacia fuera y la punta llena de aire. El tejido se sumergió en *Cell Recovery Solution* (Corning) en tubos de 5 ml en hielo y se le insufló aire empujando el émbolo. Se retiró el aire y se le insufló de nuevo cada 5'.

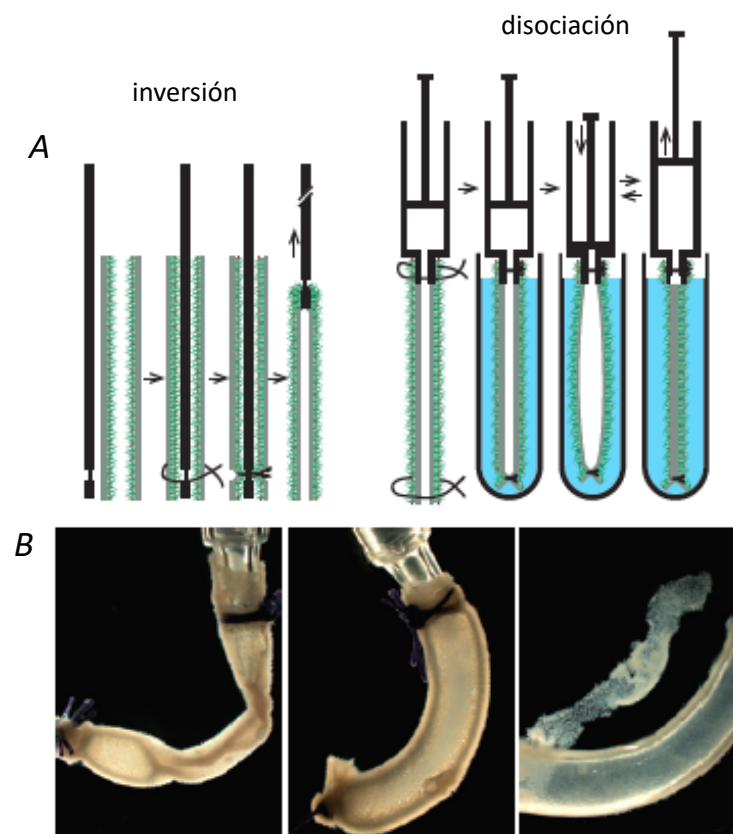


Figura 3. Separación del epitelio intestinal del mesénquima. (A) Esquema de la inversión del intestino y del proceso de disociación de la capa epitelial del mesénquima subyacente mediante la “insuflación” de aire en el intestino sumergido en la solución de disociación *Cell Recovery Solution* (Corning). **(B)** Imágenes que muestran el intestino inflado, ajustado a una punta *Combitip*, y la separación de la capa epitelial. Figura de Nik and Carlsson, 2013.

Durante este tiempo, la solución fue disolviendo la membrana basal y la presión del aire ayudó a la separación de la capa epitelial. Tras aproximadamente 20', el intestino se sumergió de nuevo en PBS frío y se enjuagó, separándose el epitelio epitelial del mesénquima subyacente (Figura 3B) y se recuperó con ayuda de unas pinzas. Se recogieron todos los trozos de epitelio intestinal con ayuda de una pipeta en un tubo eppendorf de 1,5 ml. Las muestras se centrifugaron a 2000 rpm durante 3' a 4°C, se descartó el SN, y se almacenaron a -80°C hasta el momento de su uso.

7. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN POR PCR CUANTITATIVA.

7.1. Extracción del RNA. Técnica del Trizol-Cloroformo.

Tras el sacrificio de los ratones, se extrajeron las muestras de distintas localizaciones del tubo digestivo, y se congelaron para llevar a cabo estudios de RNA. Las muestras congeladas se machacaron con ayuda de un mortero de porcelana (Fisher Scientific) y unos 200 mg de tejido se mezclaron con 1 ml de TRIzol[®] Reagent (Invitrogen), dejándolo actuar 15' a RT, centrifugando después en frío a 13000 rpm, 8'. Tras la centrifugación se recogió la fracción líquida y se añadieron 200 µl de cloroformo (*Chloroform* ≥99.8% A.C.S. reagent; Sigma) por cada ml de TRIzol inicial, agitando vigorosamente y dejando actuar unos 2-3' a RT, tras los cuales se centrifugaron las muestras a 13000 rpm durante 20' obteniéndose tres fases. Se recogió la fase superior, transparente, y se añadieron sobre ella 500 µl de Isopropanol (*2-Propanol, for molecular biology*, ≥99%; Sigma) por cada ml de TRIzol inicial, con vórtex posterior para homogeneizar la mezcla. Se dejó actuar durante 10' a RT y se centrifugó a 13000 rpm, 10' a 4°C, obteniendo un pellet blanquecino que contenía el RNA puro. Tras descartar el SN, se añadió sobre el pellet 1 ml de etanol frío al 75% en H₂O DEPC, libre de RNAsas, centrifugando de nuevo a 8000 rpm, 5' a 4°C. En este momento se eliminó completamente el etanol y el pellet fue resuspendido en el volumen necesario de H₂O DEPC (ver apartado 19.2). Su concentración se determinó midiendo la densidad óptica a 230 nm con un espectrofotómetro (Nanodrop 2000, Thermo Scientific).

Se confirmó la integridad de la muestra de RNA mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% [diluída en TBE-0,5% (ver apartado 19.1) que contenía un volumen 1:20000 de una solución marcadora de ácidos nucleicos (*RedSafe*, Intron Biotechnology)]. Al someter al gel a radiación UV en un equipo documentador de imágenes (Gel Doc, Biorad), se observaron las bandas 28S y 18S del RNA (Figura 4). Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta el momento de su uso.

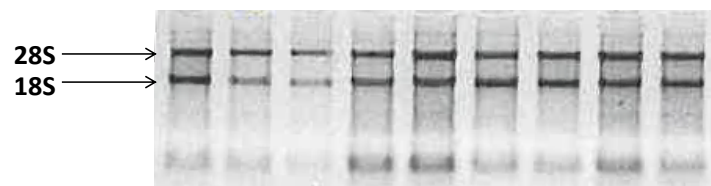


Figura 4. Comprobación de la integridad del RNA. Mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% se observan las bandas 28S y 18S del RNA.

7.2. Obtención del cDNA

El RNA se utilizó como molde para conversión en cDNA mediante retrotranscripción inversa utilizando el kit de Bio Rad *iScript cDNA Synthesis kit*. Se mezclaron 1µg de RNA, 4 µl del mix de reacción iScript, 1µl de la enzima transcriptasa inversa, y se llevó hasta un volumen final de 20 µl con H₂O libre de nucleasas. Esta mezcla fue amplificada en un termociclador (VERITI, Applied biosystems) con el siguiente protocolo: 5'-25°C, 30'-46°C, 1'-95°C, y mantener a 4°C.

7.3. Amplificación del cDNA por PCR cuantitativa

A partir del cDNA obtenido se realizó un estudio de expresión de distintas moléculas en las distintas partes del tubo digestivo utilizando la técnica de la PCR a tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR). Para llevar a cabo el análisis de expresión de citocinas, se utilizaron sondas Taqman específicas para diferentes citocinas (IL-1β, IL-6, IL-17A, TGFβ, IL-10, IL-4, IL-22, IL-23, TNFα, IFNγ) conjugadas al fluorocromo FAM (Applied Biosystems),

y se amplificaron simultáneamente con el gen 18S, utilizando una sonda conjugada al fluorocromo HEX (Eurogentec). Independientemente de la citocina analizada, el protocolo a seguir fue similar, y se desarrolló según el proceso descrito a continuación. Se utilizaron, por reacción, en un volumen final de 22 μ l: 1 μ l de cDNA (500 ng), 11 μ l de buffer (*Premix Ex Taq 2X*, TAKARA), 1,1 μ l de la sonda de la citocina a analizar (Sonda 20X, Applied Biosystems; Tabla 3) y 0,6 de 18S (de un *pool* de cebadores a 7,5 μ M y sonda a 1,5 μ M), alcanzando los 22 μ l con H₂O miliQ estéril. A partir de este pool, se cargaron duplicados de 10 μ l en placas de 96 pocillos (*Thermo-Fast® 96 Semi-Skirted plates*, Thermo Scientific), que se cubrieron con una cubierta adheriva transparente (*Absolute QPCR Seal*, Thermo Scientific). Utilizando un equipo detector de fluorescencia para qPCR (*StepOnePlus Real-Time PCR System*, Applied Biosystems), se sometieron al siguiente protocolo de amplificación, estandarizado para sondas Taqman: 2'-50°C; 10'- 95°C y 40 ciclos (15''- 95°C, 1'-60°C). Los resultados se analizaron utilizando el *StepOne Software* con el método del $\Delta\Delta C_t$, representando la expresión génica relativa de cada una de las citocinas, normalizada con la de 18S.

Para el estudio de otras proteínas se utilizaron *primers* diseñados con la ayuda del programa Primer3 para la amplificación de los distintos genes. En el caso del análisis de la expresión de BAMBI, se diseñaron *primers* que amplifican los exones 2 y 3 del gen. Como gen de referencia se amplificó en paralelo el gen Tbp. Se utilizaron, por reacción, en un volumen final de 22 μ l: 1 μ l de cDNA, 11 μ l de buffer (*SYBR Premix Ex Taq*, TAKARA), 0,95 μ l de los *primers* del gen a analizar (Tabla 4), alcanzando los 22 μ l con H₂O miliQ estéril. A partir de este pool, se cargaron también duplicados de 10 μ l en placas de 96 pocillos (*ThermoFast® 96 Semi-Skirted plates*, Thermo Scientific), que se cubrieron con una cubierta adhesiva transparente (*Absolute QPCR Seal*, Thermo Scientific). Utilizando un equipo detector de fluorescencia para qPCR (*StepOnePlus*, Applied Biosystem) se sometieron al siguiente protocolo de amplificación: 15'-95°C; 40 ciclos (30''-95°C, 45''- 63°C, 30''-72°C); 1 ciclo (15''-95°C, 15''-95°C). Los resultados se analizaron utilizando el *StepOne Software* con el método del $\Delta\Delta C_t$, representando la expresión génica relativa de cada una de las proteínas, normalizada con la de TBP.

Citocina	Ref. librería TaqMan <i>Applied Biosystems</i>
IL-1 β	Mm00434228_m1
IL-6	Mm00446190_m1
IL-4	Mm00445259_m1
IL-10	Mm00439616_m1
TGF β	Mm00441724_m1
IL-17A	Mm00439619_m1
IL-22	Mm00444241_m1
IL-23	Mm00518984_m1
IFN γ	Mm00801778_m1
TNF α	Mm00443258_m1

Tabla 3. Referencias de los *primers* utilizados, tomados de la librería de Applied Biosystems. Todas las sondas fueron adquiridas en formato 20X (*primers* + sonda conjugada al fluorocromo FAM) y se diluyeron hasta 1X en el volumen de reacción.

Gen	Secuencia
Bambi	F: 5'-CCACTCCAGCTACTTCTTCATC-3'
	R: 5'-GTAGCATCTGATCTCTCCTTTGG-3'
E-cadherina	F: 5'-CTGCTGCTCCTACTGTTTC-3'
	R: 5'-CTGGCTCAAATCAAAGTCC-3'
Fibronectina-1	F: 5'-ACATCACTGGGGGTGTGGATT-3'
	R: 5'-GCTGTGACAACTGCCGTAGA-3'
Muc1	F: 5'-GCAGTCCTCAGTGGCACCTC-3'
	R: 5'- CACCGTGGGCTACTGGAGAG-3'

Muc2	F: 5'-GTCGACGAGTGGTTGGTGAATG-3' R: 5'-GATGAGGTGGCAGACAGGAGAC-3'
Muc3	F: 5'-CGTGGTCAACTGCGAGAATGG-3' R: 5'-CGGCTCTATCTCTACGCTCTCC-3'
Muc4	F: 5'-CAGCAGCCAGTGGGGACAG-3' R: 5'-CTGAGACACAGCCAGGGAATC-3'
Tff3	F: 5'-CCTGGTTGCTGGGTCCTCTG-3' R: 5'-GCCACGGTTGTTACACTGCTC-3'
ZO-1	F: 5'-AGGACACCAAAGCATGTGAG-3' R: 5'-GGCATTCTGCTGGTTACA-3'
Claudina-2	F: 5'-GGCTGTTAGGCACATCCAT-3' R: 5'-TGGCACCAACATAGGAACTC-3'
Claudina-4	F: 5'-CGCTACTCTTGCCATTACG-3' R: 5'-ACTCAGCACACCATGACTTG-3'
Reg3 β	F: 5'-TGGGAATGGAGTAACAATG-3' R: 5'-GGCAACTTCACCTCACAT-3'
Reg3 γ	F: 5'-CCATCTTCACGTAGCAGC-3' R: 5'-CAAGATGTCCTGAGGGC-3'
Defcr4	F: 5'-GCTGTGTCTATCTCCTTTGGAGGC-3' R: 5'-CGTATTCCACAAGTCCCACGAAC-3'
Defcr5	F: 5'-AGGCTGATCCTATCCACAAAACAG-3' R: 5'-TGAAGAGCAGACCCTTCTTGG-3'
Defcr-rs10	F: 5'-TCTTCAAGATGCAGCCGTAGGAAT-3' R: 5'-GGTGCCAAGTGCAGGTTTATTTTGG-3'

Tbp

F: 5'-CAAACCCAGAATTGTTCTCCTT-3'

R: 5'-ATGTGGTCTTCCTGAATCCCT-3'

Tabla 4. Secuencias de los diferentes *primers* diseñados utilizados en los estudios de expresión con SYBR Premix. Fueron adquiridos en IDT (Claudina2, Claudina4, ZO-1, Reg3 β , Reg3 γ , Defcr4, Defcr5, Defcr-rs10) y en Invitrogen (Bambi, E-Cadherina, Fibronectina, Muc1, Muc2, Muc3, Muc4, Tff3, Tbp).

8. PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE AcMs.

Se produjeron y purificaron AcMs a partir de las líneas de hibridomas secretores PC61 (productor de IgG1 de rata anti-CD25 murino) y 1D11.16.8 (productor de IgG1 murino anti-TGF β 1 murino).

8.1. Producción en ratones *Nude*

Las células se expandieron mediante cultivo en DMEM suplementado. En ratones atímicos *Nude*, previamente estimulados con pristano (2,6,10,14-tetrametil-pentadecano, Sigma), se inyectaron las células del hibridoma por vía i.p. a razón de 5-10x10⁶ células/ratón. Cuando fue evidente la existencia de ascitis, se extrajo esta mediante punción peritoneal bajo anestesia. Se hizo un *pool* con la ascitis recogida, se centrifugó a 3000 rpm durante 10', se filtró y se conservó a -20°C hasta el momento de su purificación y uso.

8.2. Purificación de los AcMs. Método del ácido caprílico.

El protocolo se inició añadiendo tampón acetato-acético 60 mM (ver apartado 19.1), pH 4, en un volumen 4:1 en relación a la cantidad de ascitis de la que se partía, y se ajustó el pH a 4,5. A continuación se añadió goteando ácido caprílico (*Octanoic acid*, Sigma), a razón de 25 μ l por cada ml de la solución anterior y se sometió a agitación magnética 30' a RT, consiguiendo así romper la emulsión de los lípidos (la solución tomó un aspecto blanquecino con micelas). Tras centrifugar 30' a 12000 rpm y a 4°C, se recogió el SN en un vaso de precipitados, se añadió sobre éste PBS 10X en relación 1:9 y se ajustó el pH a 7,4. En este punto se procedió a precipitar el AcM añadiendo lentamente y en agitación el mismo volumen de sulfato amónico saturado (SAS) filtrado a pH 7 (ver apartado 19.2),

agitando durante 30'-o/n a 4°C. Tras una nueva centrifugación de 30' a 12000 rpm y 4°C, se desechó el SN y el precipitado fue resuspendido en PBS en el volumen deseado. Dicha disolución fue dializada contra PBS en membranas de diálisis (*Mini Dialysis Kit, 8kDa cut-off, 2 ml*; GE Healthcare) durante 3 días. Finalmente se determinó la concentración de anticuerpo calculando la densidad óptica a 260 nm con un espectofotómetro (Nanodrop 2000, Thermo Scientific), y se almacenó a -20°C hasta el momento de su uso.

9. INDUCCIÓN Y VALORACIÓN CLÍNICA DE LA COLITIS INDUCIDA POR DSS

9.1. Inducción

Para la inducción del modelo de colitis por DSS, se administró a los ratones DSS (M.W= 36000-50000, colitis grade, MPBio) al 3% en el agua de bebida de los distintos grupos experimentales. Se midió diariamente el agua consumida y se retiró el DSS cuando el índice de actividad de la enfermedad (DAI) alcanzó valores entre 1,5 y 2, lo que supone habitualmente unos 4 o 5 días. Se utilizaron ratones machos de entre 8 y 12 semanas de edad.

9.2. Valoración clínica

Para valorar el desarrollo de la colitis, los ratones fueron examinados diariamente desde el comienzo del experimento. La severidad de la patología se determinó observando diariamente la pérdida de peso, la consistencia de las heces y la presencia de sangrado en las heces. La pérdida de peso se valoró de la siguiente manera : **0** = pérdida de peso inferior al 1%, **1** = pérdida de peso del 1-5%, **2** = pérdida de peso entre 5 y 10%, **3** = pérdida de peso entre 10 y 20%, y **4** = pérdida de peso superior al 20%. La consistencia de las heces y la presencia de hemorragia tomaron los siguientes valores: **0** = consistencia normal de las heces, sin sangrado rectal, **2** = heces blandas, sangrado leve en las heces, **4** = heces líquidas, sangrado fuerte en las heces. El índice de actividad de la enfermedad (DAI) se calculó haciendo una media de los tres parámetros. Se procedió al sacrificio y

medición del colon de los ratones 8-9 días tras la inducción de la enfermedad. El grado de acortamiento del colon es un parámetro adicional de la severidad del proceso.

10. TRATAMIENTO *IN VIVO* CON AcMs.

10.1. Tratamiento con el AcM IgG1 de rata anti-CD25 (PC61) murino.

La eliminación de las células Treg *in vivo* se realizó mediante un tratamiento con el AcM citolítico IgG1 de rata anti-CD25 (PC61) murino, que consistió en la administración de 0,5 mg (en 200 μ l) de AcM purificado vía i.p. durante 3 días consecutivos, una semana antes de la administración del DSS. La eficacia del tratamiento se verificó mediante citometría de flujo en las células mononucleares de sangre.

10.2. Tratamiento con el AcM IgG1 murino anti-TGF β (1D11) murino.

Para bloquear *in vivo* la acción de TGF β , se administró i.p. 1 mg (en 200 μ l) del AcM IgG1 murino anti-TGF β (1D11) murino purificado. El tratamiento se realizó un día antes de la administración del DSS.

11. GENERACIÓN DE RATONES QUIMÉRICOS

A partir de ratones donantes se obtuvieron suspensiones celulares de la médula ósea de la siguiente forma: primeramente se extrajeron las tibias y fémures de los ratones, seccionando el extremo distal de la epífisis para trabajar con la diáfisis. Con ayuda de una jeringa de 5 ml (Plastipack™) y una aguja de 25G (BD Microlance™ 3) se extrajo la médula ósea perfundiendo PBS frío a presión por la cavidad medular. La médula ósea se disgregó con la jeringa y las células se recogieron en tubos Falcon de 50 ml en hielo para ser contadas, y se mantuvieron en RPMI suplementado a 4°C. A continuación, se procedió a la irradiación de los ratones receptores con una dosis de 950 rads en el servicio de radioterapia del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla con el objetivo de eliminar

todas las células del SI. Antes de la reconstitución de los ratones receptores, las células de los donantes fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 5' para resuspenderlas en PBS a una concentración de 25×10^6 células/ml, inyectándose 200 μ l (5×10^6 células) a través del seno retroorbitario. Los ratones se alojaron durante dos meses en cuartos libres de patógenos con comida y agua esterilizada suplementada con antibióticos [10% soltrim (Almofarma), 2% ciprofloxacino (Normon), y 5% gentamicina (Normon)]. Pasados estos dos meses, los ratones con el SI regenerado a partir de las células donantes, fueron sometidos a un ciclo de colitis-DSS, como se describe en el apartado 9.

12. PROCESAMIENTO Y ESTUDIO HISTOLÓGICO DE LOS TEJIDOS.

Para estudiar el daño epitelial, la infiltración inflamatoria en la mucosa intestinal y el grado de displasia tras la inducción de la colitis por DSS, se realizó un estudio histológico del colon. Los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical tras anestesia, y el colon fue fijado en formol tamponado al 4 % (ver apartado 19.1) durante 24 h. A continuación fueron deshidratados en baños de alcoholes y xiloles a concentraciones crecientes del 70% al 100%, y finalmente se incluyeron en parafina. A partir de estos bloques se realizaron secciones de 4 μ m de grosor, que fueron teñidas con hematoxilina-eosina (H&E) usando métodos convencionales (Bancroft and Bellairs, 1977). Dichas secciones fueron analizadas con un microscopio óptico (Nikon, Eclipse E400), tomando fotografías con el objetivo de 10X.

13. TINCIÓN DE TUNEL

La detección de células apoptóticas se realizó mediante la tinción de TUNEL (*Tdt-mediated dUTP nick end labeling*), con el kit *In situ cell death detection* (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. La fijación y el corte del tejido se realizó tal y como se ha descrito en el apartado anterior. Una vez desparafinados los cortes en baños de xiloles y alcoholes a concentraciones decrecientes del 100% al 50%, y pasados a PBS, las secciones

histológicas se mantuvieron en PBS 1% Tritón (Panreac) durante 45' en agitación. A continuación se lavaron y se trataron con Proteinasa K a una concentración final de 20 µg/ml en Tris HCl 10 mM (pH8), durante 1' a 37°C. Posteriormente se realizaron varios lavados con PBS y se añadió la enzima TdT (*terminal deoxynucleotidil transferase*) junto con la mezcla de nucleótidos dUTP marcados con fluoresceína, de forma que la enzima fuese añadiendo los nucleótidos a los extremos 3'-OH libres de los fragmentos de DNA generados durante el proceso de apoptosis. La reacción se llevó a cabo a 37°C durante 2 horas, en una cámara húmeda oscura. Tras la incubación, los portas se lavaron 3 veces con PBS y se montaron con medio de montaje *ProlongTM Gold antifade reagent* con DAPI (Invitrogen) para su observación en el microscopio láser confocal (Zeiss LSM510) y se tomaron fotos a un aumento 10X.

14. ESTUDIO DE PERMEABILIDAD INTESTINAL

Para el estudio de la permeabilidad intestinal se utilizó un dextrano de alto peso molecular conjugado a fluoresceína (*Fluorescein isothiocyanate-dextran M.W. 4000*, Sigma), que en condiciones fisiológicas no es absorbido por las IECs. Los ratones fueron sometidos a un ciclo de 3 días de DSS, tras el cual fueron mantenidos en ayunas durante 8-10 horas. A continuación se les administró el dextrano-FITC a una concentración de 0,6 mg/g de ratón por vía oral con ayuda de una sonda nasogástrica. En estas condiciones, el nivel de absorción del dextrano-FITC, y por tanto su detección en la sangre, dependerá del grado de preservación del IEp. Cuatro horas después de la administración oral, se extrajo sangre del seno retroorbitario de los ratones y se obtuvo plasma tal y como se describe en el apartado 4.1. El nivel de fluorescencia en plasma se midió en un fluorímetro (Victor 2D, Perkin Elmer).

15. OBTENCION DE MUESTRAS FECALES

15.1. Obtención de SN fecal

Para el estudio de la presencia de Igs en las heces se recogieron pellets fecales en eppendorfs de 1,5 ml y se siguió un protocolo previamente descrito (de Vos and Dick, 1991). Se pesaron las heces y se añadió PBS en proporción 0.1 mg/ml de PBS. Se mantuvo 15' a RT, tras lo cual se agitó y se dejó de nuevo otros 15' a RT. A continuación se agitó hasta que la muestra fecal quedó completamente disgregada y se centrifugó a 13000 rpm durante 10'. Finalmente se recogieron los SN y se almacenaron a -80°C hasta el momento de su uso.

15.2 Obtención de DNA de microbiotas bacterianas fecales

Los estudios de la diversidad de las microbiotas bacterianas se realizaron en ratones WT y BAMBI-KO procedentes de los mismos cruces para minimizar la influencia de la madre en la composición de las microbiotas. Así, se cruzaron ratones WT y BAMBI-KO, y la progenie F1 (BAMBI^{+/-} heterocigotos) fue cruzada entre sí para obtener ratones WT y BAMBI-KO hermanos. A las 3 semanas de vida, estos ratones se separaron en jaulas individuales y 4 semanas después se procedió a su sacrificio o a la inducción de colitis-DSS. Se recogieron pellets fecales de ratones B6 y BAMBI-KO en estado basal y tras la inducción de colitis, tanto en animalario convencional como en instalaciones SPF, en tubos que contenían un líquido preservante (*Fecal DNA collection and preservation mini tubes*, Norgen). El DNA se extrajo usando el kit *Stool Isolation kit* (Norgen), siguiendo las instrucciones del proveedor, y las muestras se almacenaron a -20°C hasta el momento de su uso.

16. CUANTIFICACIÓN DE Igs MEDIANTE ELISA.

La valoración e los niveles de Igs presentes en el SN fecal se realizó mediante la técnica del ELISA (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima). Para ello, las placas de

ELISA (*Maxisorb*; Nunc, Wiesbaden, Germany) fueron incubadas o/n a 4°C con un *coating* específico en función de la determinación (Tabla 6). Tras realizar tres lavados con PBS, las placas fueron incubadas durante al menos 1 hora con 100 µl de solución de bloqueo (PBT) para saturar los sitios de uniones inespecíficas. A continuación, se añadieron las muestras experimentales (50 µl/pocillo), que fueron testadas por duplicado en un rango de diluciones apropiado. Como control positivo y para la realización de la curva patrón, se utilizó un *pool* de sueros testado previamente con niveles elevados de los Igs sometidos a estudio. Las placas de nuevo fueron incubadas o/n a 4°C, tras lo cual se lavaron 5 veces con PBS. A continuación fueron incubadas durante 3 horas u o/n a 4°C con Acs específicos frente a los distintos tipos de Igs murinas conjugados a fosfatasa alcalina (AP) (Tabla 5). La reacción enzimática se valoró tras añadir 50 µl/pocillo de una dilución pNPP (4-*nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate*, Sigma) como sustrato para la fosfatasa alcalina (ver apartado 19.1) utilizando un equipo *Multiskan® FC* (Thermo Scientific) con un filtro de 405 nm. Los datos obtenidos, a los que se les restó el blanco, fueron representados en unidades de titulación en referencia a la curva estándar.

<i>Coating</i>	Concentración	<i>Buffer</i>	Ac secundario
IgG de cabra anti-IgA murina (Invitrogen)	1 µg/ml	Tampón Carbonato	IgG de cabra anti-IgA murina conjugado a AP (Sigma)
IgG de cabra anti-IgG murina (Invitrogen)	2 µg/ml	BBS	IgG de cabra anti-IgG murina conjugado a AP (Sigma)

Tabla 5. Diferentes *coatings* y Acs secundarios utilizados en las determinaciones realizadas mediante ELISA.

17. ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD DE LA MICROBIOTA BACTERIANA

El análisis de la diversidad de las microbiotas bacterianas de los distintos grupos experimentales se realizó mediante la secuenciación masiva de las subunidades 16S del RNA ribosomal. Estos estudios fueron realizados en el grupo de los Profesores Naohiro Inohara y Gabriel Núñez, Department of Pathology, University of Michigan, EE.UU.

Brevemente, se amplificaron aproximadamente 250pb de la secuencia V4 del gen 16S, que se secuenciaron usando un *Illumina MySeq* (Illumina, USA). Las muestras fueron analizadas utilizando Mothur. Tras el trimado, las secuencias fueron alineadas y “sorteadas” con un nivel de confianza del 97%, eliminando también las quimeras. A continuación fueron clasificadas con la base de datos RDP. Las diferencias entre las microbiotas de ratones WT y BAMBI-KO de las distintas condiciones experimentales fueron determinadas por análisis LEfSE y el análisis estadístico se realizó con FDR.

18. INDUCCIÓN Y VALORACIÓN CLÍNICA DE CANCER COLORRECTAL (CRC) ASOCIADO A INFLAMACIÓN CRÓNICA.

18.1. Inducción

Para la inducción del modelo de carcinogénesis colorrectal secundaria a inflamación crónica se utilizaron ratones WT y BAMBI-KO machos de 2-3 meses de edad, y se siguió un protocolo previamente descrito (Neufert et al., 2007). Primeramente se inyectó a día 0 del experimento una única dosis de un cancerígeno colonotrópico, azoximetano (AOM, Sigma), por vía i.p. a una concentración de 10 mg/kg de ratón. Este mismo día se comenzó un ciclo de 4 días colitis-DSS, que se repitió a semana 4 y 7 del experimento.

18.2. Valoración clínica del desarrollo de CRC

Los tres ciclos de colitis -DSS fueron valorados tal y como se describe en el apartado 9.2. Los animales fueron sacrificados 12 semanas después del comienzo del experimento y se procedió a la resección y medición del colon. Tras lavar cuidadosamente el colon con PBS frío, se abrió longitudinalmente y se tomaron fotografías. A continuación se contaron el número de tumores, y se midieron con ayuda de un micrómetro digital. Finalmente, las muestras fueron procesadas para histología tal y como se detalla en el apartado 12.

19. REACTIVOS

19.1. Tampones

- *PBS 1X (PBS)*: Tampón fosfato salino al 1X y pH 7,2. Contiene por litro de agua destilada (dH₂O): 0,8 g de NaCl (Panreac), 0,2 g de KCl (Panreac), 0,2 g de KH₂PO₄ (Panreac), 1,15 g de Na₂HPO₄ (Panreac).
- *PBS 10X*. Contiene por litro de dH₂O: 8 g de NaCl, 2 g de KCl, 2 g de KH₂PO₄, 1,15 g de Na₂HPO₄.
- *PBT*: PBS con 2% BSA y 0,05% (Tween 20).
- *TBE 5X*: Para 1 litro: 54 g de Tris, 27,5 g de ácido bórico (Panreac), 0,5 M de EDTA (Serva) pH 8, y enrasar con dH₂O.
- *Tampón Acetato-acético 60 mM, pH 4*. Para 100 ml: mezclar 18 ml de acetato sódico 60 mM y 82 ml de ácido acético 60 mM.
- *Formol tamponado al 4%*. Para 1 litro: 100 ml de Formaldehído 37% (Scharlau), 900 ml de dH₂O, 6,5 g de Na₂HPO₄ (Panreac) y 4 g de NaH₂PO₄·H₂O (Merk). Llevar a pH 7-7,2.
- *Tampón Borato salino (BBS)*. Para 1 litro: 6,18 g de ácido bórico, 4,38 g de NaCl, 9,54 g Bórax, completando hasta 1 litro con dH₂O y llevando a pH 8,3-8,5.
- *Tampón Carbonato*. Para 1 litro: 1,59 g de Na₂HCO₃ (Serva) y 2,93 g de NaHCO₃ (Serva), completando hasta 1 litro con dH₂O y llevando a pH 9,6.
- *Tampón sustrato para ELISA*: constituye el medio de reacción de la AKP, y está compuesto por una disolución acuosa de 9,7% en volumen de dietanolamina (Panreac), 0,1 mg/ml de MgCl hexahidratado (Serva) y 0,2 mg/ml de azida sódica (Merk). El pH fue ajustado a 9,8 y el tampón fue conservado a oscuridad a temperatura ambiente. En el momento de uso se mezclaron 5 ml de este buffer con 5 mg de pNPP (*4-nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate*, Sigma).

19.2. Soluciones

- *PBS-BSA*. Es una disolución de albúmina sérica bovina (BSA, Serva) en PBS 1X. Las concentraciones se refieren al porcentaje peso/volumen.

- *Sulfato Amónico Saturado (SAS)*: Disolución de 540 g de sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄, Sigma) en 600 ml de dH₂O.
- *H₂O DEPC*: Después de diluir 1 ml de DEPC (dietil pirocarbonato, SERVA) en 1 litro de dH₂O, se incubó durante 24 h a 37°C y finalmente se esteriliza, conservándose después a 4°C.

19.3. Medios de Cultivo

- *Medio de cultivo Eagle de Dulbecco Modificado (DMEM, Gibco)* suplementado. Se suplementó el medio DMEM con Hepes 10 mM, L-Glutamina 2 mM, penicilina-estreptomicina 10 µg/ml, β-mercaptoetanol 10 µM y 10% de suero fetal bovino (FBS) descomplementado previamente por calor y filtrado. Todos estos últimos reactivos fueron comprados a Sigma, St. Louis, MO.
- *Medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco)* suplementado. Se suplementó el medio RPMI con Hepes 10 mM, L-glutamina 2 mM, penicilina-estreptomicina 10 µg/ml, β-mercaptoetanol 10 µM y 10% de suero fetal bovino (FBS) descomplementado previamente por calor y filtrado. Todos estos últimos reactivos fueron comprados a Sigma, St. Louis, MO.

20. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En general, para comprobar la evolución clínica de la patología, el grupo experimental fue comparado con el grupo control correspondiente mediante un test *Two Way ANOVA*. En los estudios de expresión de citocinas y otras moléculas, de los títulos de Igs, de la longitud del colon y del porcentaje de las diferentes poblaciones celulares y, se utilizó un test no paramétrico de *Mann Whitney*. Las diferencias fueron consideradas no significativas cuando $p > 0,05$ (ns), significativas cuando $p < 0,05$ (*), muy significativas cuando $p < 0,01$ (**) y altamente significativas cuando $p < 0,001$ (***). Estos análisis se llevaron a cabo empleando el programa informático *GraphPad Prism® 6.0*.

IV. RESULTADOS

IV- RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN DEL GALT EN LOS RATONES BAMBI-KO

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio encaminados a caracterizar el papel de BAMBI en el SI, demostraron que este inhibidor de la señalización por TGF β participa de forma directa en la regulación de la diferenciación funcional de los linfocitos T CD4⁺ en las subpoblaciones Treg y Th17 (Postigo et al., 2016). Así mismo, hemos observado que BAMBI es un regulador de la actividad de los linfocitos B (Augustín, 2017). La deficiencia en BAMBI promueve defectos intrínsecos en esta población linfocitaria caracterizados por la expresión incrementada de moléculas de membrana implicadas en su activación, supervivencia e interacción con los linfocitos T CD4⁺ (BCR, CD86, ICOSL, BAFFR), por un incremento en su proliferación frente a diversos mitógenos *in vitro* (LPS, anti-IgM, anti-CD40) y por el aumento en las respuestas humorales *in vivo* frente a antígenos T-dependientes e independientes. Todos estos resultados indican que BAMBI desempeña un papel esencial en la regulación de la funcionalidad del sistema inmune adaptativo a múltiples niveles.

Debido a la abundancia de las poblaciones de linfocitos Treg, Th17 y B en el GALT y a la importancia de este tejido en el control de los repertorios linfoides en el SI periférico, en el presente trabajo de Tesis Doctoral hemos caracterizado mediante citometría de flujo la composición celular del mismo en condiciones homeostáticas en los ratones BAMBI-KO en comparación con la observada en los ratones WT controles. En la Figura 1 se muestran cambios importantes en la distribución de distintas poblaciones de linfocitos T y B en las PP, MLN y LP entre ambos grupos experimentales. Así, se observó una disminución en el porcentaje de linfocitos T totales (CD3⁺) y una alteración en el ratio de células T CD4⁺/T CD8⁺ en los ratones BAMBI-KO tanto en la PP como en los MLN, pero no en la LP, en comparación con los ratones WT. En paralelo, se produjo un incremento en el porcentaje de linfocitos B totales y de células B-CG en dichas localizaciones en los animales mutantes (Figura 1).

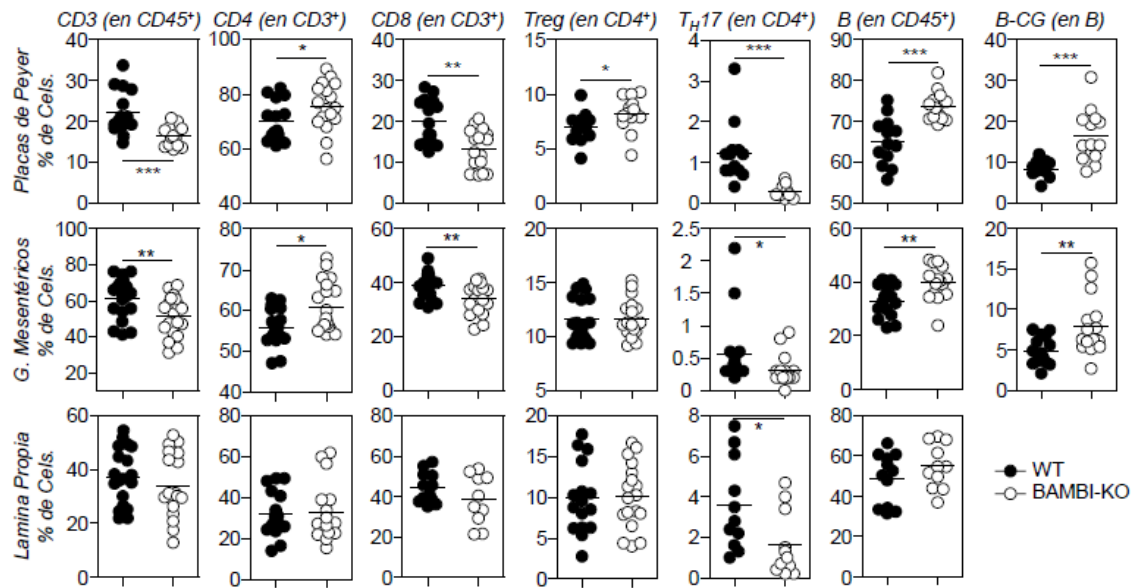


Figura 1. Distribución de las poblaciones linfocitarias en el GALT de ratones WT y BAMBI-KO. Los porcentajes de linfocitos T y B en las PP, GLM y LP del colon de ratones WT (●) y BAMBI-KO (○) de 2-5 meses de edad se analizaron mediante citometría de flujo. Los distintos paneles muestran los porcentajes de cada población celular en ratones individuales. Las barras muestran los valores medios en cada grupo experimental. Las diferencias estadísticas resultantes de un test de *Mann Whitney* se indican como: * ($p<0.05$), ** ($p<0.01$) y *** ($p<0.001$).

El análisis de las subpoblaciones funcionales de linfocitos T $CD4^+$ mostró un incremento leve pero significativo en el porcentaje de linfocitos Treg en las PP, pero no en las otras localizaciones estudiadas, y una disminución generalizada en los linfocitos $Th17$ en los ratones BAMBI-KO en comparación con los controles WT (Figura 1).

En paralelo, se analizó la distribución de distintas poblaciones de células de la RI innata tales como células NK, macrófagos y DC, así como la de subpoblaciones concretas de DC, en el GALT de los ratones BAMBI-KO y controles WT. A diferencia de lo observado en las poblaciones linfocitarias descritas anteriormente, los porcentajes de todas estas poblaciones inmunes innatas fueron similares en ambos grupos de animales en condiciones homeostáticas (Figura 2).

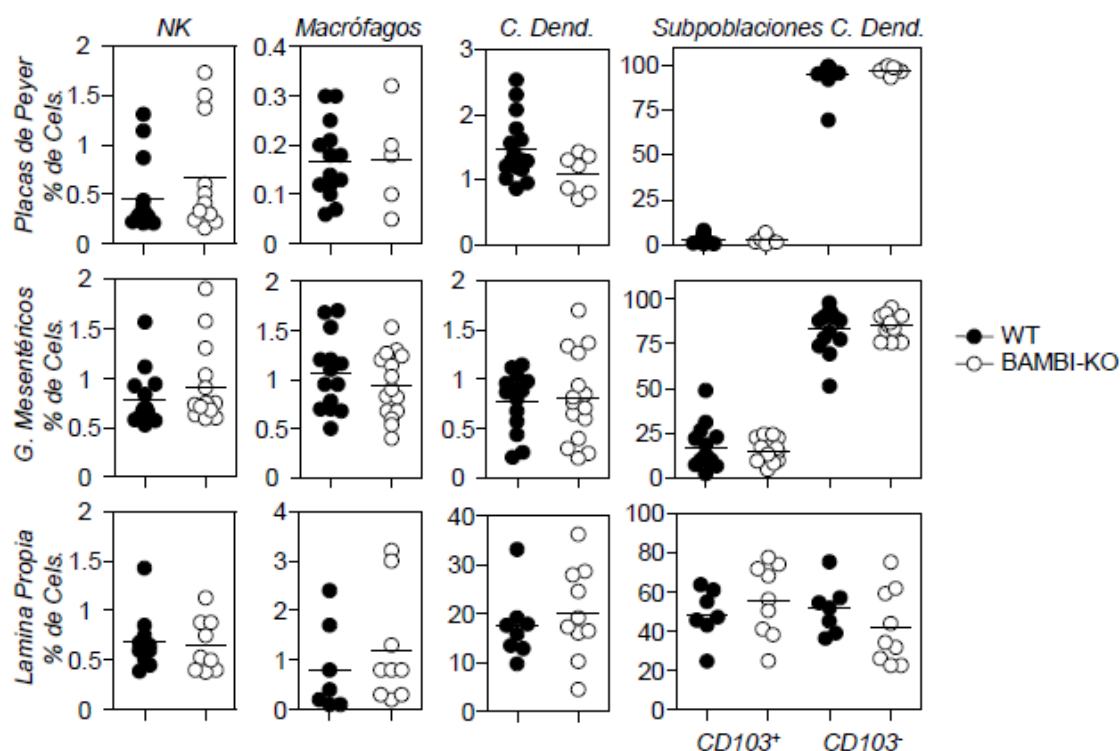


Figura 2. Distribución de poblaciones celulares de la RI innata en el GALT de ratones WT y BAMBI-KO. Los porcentajes de células NK, macrófagos y DC, así como la de la subpoblaciones de DC CD103⁺ y CD103⁻, en las PP, MLN y LP del colon de ratones WT (●) y BAMBI-KO (○) de 2-5 meses de edad se analizaron mediante citometría de flujo. Los distintos paneles muestran los porcentajes de cada población celular en ratones individuales. Las barras muestran los valores medios en cada grupo experimental. No se observaron diferencias estadísticas significativas, mediante test de *Mann Whitney*, entre ambos grupos de animales.

Para completar la caracterización fenotípica y funcional del GALT en los ratones BAMBI-KO en condiciones homeostáticas, se analizó mediante RT-qPCR el patrón de expresión génica de citocinas pro- y anti-inflamatorias en el íleon y colon de estos animales mutantes en comparación con el de los controles WT a los 2-5 meses de edad. Con la excepción en la expresión de IL-10, que se observó incrementada en el íleon, pero no en el colon, de los ratones BAMBI-KO, los niveles de mRNA de las citocinas pro-inflamatorias IL-1 β , TNF α , IFN γ , IL-6, IL-17A, IL-22 e IL-23 y el de las citocinas anti-inflamatorias IL-4 y TGF β fueron similares en ambos grupos experimentales (Figura 3).

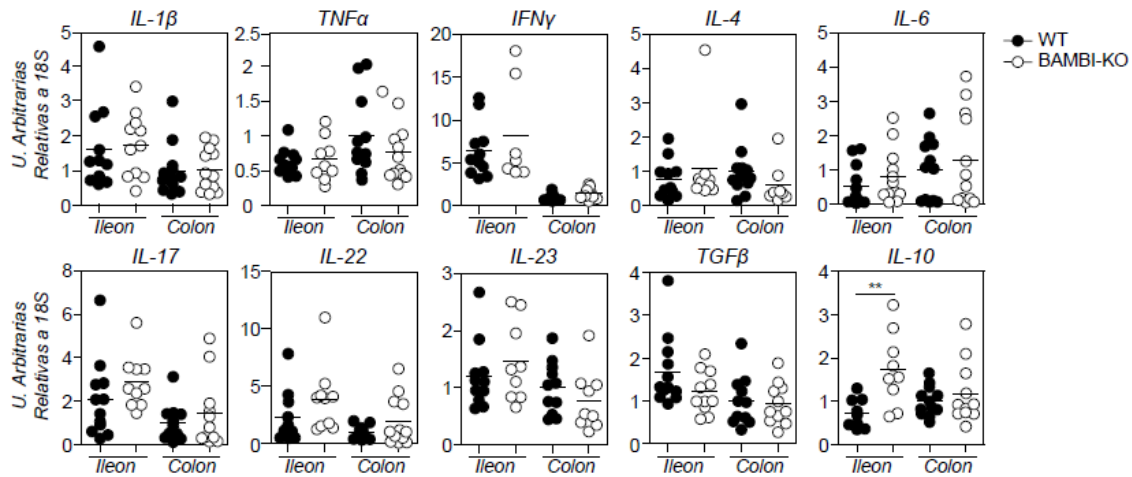


Figura 3. Perfil de expresión génica de distintas citocinas pro- y anti-inflamatorias en el íleon y colon de ratones WT y BAMBI-KO. Se analizó la expresión de mRNA para IL-1 β , TNF α , IFN γ , IL-4, IL-6, IL-17A, IL-22, IL-23, TGF β e IL-10 en las mencionadas localizaciones en los ratones B6 WT (●) y BAMBI-KO (○) de 2-5 meses de edad mediante RT-qPCR. Los distintos paneles muestran los valores de cada citocina con respecto a la expresión de 18S en ratones individuales. Las barras muestran los valores medios en cada grupo experimental. Las diferencias estadísticas resultantes de un test de *Mann Whitney* se indican como: **($p < 0.01$).

2. LA DEFICIENCIA EN BAMBI PROTEGE CONTRA EL DESARROLLO DE COLITIS

La caracterización del GALT en los ratones BAMBI-KO en condiciones homeostáticas muestra alteraciones en la distribución de poblaciones linfocitarias compatibles con lo observado inicialmente en estos ratones en los órganos linfoides secundarios convencionales (bazo y ganglios linfáticos periféricos) (Postigo, 2013). Así mismo, nuestros resultados previos han demostrado que la ausencia de BAMBI o su inhibición farmacológica con un AcM específico desarrollado en nuestro laboratorio, clon B101.37 (IgG1 anti-BAMBI murino), potencia la diferenciación Treg y disminuye la de los linfocitos Th17 tanto in vitro como in vivo, así como induce protección contra el desarrollo de distintas patologías autoinmunes tales como artritis por colágeno de tipo II, psoriasis y artritis psoriásica (Postigo et al., 2016; Álvarez, 2017).

En base a estos hallazgos, se estudió el desarrollo de colitis en los ratones BAMBI-KO en comparación con los ratones WT controles. El modelo experimental empleado en el presente estudio es el modelo de colitis inducido por DSS. Debido a que en este modelo

la composición de la microbiota intestinal juega un papel muy importante en el desarrollo del proceso inflamatorio (Brinkman et al., 2013), los experimentos de colitis que se describirán a continuación se realizaron tras un periodo de cohabitación de los ratones de los distintos grupos experimentales de 2 semanas.

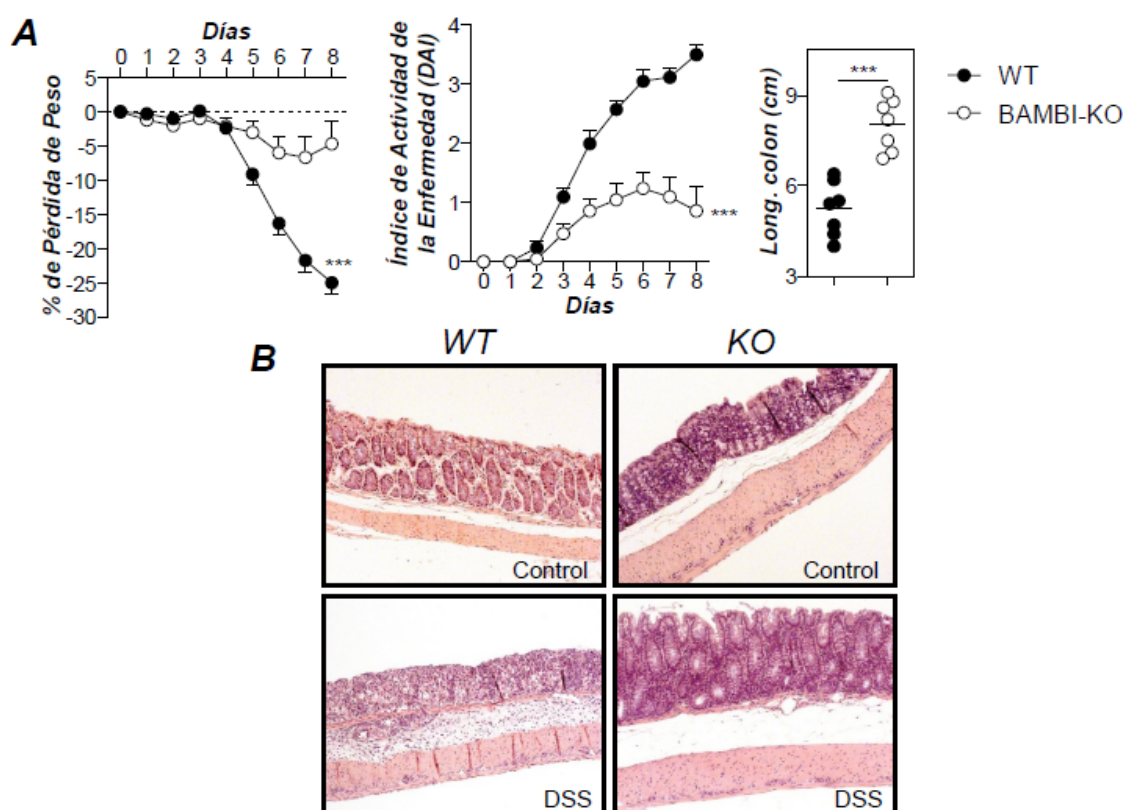


Figura 4. La deficiencia en BAMBI previene el desarrollo de colitis-DSS. Ratones WT y BAMBI-KO de 2-3 meses de edad fueron mantenidos en condiciones de cohabitación durante las 2 semanas previas a la administración oral de DSS disuelto al 3% en el agua del biberón durante 4 días. **(A)** La evolución clínica de la enfermedad se monitorizó valorando la pérdida diaria de peso (panel izqdo), mediante el cálculo del DAI (panel central) y mediante la medición de la longitud del colon tras el sacrificio de los animales el día 8 del experimento (panel dcha). Los resultados en los paneles izqdo y central se expresan como la media $\pm$ SD, mientras que en el panel dcho se muestran los valores individuales de los animales estudiados. Las diferencias estadísticas resultantes de un análisis *Two-Way ANOVA* (paneles izqdo. y central) y de un test de *Mann Whitney* (panel dcho) se indican como: ***($p < 0.001$). Se muestran resultados de un experimento representativo sobre un total de más de 5 experimentos. **(B)** Imágenes representativas de histología (x10) en cortes de colon teñidos con hematoxilina y eosina.

Tal y como ha sido descrito anteriormente (Chassaing et al., 2014), la administración oral de DSS diluido al 3% en el agua del biberón durante un periodo de 4-5 días induce en ratones WT el desarrollo de colitis severa (Figura 4). La enfermedad afecta fundamentalmente a la mitad distal del colon y se manifiesta por pérdida de peso (Figura

4A, panel izqdo), diarrea y hemorragia (valorados en conjunto en el DAI Figura 4A, panel central) y por un acortamiento importante en la longitud del colon, valorada en el momento del sacrificio de los animales al final del experimento (Figura 4A, panel dcha). Histológicamente, la enfermedad se caracteriza por una atrofia generalizada de las vellosidades intestinales en el colon distal, por la destrucción del epitelio y la aparición de úlceras y por la presencia en la lámina propia y submucosa de un intenso infiltrado de polimorfonucleares y linfocitos (Figura 4B). Cabe destacar que a pesar de que el DSS se administra por vía oral, este tratamiento no induce lesiones en elementos más proximales del tubo digestivo tales como el estómago, duodeno, yeyuno o íleon (datos no mostrados). La severidad de la colitis en los ratones BAMBI-KO fue muy inferior a la observada en los ratones WT. Tanto la pérdida de peso como los valores del DAI tras la administración de DSS fueron significativamente menores en los ratones BAMBI-KO que en los controles WT (Figura 4A). Estas manifestaciones clínicas se confirmaron mediante el estudio anatomopatológico de los animales. Histológicamente, la mucosa del colon de estos animales mutantes aparece preservada tras la administración de DSS y el acortamiento en la longitud de colon al final del seguimiento es significativamente menor que en los controles WT (Figura 4).

Para comenzar a caracterizar el mecanismo de protección en los ratones BAMBI-KO se estudiaron los posibles cambios en la distribución de poblaciones inmunocompetentes en la LP de estos animales antes y tras la administración de DSS, comparándola con la observada en los correspondientes controles WT. La distribución de las poblaciones linfocitarias en la LP del colon de los ratones WT y BAMBI-KO cambia tras la administración de DSS, reproduciéndose el patrón observado en las PP y MLN en condiciones homeostáticas (Figura 5); un incremento en la frecuencia de linfocitos T totales en los ratones WT acompañados de una alteración en el ratio de células $CD4^+/CD8^+$ y una disminución en estos animales en el porcentaje de linfocitos B (Figura 5). Así mismo y en correlación con el desarrollo de la enfermedad, los ratones WT mostraron un incremento significativo en los porcentajes de células Tregs y NKs en la LP tras la administración de DSS (Figura 5). Por último, cabe destacar que la administración de DSS indujo una disminución significativa en el porcentaje de la población de DC $CD103^+$ en los ratones BAMBI-KO (Figura 5).

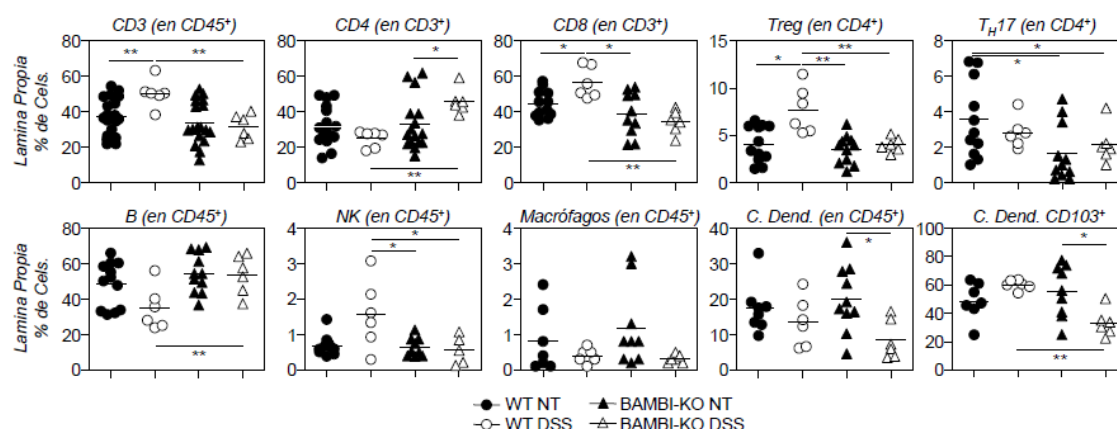


Figura 5. Distribución de poblaciones celulares de la RI adaptativa e innata en la LP del colon de ratones WT y BAMBI-KO antes y tras la administración de DSS. Los porcentajes de distintas poblaciones inmunes en la LP del colon de ratones WT y BAMBI-KO de 2-3 meses de edad antes (NT) y tras la administración de DSS se analizaron mediante citometría de flujo. Los distintos paneles muestran los valores de cada población celular en ratones individuales. Las barras muestran los valores medios en cada grupo experimental. Los valores en los grupos de ratones WT y BAMBI-KO NT son los mismos que los mostrados en las Figuras 1 y 2. Las diferencias estadísticas resultantes de un test de *Mann Whitney* se indican como: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$).

3. LA PROTECCIÓN CONTRA EL DESARROLLO DE COLITIS-DSS EN LOS RATONES BAMBI-KO ES DEPENDIENTE DE TGF β

Previamente, hemos demostrado que la deficiencia en BAMBI o su inhibición en ratones normales con el AcM B101.37, inhibe el desarrollo de distintas patologías autoinmunes por un mecanismo dependiente de los linfocitos Treg (Álvarez, 2017). Aunque la protección contra el desarrollo de colitis-DSS observada en los ratones BAMBI-KO no se asocia con un incremento en el porcentaje de estas células en la LP (Figura 5), analizamos la posible contribución de las mismas mediante su eliminación con un AcM anti-CD25 citotóxico. A diferencia de lo previamente descrito en artritis y psoriasis (Postigo et al., 2016; Álvarez, 2017), la eliminación de los linfocitos Treg CD4⁺CD25⁺ en los ratones BAMBI-KO y WT no indujo cambios en la evolución de la colitis en comparación con sus respectivos controles no tratados (Figura 6).

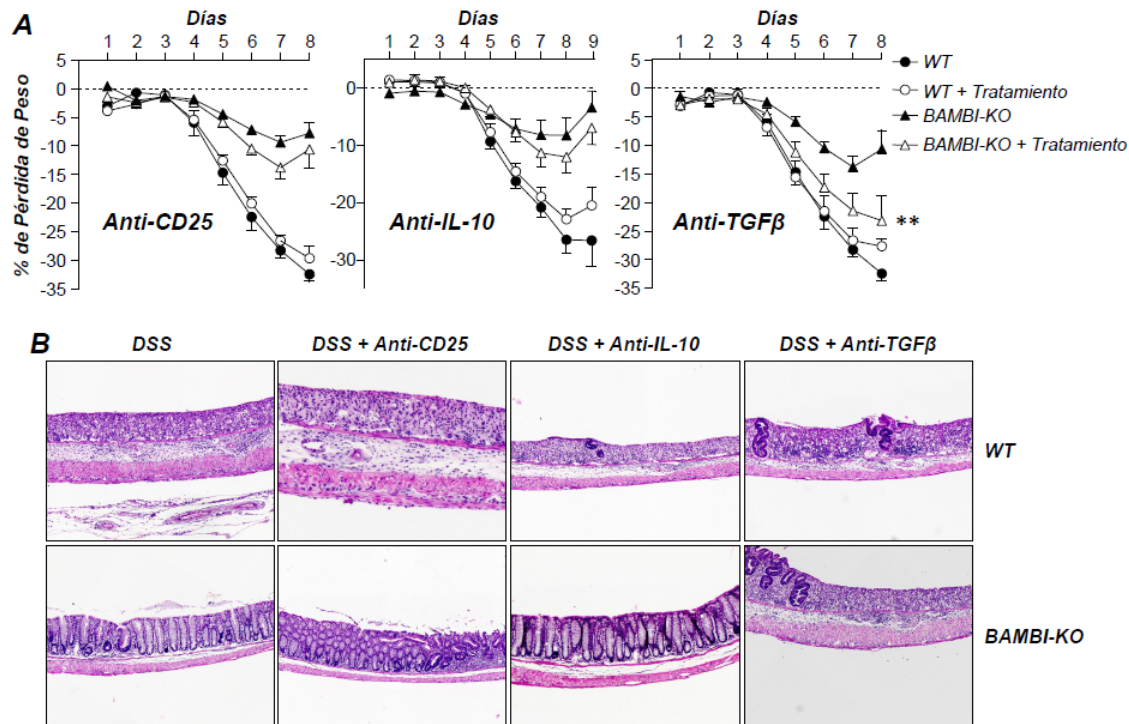


Figura 6. Papel de las células Treg $CD4^+CD25^+$, de la IL-10 y del TGFβ en la protección contra el desarrollo de colitis-DSS en ratones BAMBI-KO. Tras un periodo de cohabitación de 2 semanas, grupos de ratones WT (círculos) y BAMBI-KO (triángulos) fueron tratados con AcM anti-CD25, anti-IL-10 o anti-TGFβ. La colitis-DSS se indujo en estos animales tal y como se ha descrito previamente. **(A)** La evolución clínica de la enfermedad se monitorizó valorando la pérdida diaria de peso. Los resultados se expresan como la media $\pm$ SD de un experimento representativo sobre un total de 3 experimentos. Las diferencias estadísticas resultantes de un análisis *Two-Way ANOVA* se indican como: ** ($p<0.01$). **(B)** Imágenes representativas de histología (x10) en cortes de colon teñidos con hematoxilina y eosina.

Los resultados precedentes muestran que la población de linfocitos Treg con fenotipo $CD4^+CD25^+$ no parece estar implicada en la protección contra el desarrollo de colitis-DSS en los ratones BAMBI-KO. Sin embargo, en el colon existen otras poblaciones linfocitarias con actividad reguladora distintas de los linfocitos Treg $CD4^+CD25^+$, tales como las células Tr1 productoras de IL-10 y los linfocitos Th3 productores de TGFβ, que podrían estar desempeñando un papel activo en la protección observada en estos animales. Para comenzar a analizar este aspecto, se comparó el desarrollo de colitis-DSS entre ratones WT y BAMBI-KO tratados o no con AcM bloqueantes de la IL-10 o del TGFβ. Al igual que lo descrito tras la eliminación de las células Treg $CD4^+CD25^+$, el bloqueo de la IL-10 no modificó la evolución de la enfermedad en ambos grupos de animales (Figura 6). Por el contrario, los ratones BAMBI-KO tratados con anti-TGFβ mostraron una importante pérdida de peso tras la administración de DSS, que fue similar a la observada en los

ratones WT tratados o no con este AcM (Figura 6). La pérdida de protección a nivel clínico fue corroborada en los ratones BAMBI-KO a nivel histológico. Así, se observó que la mucosa del colon de los ratones BAMBI-KO tratados con el AcM anti-TGF β y DSS mostraba las lesiones características de la colitis-DSS (Figura 6).

4. CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL DEL IEP EN LA PROTECCIÓN CONTRA EL DESARROLLO DE COLITIS-DSS EN LOS RATONES BAMBI-KO

Los resultados precedentes ponen de relieve el papel del TGF β en la protección contra el desarrollo de colitis en los ratones BAMBI-KO. Sin embargo, no demuestran si este TGF β deriva de células inmunes con actividad reguladora o de otras poblaciones celulares no inmunes. Así mismo, y dado que BAMBI regula la señalización por TGF β en aquellas células que lo expresan, los resultados descritos anteriormente no permiten descartar que el efecto protector contra el desarrollo de colitis-DSS observado en los ratones mutantes es secundario a la deficiencia en BAMBI en el intestino o en otras poblaciones celulares distintas a las del SI. Para valorar estas posibilidades, se indujo colitis-DSS en quimeras de médula ósea tal y como se describe en la Figura 7. Con este abordaje experimental, se desarrollaron animales en donde el SI deriva de un ratón BAMBI-KO, mientras que el resto de las células del organismo proceden de un animal WT y la situación inversa. El análisis de las quimeras WT $\rightarrow$ WT y BAMBI-KO $\rightarrow$ BAMBI-KO mostró que la irradiación de los huéspedes no modificó el curso natural de la enfermedad descrito en los ratones originales no irradiados. Así, los ratones quiméricos WT $\rightarrow$ WT, al igual que los WT no irradiados, desarrollaron una colitis-DSS severa mientras que los animales BAMBI-KO $\rightarrow$ BAMBI-KO, al igual que los BAMBI-KO no irradiados, estuvieron protegidos contra la enfermedad (Figura 7). La protección contra la colitis-DSS se asoció al fenotipo del huésped y no al origen de las células de médula ósea trasplantadas. En este sentido, las quimeras WT $\rightarrow$ BAMBI-KO mostraron una protección contra la colitis-DSS similar a la observada en las quimeras BAMBI-KO $\rightarrow$ BAMBI-KO, mientras que las quimeras BAMBI-KO $\rightarrow$ WT desarrollaron una enfermedad severa, valorada tanto por criterios clínicos como histológicos (Figura 7).

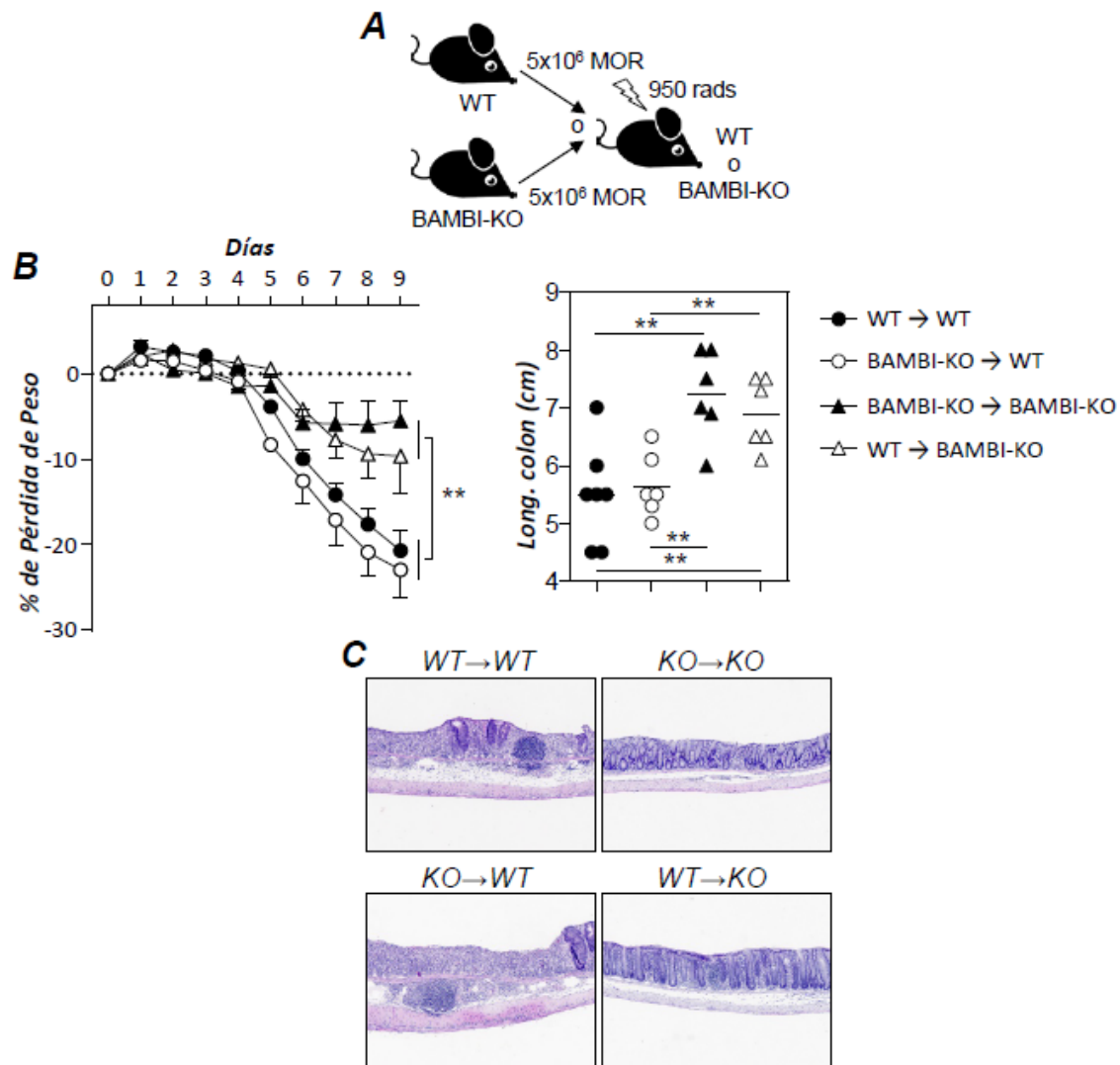


Figura 7. Desarrollo de colitis-DSS en ratones quiméricos de médula ósea. (A) Esquema del desarrollo de las quimeras. Ratones WT y BAMBI-KO de 2 meses de edad fueron irradiados con 950 rads y reconstituidos inmediatamente después con 5×10^6 células de médula ósea procedente de ratones WT o BAMBI-KO. Dos meses tras la reconstitución, se indujo el desarrollo de colitis-DSS en los 4 grupos experimentales mostrados. (B) La evolución clínica de la enfermedad se monitorizó valorando la pérdida diaria de peso (panel izqdo) y mediante la medición de la longitud del colon tras el sacrificio de los animales el día 9 del experimento (panel dcha). Los resultados en el panel izqdo se expresan como la media $\pm$ SD, mientras que en el panel dcho se muestran los valores individuales de los animales estudiados. Las diferencias estadísticas resultantes de un análisis *Two-Way ANOVA* (panel izqdo) y de un test de *Mann Whitney* (panel dcho) se indican como: ** (p < 0.01). Se muestran resultados de un experimento representativo sobre un total de 2 experimentos. (C) Imágenes representativas de histología (x10) en cortes de colon teñidos con hematoxilina y eosina.

Como se comentó anteriormente, la administración oral de DSS a ratones WT induce selectivamente una colitis distal, a pesar de que todo el tubo digestivo está expuesto al

posible efecto tóxico de dicho DSS. En base a esta observación, a los resultados observados en las quimeras de médula ósea y a la importancia que el IEp desempeña en el mantenimiento de la homeostasis intestinal (Peterson and Artis, 2014), planteamos la posibilidad de que BAMBI presente un patrón de expresión restringido en el IEp y que actúe como un modulador de su actividad funcional, condicionando la susceptibilidad al desarrollo de procesos inflamatorios intestinales tales como la colitis-DSS. Para analizar esta hipótesis se estudió en primer lugar en ratones WT el patrón expresión de BAMBI en el IEp en función de su localización anatómica mediante RT-qPCR. Para ello, se purificó IEp de distintas regiones del tubo digestivo; duodeno, yeyuno, íleon y colon.

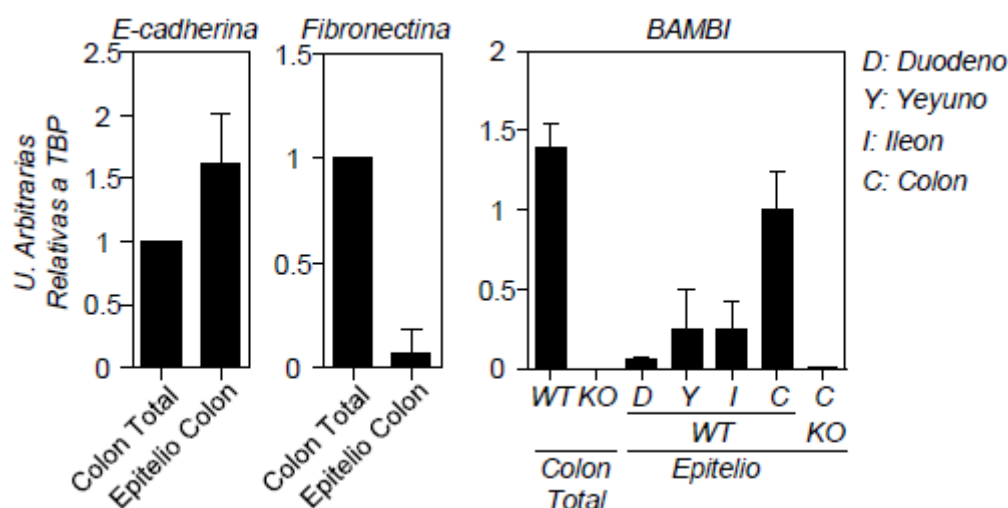


Figura 8. Expresión de BAMBI en el IEp. (A) Valoración de la pureza de las muestras de IEp empleadas en el estudio. La expresión de genes específicos de epitelio (E-Cadherina) o de mesénquima (Fibronectina) se valoró por RT-qPCR en muestras de colon completo o de IEp del colon de ratones WT. **(B)** Análisis de la expresión de BAMBI en el IEp del duodeno, yeyuno, íleon y colon de los ratones WT mediante RT-qPCR. Como control se estudió la expresión de BAMBI en muestras de colon total de ratones WT y BAMBI-KO y en muestras de IEp de colon de estos últimos animales. Los resultados se expresan como la media $\pm$ SD con respecto a la expresión de TBP.

El análisis en las diferentes muestras experimentales de la expresión de genes que selectivamente se expresan en las IECs (E-cadherina) o en células mesenquimales (Fibronectina), nos sirvió para demostrar que el grado de pureza alcanzado en el aislamiento del IEp fue adecuado (Figura 8A). Cabe destacar que BAMBI presenta un patrón de expresión restringido en el IEp, localizándose a niveles altos en el colon y a

niveles muy bajos o indetectables en las otras localizaciones analizadas, en correlación con la distribución anatómica de la colitis-DSS (Figura 8B).

Posteriormente, se estudió el efecto de la ausencia de BAMBI en el IEp durante la inducción de colitis-DSS. Para ello, se analizó la resistencia de dicho epitelio al efecto tóxico del DSS. Tal y como ha sido descrito anteriormente (Araki et al., 2010), la administración de DSS a ratones WT durante un periodo de 3 días, induce la apoptosis masiva de las IECs del IEp, valorada por TUNEL en cortes histológicos del colon de estos animales (Figura 9A). Por el contrario, el IEp del colon de los ratones BAMBI-KO mostró ser resistente al efecto pro-apoptótico del DSS, no observándose un número significativo de IECs positivas para TUNEL en las muestras histológicas de estos animales (Figura 9A).

Por último, se comparó entre los ratones WT y BAMBI-KO el efecto del tratamiento con DSS sobre la permeabilidad del IEp. Tras un ciclo de tratamiento con DSS de tres días, los animales fueron mantenidos en ayunas durante 8-10 hrs. Posteriormente, se les administró por vía oral dextrano-FITC de alto peso molecular. En estas condiciones experimentales, el nivel de absorción del dextrano y su detección en la circulación sanguínea estará en relación con el grado de preservación del IEp (Yan et al., 2009). Así, tanto los ratones WT como los BAMBI-KO que bebieron agua sin DSS, presentaron niveles de fluorescencia en el plasma muy bajos o indetectables 3 hrs tras la administración oral de dextrano-FITC (Figura 9B). Por el contrario, los ratones WT tratados con DSS mostraron niveles significativamente elevados de fluorescencia en sangre (Figura 9B). En correlación con la deficiente inducción de apoptosis en el IEp observada en los ratones BAMBI-KO tratados con DSS, los niveles de fluorescencia en la sangre de estos animales fueron claramente inferiores a los observados en los ratones WT (Figura 9B). Por todo ello, nuestros resultados permiten concluir que el patrón de expresión de BAMBI en el IEp define la distribución anatómica de la colitis-DSS y que su deficiencia incrementa la resistencia de dicho epitelio a la apoptosis y disminuye su permeabilidad tras la inducción de colitis-DSS.

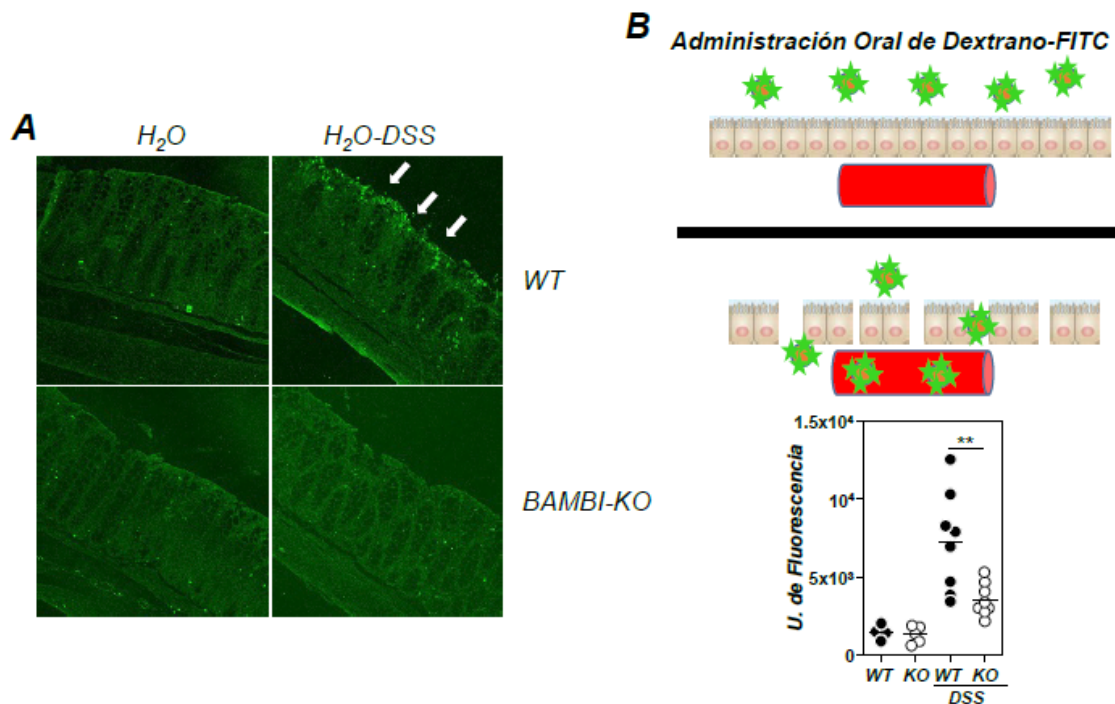


Figura 9. Importancia del IEP en la protección contra el desarrollo de colitis-DSS en ratones BAMBI-KO. (A) Ratones WT y BAMBI-KO de 2 meses de edad fueron tratados con DSS disuelto al 3% en el agua del biberón durante 3 días. La inducción de apoptosis en el IEP del colon en estos animales fue evaluada por TUNEL en cortes histológicos. Imágenes representativas de TUNEL (x10) en dichos cortes. Se muestran resultados de un experimento representativo sobre un total de 2 experimentos. **(B)** Análisis de la permeabilidad del IEP tras la administración de DSS. Ratones WT (●) y BAMBI-KO (○) de 2 meses de edad fueron tratados con DSS durante 3 días. Tras la retirada del mismo, los animales fueron mantenidos en ayunas por un periodo de 8 hrs tras el que se les administró con una sonda nasogástrica una solución conteniendo dextrano de alto peso molecular conjugado a FITC. La presencia de fluorescencia en sangre 3 hrs después de la administración de dextrano-FITC fue valorada en plasma con la ayuda de un fluorímetro. Se muestran los valores individuales de los animales estudiados. Las barras muestran los valores medios en cada grupo experimental. Las diferencias estadísticas resultantes de un test de *Mann Whitney* se indican como: **($p < 0.01$). Se muestran resultados de un experimento representativo sobre un total de 2 experimentos.

El IEP está constituido por una monocapa de diferentes subtipos de IECs que en respuesta a señales del entorno (antígenos alimentarios, microbiota intestinal, SI, toxinas, etc) pone en marcha distintos mecanismos que garantizan su integridad tisular (Peterson and Artis, 2014). Los enterocitos a través de las uniones que establecen entre ellos, garantizan la función de barrera del IEP (Suzuki, 2013). Las células de Goblet son responsables de la secreción de mucinas y otros componentes de la barrera de moco que evita, o al menos minimiza, el contacto excesivo entre los microorganismos de la microbiota intestinal y el IEP (Johansson et al., 2011). Así mismo, existen poblaciones

celulares (células de Paneth en el intestino delgado y enterocitos en el colon) que secretan pequeños péptidos con actividad microbicida; los péptidos anti-microbianos (PAM) (Gallo and Hooper, 2012). Por último, el IEp transporta al lumen intestinal inmunoglobulinas producidas en el GALT (Johansen and Kaetzel, 2011). En base a esto, analizamos si la deficiencia en BAMBI alteró la expresión en el colon de moléculas implicadas en alguno de los mecanismos protectores mencionados anteriormente.

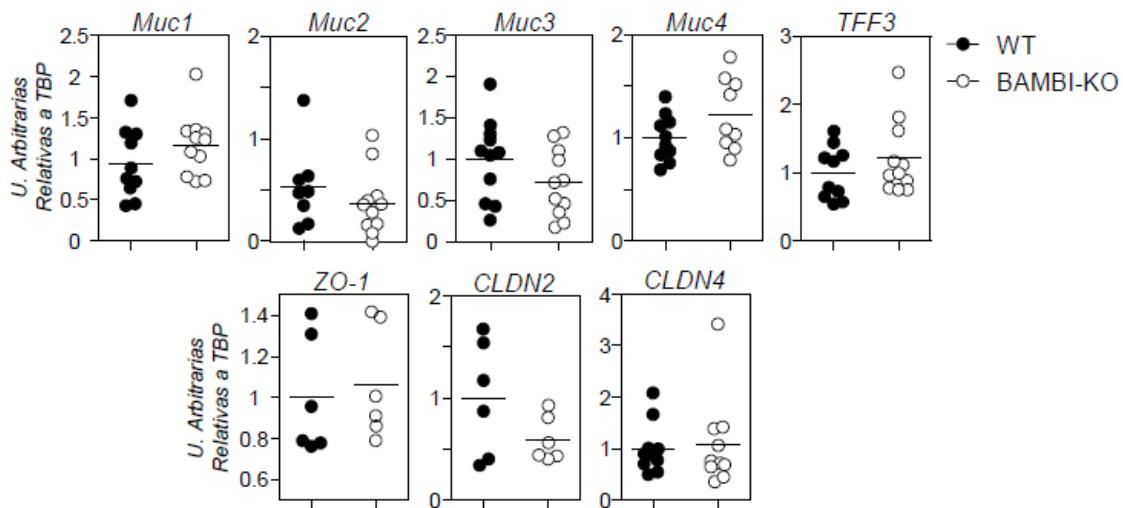


Figura 10. Perfil de expresión génica de distintos componentes del moco y de las uniones estrechas en el colon de ratones WT y BAMBI-KO. Se analizó la expresión de mRNA para Muc1, Muc2, Muc3, Muc4, TFF3, ZO-1, CLDN2 y CLDN4 en el colon de los ratones WT (●) y BAMBI-KO (○) de 2-3 meses de edad en condiciones homeostáticas mediante RT-qPCR. Los distintos paneles muestran los valores de cada gen con respecto a la expresión de TBP en ratones individuales. Las barras muestran los valores medios en cada grupo experimental. Mediante test de *Mann Whitney*, no se observaron diferencias significativas para ninguno de los genes analizados.

El análisis de la expresión génica de distintas mucinas, del TFF3 [*trefoil factor 3*; un péptido secretado por las células de Goblet implicado en la protección y reparación del IEp (Taupin et al., 2000)], y de moléculas implicadas en las uniones estrechas de los enterocitos, fue similar en el colon de los ratones WT y BAMBI-KO en condiciones homeostáticas (Figura 10). Tampoco se observaron diferencias en la expresión en el íleon y colon de los PAM Reg3β y Reg3γ entre los ratones WT y BAMBI-KO (Figura 11A). Defcr4, Defcr5 y Defcr-rs10 son miembros de la familia de las defensinas, unos PAM producidos por las células de Paneth del intestino delgado (Ouellette, 2005). No se observaron diferencias en la expresión de estas defensinas en el íleon entre los ratones WT y BAMBI-KO (Figura 11A). Como cabía esperar, la expresión de las tres defensinas fue prácticamente indetectable en el colon de los ratones WT (Figura 11A). Sin embargo, en

condiciones homeostáticas se detectó la expresión de Defcr4 y Defcr-rs10 en el colon de los ratones BAMBI-KO, aunque a niveles significativamente menores que en el íleon de estos animales (Figura 11A).

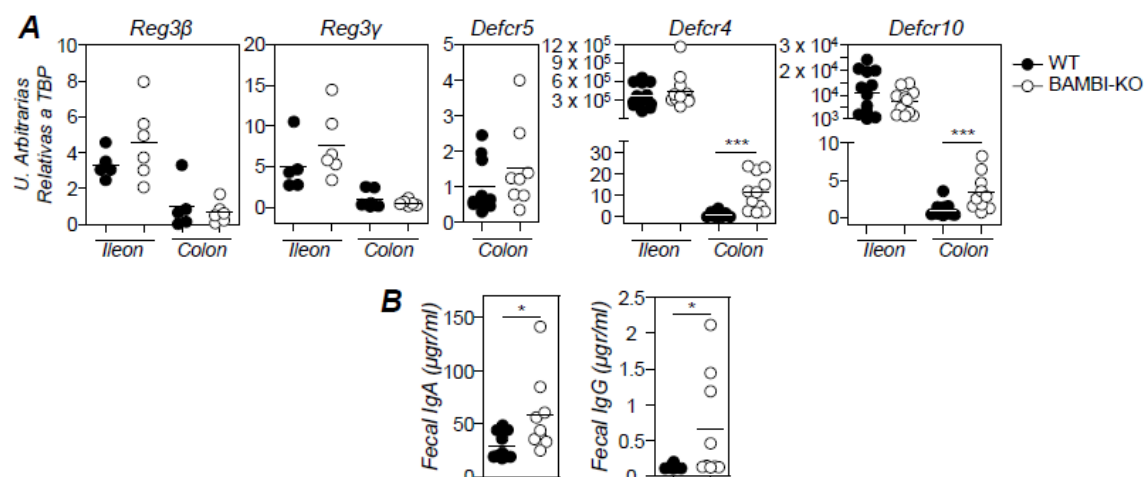


Figura 11. La deficiencia en BAMBI incrementa la expresión de defensinas en el colon y el transporte de anticuerpos al lumen intestinal. (A) Se analizó la expresión de mRNA para Reg3 β , Reg3 γ , Defcr4, Defcr5 y Defcr-rs10 en el íleon y colon de los ratones WT (●) y BAMBI-KO (○) de 2-3 meses de edad en condiciones homeostáticas mediante RT-qPCR. Los distintos paneles muestran los valores de cada gen con respecto a la expresión de TBP en ratones individuales. Las barras muestran los valores medios en cada grupo experimental. **(B)** Los niveles de IgA (panel izqdo) y de IgG (panel dcho) en el bolo fecal de ratones WT (●) y BAMBI-KO (○) se determinaron mediante ELISA. Se muestran los valores individuales de los animales estudiados. Las barras muestran los valores medios en cada grupo experimental. Las diferencias estadísticas resultantes de un test de *Mann Whitney* se indican como: *($p < 0.05$), ***($p < 0.001$).

Finalmente se cuantificaron los niveles de IgA e IgG total en el bolo fecal de los ratones WT y BAMBI-KO mediante ELISA. Un incremento significativo de ambas clases de inmunoglobulinas fue encontrado en las heces de los ratones BAMBI-KO, y como cabía esperar los niveles de IgA fueron claramente superiores a los de IgG (Figura 11B).

5. PAPEL DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN LA PROTECCIÓN CONTRA EL DESARROLLO DE COLITIS-DSS EN LOS RATONES BAMBI-KO

El incremento en la expresión de determinadas defensinas y de anticuerpos IgA e IgG en el colon y bolo fecal, respectivamente, de los ratones BAMBI-KO, nos llevó a analizar si las microbiotas intestinales de estos animales mutantes son distintas que la de

los ratones WT y si estas diferencias podrían ser responsables de la protección a la colitis-DSS en los mismos. Para evaluar este aspecto, se realizaron distintos abordajes experimentales. Los experimentos de colitis-DSS descritos anteriormente, se realizaron en animales estabulados en un animalario convencional expuesto a posibles patógenos. Por este motivo, se comparó la inducción de colitis-DSS entre ratones WT y BAMBI-KO estabulados en un animalario libre de patógenos (condiciones SPF). Sorprendentemente, los ratones BAMBI-KO nacidos y criados en este animalario SPF desarrollaron una colitis-DSS muy severa y similar a la observada en los ratones WT del mismo animalario (Figura 12A).

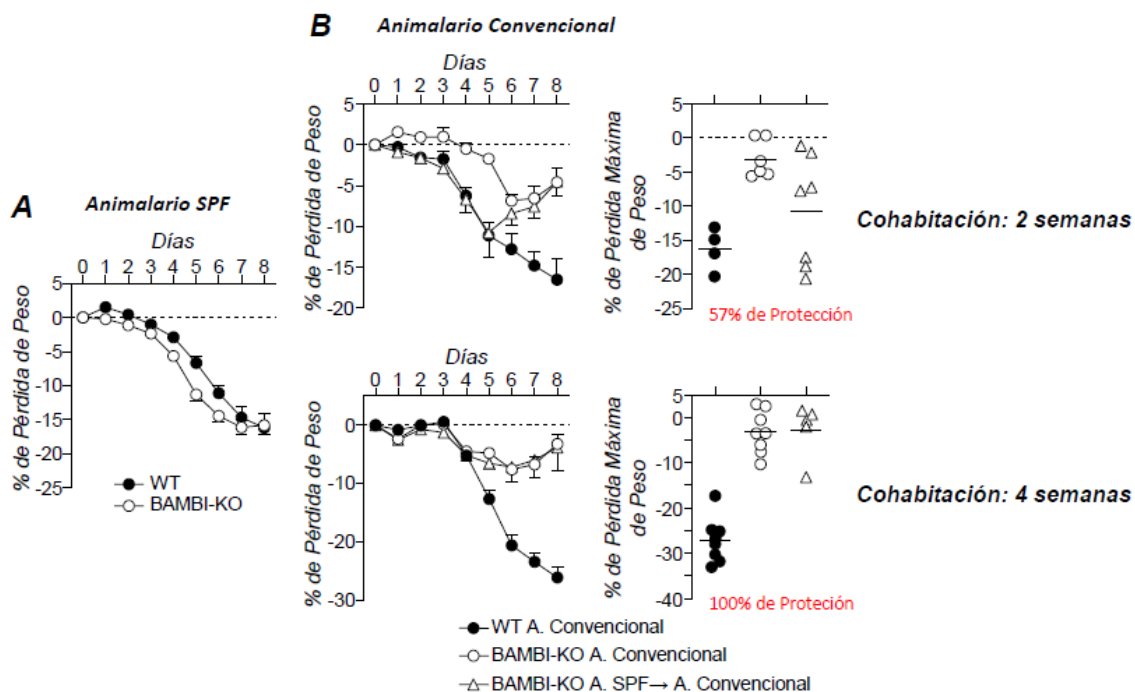


Figura 12. Influencia del estabulario en la protección frente al desarrollo de colitis-DSS en los ratones BAMBI-KO. (A) Evolución de la colitis-DSS en ratones WT (●) y BAMBI-KO (○) de 2-3 meses de edad nacidos y estabulados en un animalario SPF. Los resultados se expresan como la media $\pm$ SD del porcentaje de pérdida de peso en cada día del experimento. Se muestran resultados de un experimento representativo sobre un total de 3 experimentos. (B) Ratones BAMBI-KO nacidos en un animalario SPF fueron transferidos a un animalario convencional y mantenidos en cohabitación con los ratones WT y BAMBI-KO de dicho animalario convencional. Tras un periodo de cohabitación de 2 (paneles superiores) o 4 semanas (paneles inferiores) se indujo colitis-DSS en los ratones WT (●) y BAMBI-KO (○) locales y en los animales BAMBI-KO transferidos (Δ). Se muestra la evolución de la pérdida de peso (gráficas izqda) a lo largo del experimento, expresadas como media $\pm$ SD, y los valores individuales de la pérdida máxima de peso en cada ratón de cada grupo experimental (gráficas dcha) de un experimento representativo sobre un total de 2 experimentos.

En un segundo estudio, los ratones BAMBI-KO fueron trasladados desde el animalario SPF al convencional. Posteriormente, se sometió a los animales BAMBI-KO trasladados a un proceso de cohabitación con los ratones WT y BAMBI-KO residentes, con el fin de homogeneizar sus microbiotas intestinales previamente a la inducción de colitis-DSS. Tras un periodo de cohabitación de 2 semanas, aproximadamente el 60% de los ratones BAMBI-KO procedentes del animalario SPF se volvieron tan resistentes al desarrollo de colitis-DSS como los BAMBI-KO residentes y la protección alcanzo un nivel del 100% tras una cohabitación de 4 semanas (Figura 12A). Estos estudios nos permitieron concluir que la composición de la microbiota intestinal era un factor determinante en la protección contra la colitis-DSS observada en los estudios iniciales con ratones BAMBI-KO.

En vista de los resultados precedentes, se procedió a la caracterización de las microbiotas bacterianas en el colon de los ratones WT y BAMBI-KO de ambos animalarios, tanto en condiciones homeostáticas como durante el desarrollo de la colitis-DSS, mediante la secuenciación masiva de las subunidades 16S del RNA ribosomal. Para la obtención de las muestras de microbiota, los ratones WT fueron cruzados con ratones BAMBI-KO y posteriormente la progenie F1 (BAMBI^{+/-} heterocigotos) cruzados entre sí. En cada una de las camadas resultantes de este segundo cruce, se identificaron los ratones de genotipo WT y BAMBI-KO homocigotos. A las 3 semanas de vida los ratones WT y BAMBI-KO de cada una de las camadas fueron separados en cajas individuales hasta el momento de su sacrificio o inducción de colitis-DSS cuatro semanas después. Este abordaje experimental se utilizó para minimizar al máximo la influencia de la madre en la composición de las microbiotas del adulto.

El estudio diferencial de las microbiotas se realizó valorando tanto la diversidad- α (Índice de Shannon), que determina cuántas especies microbianas hay en una muestra, y la diversidad- β , que nos da una estimación de como de diferentes son las composiciones de las microbiotas de dos grupos experimentales distintos. Como se muestra en la Figura 13, el Índice de Shannon fue similar en los 8 grupos experimentales analizados. Tampoco se obtuvieron diferencias significativas en todas las comparaciones de diversidad- β realizadas, aunque la comparación entre los grupos de ratones WT y BAMBI-KO estabulados en el animalario convencional y en donde se indujo colitis-DSS dio un valor estadístico muy cercano a la significación ($p= 0.058$) (Figura 13).

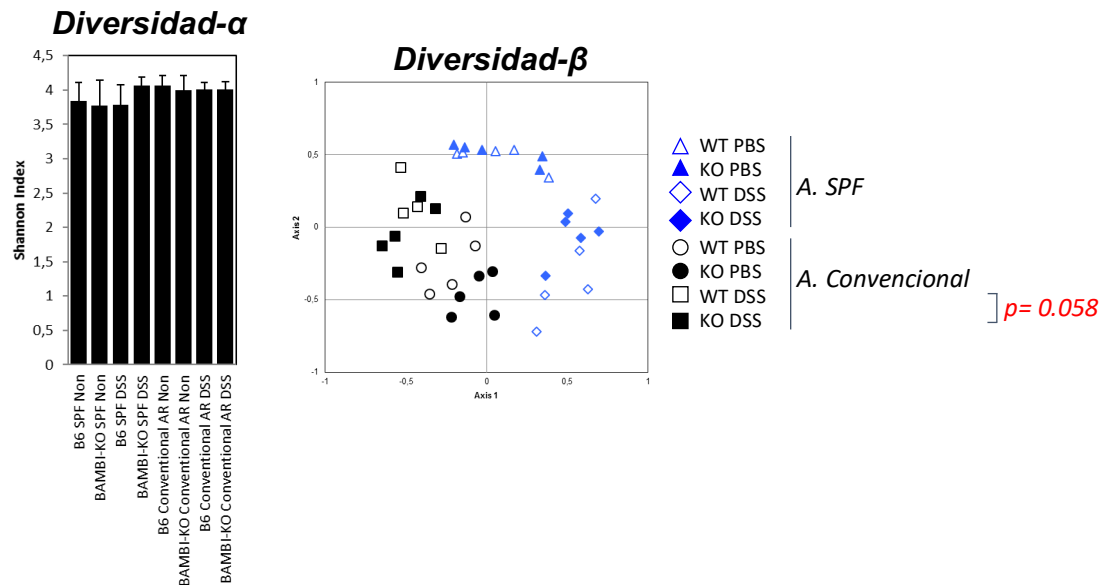


Figura 13. Caracterización de las microbiotas del colon en ratones WT y BAMBI-KO en condiciones homeostáticas y tras la inducción de colitis-DSS. Las microbiotas fueron obtenidas a partir de pellets fecales de ratones WT y BAMBI-KO, tal y como se describe anteriormente. Las secuencias de los genes codificantes para las subunidades 16S del RNA ribosomal fueron analizadas con el programa LEfSE para la estimación del Índice de Shannon y de la diversidad-β. Se analizaron 4-5 microbiotas por cada grupo experimental

Aunque no se encontraron diferencias significativas en la composición global de las microbiotas en ninguna de las comparaciones de los grupos experimentales realizadas, varias especies bacterianas mostraron expansiones solamente en los ratones WT o BAMBI-KO criados en un animalario convencional durante la inducción de colitis-DSS. Así, varias especies de Bacteroidetes tales como *Porphyromonadaceae* y *Prevotella* se acumularon preferencialmente en los ratones BAMBI-KO en correlación con la resistencia a la inducción de colitis (Figura 14), mientras que varios tipos de *Lachnospiraceae* se asociaron con el desarrollo de colitis-DSS en ratones WT (Figura 14).



WT-DSS

6. LA AUSENCIA EN NOD2 BLOQUEA LA PROTECCIÓN CONTRA EL DESARROLLO DE COLITIS-DSS EN LOS RATONES BAMBI-KO.

NOD2 es un miembro de la familia NLR (NOD-like receptor) de Receptores de Reconocimiento de Patógenos (PRR) localizado en el citoplasma de la célula. Junto con NOD1, NOD2 reconoce motivos de peptidoglicanos presentes en las paredes bacterianas y secretados por estas. En particular, NOD2 reconoce selectivamente muramil dipéptido, un dipéptido constituyente de la pared celular de bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas (Kufer et al., 2006). Mutaciones en NOD2 se asocian frecuentemente al desarrollo de Enfermedad de Crohn (Ogura et al., 2001). En referencia al presente estudio, es de destacar que en queratinocitos de la piel, NOD2 presenta una posible relación funcional con la señalización por TGF β , a través de TAK1 (Kim et al., 2008), una quinasa activada en rutas no canónicas de TGF β (Sorrentino et al., 2008).

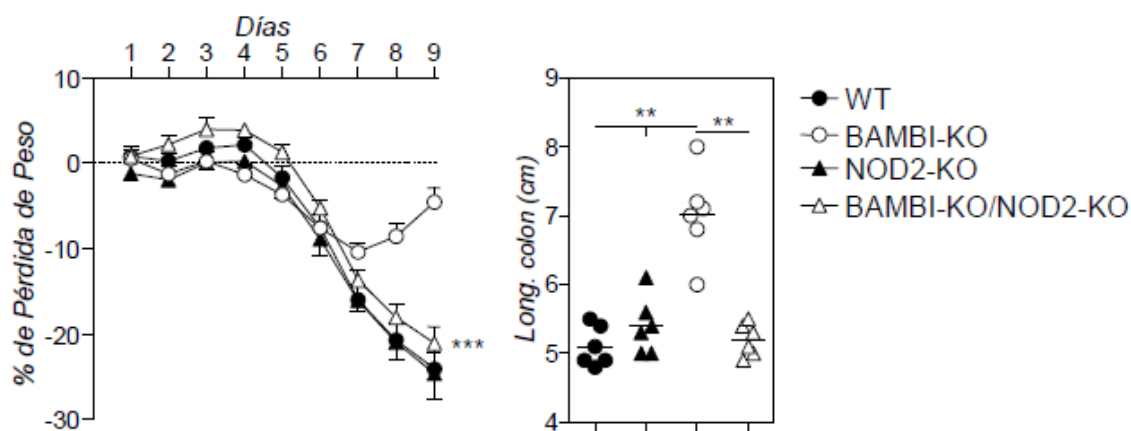


Figura 15. Desarrollo de colitis-DSS en ratones BAMBI-KO/NOD2KO. Se indujo colitis-DSS en ratones WT (●), BAMBI-KO (○), NOD2-KO (▲) y BAMBI-KO/NOD2KO (△). La evolución clínica de la enfermedad se monitorizó valorando la pérdida diaria de peso (panel izqdo) y mediante la medición de la longitud del colon tras el sacrificio de los animales el día 9 del experimento (panel dcha). Los resultados en el panel izqdo se expresan como la media $\pm$ SD, mientras que en el panel dcho se muestran los valores individuales de los animales estudiados. Las diferencias estadísticas resultantes de un análisis *Two-Way ANOVA* (panel izqdo) y de un test de *Mann Whitney* (panel dcho) se indican como: **($p < 0.01$), ***($p < 0.001$). Se muestran resultados de un experimento representativo sobre un total de 3 experimentos.

Teniendo en cuenta las evidencias descritas anteriormente, se analizó la posible implicación de NOD2 en la protección contra el desarrollo de colitis en los ratones BAMBI-KO. Para ello, los ratones BAMBI-KO fueron cruzados con ratones NOD2-KO y en los ratones BAMBI-KO/NOD2KO, KO simples y WT resultantes de estos cruces se analizó el desarrollo de colitis-DSS. Los ratones WT y NOD2-KO desarrollaron una colitis-DSS severa mientras que los ratones BAMBI-KO mostraron protección contra esta enfermedad (Figura 15). Sin embargo, la protección observada en los ratones BAMBI-KO se perdió en los ratones BAMBI-KO/NOD2KO (Figura 15).

7. LA DEFICIENCIA EN BAMBI PROTEGE CONTRA EL DESARROLLO DE CÁNCER DE COLON ASOCIADO A INFLAMACIÓN CRÓNICA

Sin duda alguna, la complicación más grave asociada a la Enfermedad Inflamatoria Intestinal, fundamentalmente la Colitis Ulcerosa, es el desarrollo de cáncer (Yashiro, 2014). Los resultados descritos anteriormente indican que la expresión de BAMBI determina la susceptibilidad al desarrollo de colitis y estudios recientes muestran la existencia de una asociación entre el incremento en la expresión de BAMBI y el desarrollo de tumores colorrectales agresivos metastásicos (Fritzmman et al., 2009; Togo et al., 2008). Para valorar si la deficiencia en BAMBI influye sobre el desarrollo de cáncer colorrectal asociado a inflamación crónica, los ratones WT y BAMBI-KO recibieron una inyección intraperitoneal del cancerígeno azoximetano (AOM), seguido de 3 ciclos de 4 días de DSS en las semanas 1, 4 y 7 del experimento (Figura 16A). Tras 12 semanas, el 100% de los ratones WT y BAMBI-KO presentaron nódulos macroscópicos en la región distal del colon. Sin embargo, tanto el número de nódulos como la extensión de éstos en el colon fue significativamente mayor en los ratones WT que en los BAMBI-KO (Figura 16B). El análisis anatomopatológico de las lesiones mostró la presencia de adenocarcinomas de colon en el 100% de los ratones WT, siendo el 64% de los mismos adenocarcinomas invasivos (Figura 16C). Por el contrario, el 76% de los nódulos encontrados en el colon de los ratones BAMBI-KO fueron adenomas benignos y solamente un 11% fueron adenocarcinomas invasivos (Figura 16C).

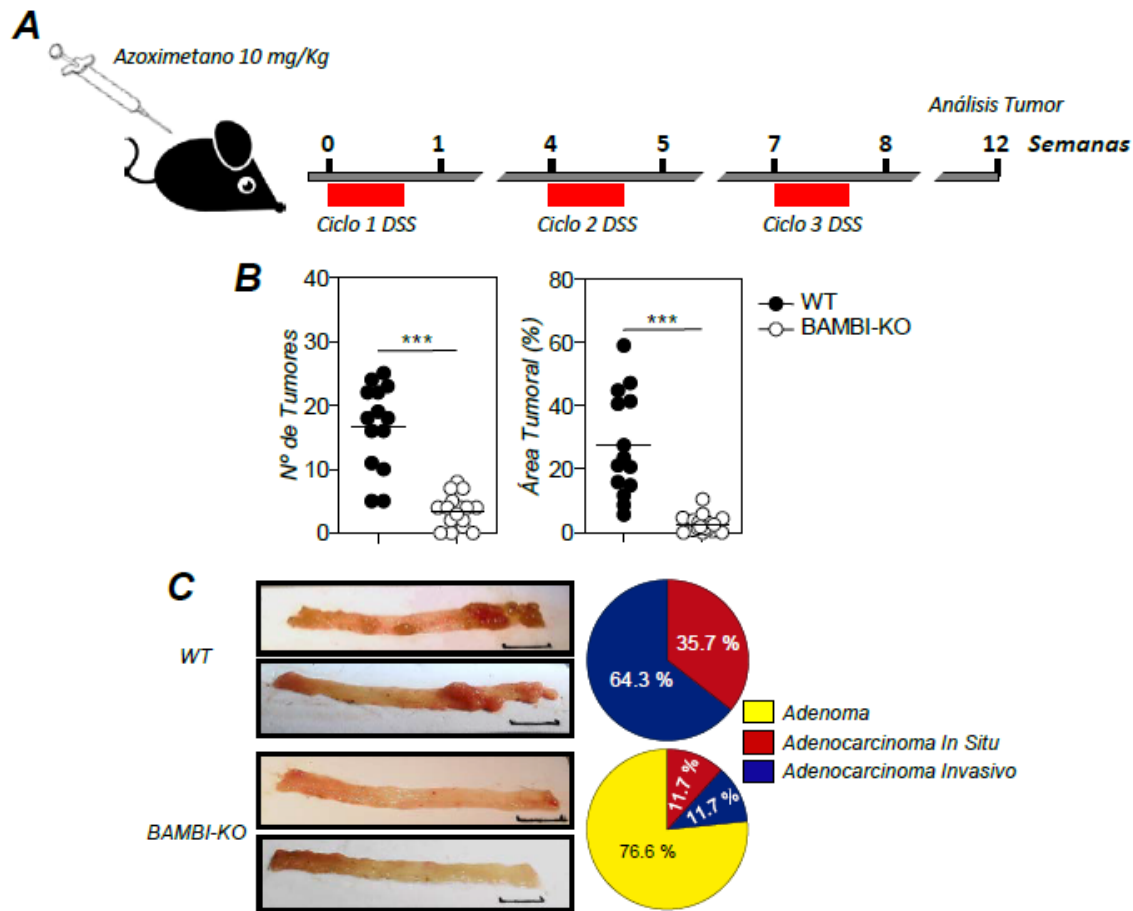


Figura 16. Protección contra el desarrollo de cáncer de colon en ratones BAMBI-KO. (A) Protocolo de inducción de cáncer de colon asociado a inflamación crónica en ratones (B) Número de tumores (panel izqdo) y área tumoral (panel dcho) en el colon de ratones WT (●) y BAMBI-KO (○). Se muestran los valores individuales de los animales estudiados. Las diferencias estadísticas resultantes de un test de *Mann Whitney* se indican como: **($p < 0.01$), ***($p < 0.001$). (C) Imágenes macroscópicas representativas y distribución anatomopatológica de las lesiones en los mencionados grupos experimentales. Se muestran resultados de un experimento representativo sobre un total de 2 experimentos.

V. DISCUSIÓN

V- DISCUSIÓN

Nuestros estudios precedentes han demostrado que BAMBI, un inhibidor de la señalización por TGF β a nivel de la membrana citoplasmática (Onichtchouk et al., 1999), regula múltiples aspectos del funcionamiento del SI adaptativo. La deficiencia en BAMBI en ratones BAMBI-KO o su inhibición en ratones WT con un AcM anti-BAMBI (clon B101.37), potencia la diferenciación de los linfocitos Treg, con potencial tolerogénico, e inhibe la de los linfocitos Th17, con potencial pro-inflamatorio, tanto *in vitro* como *in vivo*, determinando los niveles de expresión de CD25 y de la señalización por IL-2 (Postigo et al., 2016). Así mismo, los linfocitos B deficientes en BAMBI presentan defectos intrínsecos que facilitan su interacción con los linfocitos TFh y potencian su actividad proliferativa *in vitro*, lo que se traduce en un incremento en las respuestas inmunes humorales T-dependientes e independientes en los ratones BAMBI-KO tras inmunización (Augustín, 2017). En base a estos hallazgos, en el presente trabajo de Tesis Doctoral nos propusimos estudiar el papel de este pseudorreceptor de TGF β en la regulación del GALT y en la fisiología intestinal tanto en condiciones homeostáticas como durante el desarrollo de colitis y cáncer de colon.

Los resultados presentados en nuestro estudio permiten en primer lugar definir el papel de BAMBI en el control de la composición del GALT. En condiciones homeostáticas, la ausencia de BAMBI en ratones BAMBI-KO provocó cambios importantes en la distribución de distintas poblaciones linfocitarias en el GALT en comparación con los controles WT. Así, la distribución de linfocitos T en el GALT de los ratones BAMBI-KO de entre 2 y 5 meses de edad es claramente distinta a la observada en los controles WT, con una disminución en el porcentaje de células T totales y un incremento en el ratio de linfocitos T CD4⁺/CD8⁺ en las PP y MLN, aunque no en la LP. Estos cambios se correlacionan con lo observado previamente en los órganos linfoides secundarios convencionales (bazo y ganglios linfáticos periféricos) de estos animales al mes de vida (Postigo, 2013), pero no posteriormente, en donde se restaura el ratio CD4⁺/CD8⁺ observado en los animales WT (Postigo et al., 2016). Un análisis en los ratones BAMBI-KO de las subpoblaciones funcionales de linfocitos T CD4⁺, en cuya diferenciación se ha implicado a BAMBI (Postigo et al., 2016), muestra una disminución

significativa del porcentaje de linfocitos Th17 en todas las localizaciones del GALT analizadas y un incremento en el de Tregs en las PP en comparación con los controles WT. En este mismo sentido, Zhang JC et al. han mostrado recientemente que los pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica presentan un incremento en el ratio Th17/Treg en correlación con un aumento en la expresión de BAMBI en los linfocitos T CD4⁺, tanto a nivel proteico como de expresión génica (Zhang et al., 2016). Así mismo, los porcentajes de células B220⁺ y de linfocitos B-GC se encuentran incrementados en las PP y MLN de los ratones BAMBI-KO, en correlación con el incremento en los niveles de IgG e IgA en el bolo fecal y con las alteraciones en las respuestas inmune humorales frente a antígenos T-dependientes e independientes previamente descritas en estos animales mutantes (Augustín, 2017). Por todo ello, podemos concluir que BAMBI regula de una forma homogénea la composición del SI adaptativo periférico, independientemente del entorno en el que las células se encuentren; en el GALT y en los órganos linfoides secundarios convencionales (bazo y ganglios linfáticos periféricos) los linfocitos están expuestos a cargas antigénicas y entornos estimuladores/tolerogénicos muy diferentes. Sin embargo, estos cambios en las poblaciones linfocitarias observados en los ratones BAMBI-KO no se asocian con alteraciones relevantes en la expresión de citocinas pro- y anti-inflamatorias en íleon y colon, al menos en las condiciones analizadas en el presente estudio.

Un aspecto que queda por esclarecer en el presente trabajo de Tesis Doctoral es el mecanismo por el que la deficiencia en BAMBI condiciona las alteraciones en la distribución de los linfocitos T y B en el GALT de los ratones mutantes. Como se comentará más adelante, nuestros resultados muestran que BAMBI desempeña un papel fundamental en el control de la homeostasis del IEp. En base a esto y al papel del IEp en la comunicación bilateral que se establece entre el SI del GALT y la microbiota intestinal (Mowat and Agace, 2014), podríamos especular que las alteraciones en la distribución de las poblaciones linfocitarias en el GALT observadas en los ratones BAMBI-KO son secundarias a cambios en la respuesta del IEp a señales del entorno y no a un efecto directo de la ausencia de BAMBI sobre la diferenciación y/o activación de estas células. Aunque estudios de citometría de flujo complementarios, usando quimeras de médula ósea en donde linfocitos del GALT procedentes de ratones BAMBI-

KO estén bajo la influencia de un IEp de un ratón WT y viceversa, nos ayudarán a clarificar esta pregunta, consideramos sin embargo que es el efecto directo de la deficiencia en BAMBI sobre la biología de los linfocitos B y T el responsable de este fenómeno. Por un lado, los cambios en la distribución de las poblaciones linfocitarias encontrados en los ratones BAMBI-KO se observan en la mayoría de las localizaciones del GALT analizadas (PP, MLN y LP), mientras que como se discutirá más adelante, la expresión de BAMBI en el IEp se restringe al colon. Por otro lado, nuestros estudios precedentes usando sistemas *in vitro* de diferenciación de linfocitos T CD4⁺ hacia los subtipos Treg y Th17 o cultivos de proliferación de linfocitos B, carentes de cualquier otra población celular inmune o no inmune, muestran claramente que bien la ausencia de BAMBI en células de ratones mutantes a su inhibición en linfocitos de ratones WT con un AcM específico, promueve los defectos mencionados anteriormente (Postigo et al., 2016; Augustín, 2017).

A diferencia de las poblaciones linfocitarias, la deficiencia en BAMBI no indujo cambios en la distribución de distintas poblaciones inmunes innatas (células NK, macrófagos y distintas poblaciones de DC) en condiciones homeostáticas. Recientemente, ha sido demostrado que los macrófagos infiltrantes de gliomas expresan BAMBI y dicha expresión parece promover su diferenciación M1 y su migración (D. Wang et al., 2018). Sin embargo, en el GALT, tanto en condiciones homeostáticas como durante el desarrollo de colitis, no se observaron cambios significativos en el porcentaje de estas células entre los ratones BAMBI-KO y los controles WT, aunque queda por definir en más detalle el fenotipo M1 o M2 de los mismos en ambas cepas de animales y condiciones experimentales. Así mismo, queda por esclarecer el posible papel de BAMBI en la diferenciación y/o función de otras poblaciones celulares de la RII. En este sentido, es necesario mencionar que al menos durante los procesos de diferenciación funcional de los linfocitos Treg, no se encontraron diferencias en la capacidad de las DC procedentes de ratones BAMBI-KO o controles WT para inducir la diferenciación *in vitro* de esta población celular (Postigo et al., 2016).

Uno de los hallazgos más relevantes del presente estudio es la protección contra el desarrollo de EII observada en los ratones BAMBI-KO. El modelo de EII utilizado fue el de la colitis-DSS, que constituye sin duda alguna el modelo experimental de EII en

roedores más utilizado por la comunidad científica. Analizando distintos parámetros de evolución y severidad de la enfermedad, los ratones BAMBI-KO mostraron una protección muy importante contra el desarrollo de colitis-DSS. Estos resultados confirman y amplían el espectro de patologías autoinmunes/inflamatorias en donde la ausencia o la inhibición farmacológica de BAMBI inhibe su desarrollo. Nuestro grupo ha demostrado previamente que la deficiencia en BAMBI protege a los ratones mutantes contra el desarrollo de CIA (Postigo et al., 2016). Este efecto protector también se observa en ratones WT tratados con un AcM anti-BAMBI durante el desarrollo de CIA y en ratones BAMBI-KO y WT tratados con el AcM anti-BAMBI en modelos de artritis psoriásica y de psoriasis cutánea (Álvarez, 2017). En todos estos modelos experimentales dependientes de linfocitos Th17 (Cooke, 2006; Khmaladze et al., 2014; van der Fits et al., 2009), la protección contra la enfermedad estuvo mediada por linfocitos Treg y de acuerdo con esto, la eliminación de estas células con un AcM anti-CD25 citotóxico indujo la enfermedad en los ratones protegidos (Postigo et al., 2016; Álvarez, 2017). Dado que el desarrollo de colitis-DSS también depende de los linfocitos Th17 (Ito et al., 2008; Yang et al., 2008), y dado el papel de BAMBI en la diferenciación funcional de esta subpoblación CD4⁺ y de las Tregs (Postigo et al., 2016), inicialmente nos planteamos que un mecanismo similar al descrito en los modelos de CIA y psoriasis también podría ser responsable de la protección contra la colitis-DSS en ratones BAMBI-KO. Sin embargo, la protección en estos animales mutantes no se asoció con cambios lógicos en los porcentajes de las células Tregs y/o Th17, ni con el de poblaciones innatas implicadas en su diferenciación, en la LP de los ratones mutantes tras la inducción de colitis-DSS. De hecho, el porcentaje de linfocitos Treg en la LP de los ratones WT durante la inducción de colitis-DSS fue significativamente superior al encontrado en los ratones BAMBI-KO y los porcentajes de DC CD103⁺, implicadas en la diferenciación Treg y con una actividad protectora durante la inducción de colitis-DSS (Coombes et al., 2007; Matteoli et al., 2010; Muzaki et al., 2016), disminuyeron en la LP de los ratones mutantes durante la inducción de la enfermedad. Además, la eliminación de los linfocitos Treg CD4⁺CD25⁺ o la inhibición de la IL-10, una citocina producida por distintas poblaciones de linfocitos T CD4 y B reguladores con un papel supresor en la colitis-DSS (Pils et al., 2011; Yanaba et al., 2011), no modificó la evolución de la enfermedad en los ratones protegidos. Por último, los estudios en quimeras de médula ósea nos han permitido

concluir que la protección de los ratones BAMBI-KO es independiente de la actividad funcional de cualquier otra población inmune con actividad reguladora. Por todo ello, podemos concluir que BAMBI es capaz de influenciar respuestas inflamatorias actuando en distintos contextos celulares; sobre los linfocitos Treg y Th17 en el caso de los modelos de CIA y psoriasis y sobre otras poblaciones celulares no inmunes en el caso de la colitis-DSS.

Además de regular la señalización por TGF β , BAMBI inhibe la señalización de las Activinas y de los BMPs (Onichtchouk et al., 1999). Aunque la inhibición de Activinas mediante Follistatin inhibe el desarrollo de colitis-DSS (Dohi et al., 2005), los BMPs parecen desempeñar un papel protector en este proceso inflamatorio (Allaire et al., 2011; Hao et al., 2012). Así pues, la protección contra el desarrollo de colitis-DSS en los ratones BAMBI-KO podría estar asociada con un incremento en la actividad de otros miembros de la superfamilia TGF β distintos a los TGF β propiamente dichos. Sin embargo, la protección contra la enfermedad en los ratones BAMBI-KO se perdió tras el tratamiento con un AcM anti-TGF β que selectivamente inhibe TGF β 1, TGF β 2 y TGF β 3, pero no BMPs o Activinas (Dasch et al., 1989).

Los estudios en las quimeras de médula ósea, además de permitirnos descartar la posible implicación de mecanismos inmunorreguladores en la protección contra la colitis-DSS observada en los ratones BAMBI-KO, constituyeron el punto de partida en la identificación del IEp como una estructura fundamental en dicha protección. En este sentido, la protección contra la colitis-DSS se asoció al genotipo intestinal y no al del SI presente en los distintos grupos experimentales de quimeras. Además, el IEp de los ratones BAMBI-KO presentó una menor susceptibilidad a la apoptosis y una permeabilidad reducida tras la exposición al DSS. Un aspecto destacable del modelo experimental de colitis empleado en el presente estudio es la distribución tan restringida del proceso patológico, que afecta a la mitad o dos tercios distales del colon, a pesar de que el DSS se administra por vía oral y por lo tanto, todo el tracto digestivo queda expuesto a su potencial efecto tóxico (Chassaing et al., 2014). Esta distribución es prácticamente coincidente con el patrón de expresión de BAMBI en el IEp en los ratones WT. En base a este hallazgo, planteamos que la expresión de BAMBI va a modular la inducción de mecanismos protectores en el IEp dependientes de TGF β en

respuesta a señales del entorno. Entre los posibles mecanismos protectores analizados hasta ahora en los ratones BAMBI-KO, hemos observado un incremento en los niveles de IgG y sobre todo IgA en el bolo fecal y en la expresión en el colon, pero no en el íleon, de las defensinas Defcr4 y Defcr-rs10. El incremento en los niveles de IgA e IgG secretados al lumen intestinal de los ratones BAMBI-KO se correlaciona con el aumento tanto en las respuestas inmunes humorales sistémicas (Augustín, 2017), como en los porcentajes de linfocitos B y de B-CG en las PP y MLN del GALT. Por otra parte, el incremento en la expresión en el colon de Defcr4 y Defcr-rs10 es ciertamente enigmático, ya que estas defensinas son producidas normalmente por las células de Paneth del intestino delgado (Ouellette, 2005). Aunque todavía no tenemos una explicación a este último fenómeno, los resultados precedentes sugieren que la microbiota intestinal puede ser la fuente de las señales del entorno que promueven la actividad protectora contra la colitis-DSS en el IEp de los ratones BAMBI-KO. En este sentido, los niveles de IgG e IgA en el lumen intestinal (Okai et al., 2016; Palm et al., 2014; Suzuki et al., 2004; Zeng et al., 2016) y/o la producción de defensinas (Hugot et al., 2001; Schroeder et al., 2015; Wehkamp et al., 2005) modulan la composición de la microbiota intestinal, así como su accesibilidad a nichos definidos de la mucosa intestinal (Donaldson et al., 2018).

Una prueba convincente del posible papel de la microbiota intestinal en este fenómeno es el hecho de que los ratones BAMBI-KO nacidos y criados en un animalario SPF no presenten la protección contra el desarrollo de colitis-DSS que se observa en los mantenidos en un animalario convencional. Alternativamente, la pérdida de protección en los animales BAMBI-KO estabulados en el animalario SPF pudo deberse a la selección de alguna sublínea de ratón mutante sensible, aparecida accidentalmente durante el proceso de rederiva previo a la introducción de esta cepa en dicho animalario. Esta posibilidad quedó descartada al observarse que los ratones BAMBI-KO nacidos en el animalario SPF recuperaban la protección contra la colitis-DSS al reintroducirse de nuevo en el animalario convencional. Sin embargo, la recuperación completa de la protección requiere un periodo de exposición al nuevo entorno de alrededor de un mes. Esto sugiere que la interacción de la microbiota con el IEp induce en este último un programa de expresión génica específico que tarda un tiempo en ponerse en marcha o

estabilizarse, y que por un lado es el responsable de su resistencia/sensibilidad al efecto tóxico del DSS y, por otro lado, estaría regulado por la expresión de BAMBI. En este sentido, se ha demostrado que la microbiota intestinal es uno de los reguladores principales del transcriptoma del IEp, controlando la expresión de aproximadamente el 10% de los genes (Larsson et al., 2012; Pan et al., 2018; Sommer et al., 2015). La expresión diferencial de las defensinas Defcr4 y Defcr-*rs*10 en el IEp del colon entre los ratones BAMBI-KO y WT es compatible con esta posibilidad. Para confirmar esta hipótesis, estamos realizando en la actualidad un estudio comparativo del transcriptoma global en muestras de IEp del colon de ratones BAMBI-KO y controles WT criados en los animalarios SPF y convencional.

Para analizar en más detalle la posible contribución de la microbiota intestinal en los fenómenos descritos con anterioridad, se caracterizaron las microbiotas bacterianas en los ratones BAMBI-KO y controles WT criados en los animalarios SPF o convencional y en condiciones homeostáticas o tras la inducción de colitis-DSS. La comparación de los microbiomas, no mostró grandes cambios entre los distintos grupos experimentales, con la excepción de la comparación realizada entre los grupos de ratones B6 WT y BAMBI-KO criados en un animalario convencional tras la inducción de colitis-DSS, en donde las diferencias casi alcanzan significación estadística. El que las diferencias entre estos dos grupos no alcanzasen significación estadística probablemente se deba al escaso número de animales analizados, aunque el desarrollo o protección de colitis-DSS en los ratones WT o BAMBI-KO de estos grupos, respectivamente, se asoció con la expansión de un número limitado de especies bacterianas concretas. Así, la protección contra la colitis-DSS en los ratones BAMBI-KO se asoció con un incremento en determinadas especies de Bacteroidetes tales como *Porphyromonadaceae* y *Prevotella*, mientras que el desarrollo de la colitis en los ratones WT se acompañó de una expansión de determinadas especies de *Lachnospiraceae* del género *Clostridium*. Asociaciones entre la disminución de especies de *Prevotella* y *Porphyromonadaceae* y el desarrollo de colitis en humanos o en el modelo de colitis-DSS en roedores han sido descritas por múltiples autores (De Fazio et al., 2014; Ferreira et al., 2011; Hirano et al., 2018; Wang et al., 2018; Wlodarska et al., 2011), aunque *Prevotella falsenii* y *Prevotella copri* tienen un efecto potenciador de la colitis-DSS (Dziarski et al., 2016; Scher et al., 2013). Por el

contrario, y en contra de nuestros resultados, son múltiples los estudios que demuestran una asociación entre la expansión de especies de *Lachnospiraceae* con la protección contra el desarrollo de colitis (Darnaud et al., 2018; Nakanishi et al., 2015; Surana and Kasper, 2017), aunque también se ha descrito la situación inversa, en los que la expansión de especies de *Lachnospiraceae* se correlaciona con EII más severa (Wu et al., 2016; Ye et al., 2008; H. Zeng et al., 2016). En este escenario tan complejo, estudios adicionales son necesarios para clarificar la contribución real de las distintas especies bacterianas mencionadas anteriormente en la protección o desarrollo de colitis DSS en los ratones BAMBI-KO y B6 WT, respectivamente, estabulados en el animalario convencional.

Además de bacterias, las microbiotas intestinales contienen comunidades complejas de virus, protozoos, hongos y helmintos. Aunque estas microbiotas no han sido caracterizadas en nuestro estudio, sus posibles cambios podrían ser responsables de las diferencias observadas en cuanto al desarrollo de colitis-DSS entre los ratones WT o BAMBI-KO criados en un animalario convencional o SPF. Sin embargo, la pérdida de protección contra el desarrollo de colitis-DSS observada en los ratones BAMBI-KO/NOD2-KO es un argumento de peso a favor de la contribución de la microbiota bacteriana en el mencionado efecto protector. Como se mencionó anteriormente, NOD2 es un PRR citoplasmático que selectivamente se une al muramil dipéptido presente en la pared celular de bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas, pero no de otros microorganismos (Kufer et al., 2006). Aunque se expresa fundamentalmente en macrófagos, se ha observado la expresión de NOD2 a nivel de las criptas de las vellosidades del íleon en el ratón y a nivel de las células de Paneth en humanos (Kobayashi et al., 2005; Lala et al., 2003; Ogura et al., 2003), donde se ha asociado con la regulación de la expresión de diversas defensinas, tales como Defcr4 y Defcr-10 (Kobayashi et al., 2005). Se ha demostrado que, en queratinocitos de la piel, NOD2 presenta una relación funcional estrecha con TAK1 para la activación adecuada de NF- κ B y MAPKs (Kim et al., 2008). TAK1, también conocida como MAP3K7, es una serina-treonina quinasa activada por múltiples estímulos tales como TNF α (Sakurai et al., 2003), IL-1 β (Ninomiya-Tsuji et al., 1999), TLRs (Irie et al., 2000), el receptor antigénico de los linfocitos B (Sato et al., 2005) y por TGF β dentro de las rutas Smad-

independientes (Yamaguchi et al., 1995). En el IEp la activación de TAK1 previene la inducción apoptosis, promueve su proliferación y limita la acumulación de especies reactivas de oxígeno (Kajino-Sakamoto et al., 2008, 2010; Kim et al., 2009). Por su parte, la activación de NF- κ B también posee un efecto anti-apoptótico en el IEp y potencia las respuestas anti-microbianas (Ben-Neriah and Karin, 2011; Peterson and Artis, 2014). En base a todas estas evidencias, una posible explicación al efecto protector de la ausencia de BAMBI en el desarrollo de colitis-DSS en los ratones estabulados en el animalario convencional, es que el reconocimiento de determinadas especies bacterianas por NOD2 y la paralela hiperactivación de TAK1, secundaria a la deficiencia de BAMBI, conduzca a la puesta en marcha en el IEp de mecanismos, dependientes de NF- κ B, que potencien la supervivencia y la función de barrera de estas células. Cabe destacar que la activación defectuosa de NF- κ B en el IEp potencia la severidad de las colitis-DSS (Greten et al., 2004; Nenci et al., 2007). Para clarificar esta hipótesis, se está comparando la activación de TAK1 y NF- κ B en el IEp entre ratones BAMBI-KO y WT, así como valorando el efecto de la inhibición farmacológica de TAK1, mediante el tratamiento con el inhibidor específico 5z-7-oxozeaenol, en el desarrollo de colitis-DSS en estos animales.

Las diferencias encontradas en la protección contra el desarrollo de colitis-DSS entre los ratones BAMBI-KO estabulados en un animalario convencional con los mantenidos en SPF, plantea el problema de hasta qué punto los resultados de las investigaciones biomédicas obtenidos en animales mantenidos en condiciones de higiene excesiva arrojan conclusiones extrapolables a situaciones reales. En el mundo externo, los seres vivos estamos expuestos constantemente a una carga microbiana muy elevada y diversa, que obviamente incluyen microorganismos patógenos. El uso de animales de experimentación, generalmente ratones mantenidos en condiciones SPF, ha permitido el estudio de enfermedades complejas en individuos genéticamente homogéneos en donde la influencia ambiental está más controlada. Sin embargo, existen cada vez más evidencias, especialmente cuando se analizan respuestas inmunitarias, de que los experimentos con ratones de laboratorio no reflejan aspectos relevantes del funcionamiento de sistema inmune en individuos en entornos naturales. Son varios los estudios publicados recientemente que demuestran que el sistema inmune, sus respuestas frente a infecciones y la susceptibilidad frente al desarrollo de

patologías inflamatorias, varía entre ratones mantenidos en condiciones SPF y ratones salvajes (Beura et al., 2016; Reese et al., 2016; Rosshart et al., 2017). Los resultados de nuestro trabajo corroboran estas observaciones e identifican a BAMBI como un sensor del entorno a nivel del IEp. En este contexto, a la hora de valorar el potencial terapéutico de la inhibición farmacológica de BAMBI en EII, deben valorarse minuciosamente las condiciones experimentales en donde se realicen estos estudios.

Un último aspecto destacable de nuestro estudio es la protección de los ratones BAMBI-KO contra el desarrollo de cáncer de colon secundario a inflamación crónica. El cáncer de colon constituye la complicación más grave de las colitis crónicas. Varios estudios han demostrado la expresión de BAMBI en tumores colorrectales agresivos metastásicos (Fritzmam et al., 2009; Togo et al., 2008; Yu and Chai, 2017). Los mecanismos por los que BAMBI puede controlar la aparición de tumores en el colon son varios. Por un lado, TGF β inhibe la proliferación de las células tumorales en estadios tempranos de la enfermedad, pero por otro lado puede promover la progresión tumoral en estadios más avanzados (Feagins, 2010; Wakefield and Hill, 2013). Así mismo, como hemos demostrado en nuestro estudio, la expresión de BAMBI influye de forma clara en el proceso inflamatorio en el colon y de esta forma, puede facilitar la aparición de mutaciones en el IEp durante los procesos de proliferación asociados a la reparación tisular. Por último, BAMBI es capaz de potenciar la activación de la ruta de señalización Wnt/ β catenina (Lin et al., 2008), que desempeña un papel central en la génesis de este tipo de tumores (Schneikert and Behrens, 2007; Taipale and Beachy, 2001). En este mismo sentido, cabe destacar que TAK1 está implicada en la ruta de transducción no canónica de Wnt/ β catenina, que actúa como un mecanismo de inhibición de la ruta canónica de Wnt (Smit et al., 2004).

En conclusión, el presente trabajo de Tesis Doctoral identifica a BAMBI como una molécula fundamental en la regulación de la interacción entre el IEp y la microbiota intestinal, así como en la composición del GALT. La ausencia de BAMBI en el IEp protege a los ratones, que habitan en un entorno con patógenos, contra el desarrollo de colitis y cáncer de colon secundario a inflamación crónica. En base a estos hallazgos, nuestro estudio permite definir a BAMBI como una nueva diana terapéutica en estos procesos patológicos.

VI- CONCLUSIONES

VI- CONCLUSIONES

1. BAMBI regula la composición del SI adaptativo del GALT. En condiciones homeostáticas, la ausencia de BAMBI da lugar a una disminución significativa de células Th17 en todas las localizaciones del GALT y a un aumento de Treg en las PP. Así mismo, las células B y B-CG se encuentran aumentadas en PP y MLN en ausencia de BAMBI, en correlación con el aumento de la inmunidad humoral observado. Sin embargo, estos cambios no se asocian con alteraciones relevantes en la expresión de citocinas pro- y anti-inflamatorias. Por último, la ausencia de BAMBI no indujo cambios en la distribución de distintas poblaciones inmunes innatas en el GALT.
2. Los ratones BAMBI-KO presentan una protección importante frente al desarrollo de colitis inducida por DSS.
3. La protección de los ratones BAMBI-KO contra el desarrollo de colitis-DSS es dependiente de $TGF\beta$ y está asociada al genotipo intestinal, independientemente de la actividad funcional de poblaciones inmunes reguladoras.
4. BAMBI se expresa en el IEp y su expresión se restringe al colon, lo que coincide con la distribución del proceso patológico.
5. El IEp de los ratones BAMBI-KO presenta una menor susceptibilidad a la apoptosis y una permeabilidad reducida tras la exposición al DSS. Además, la deficiencia en BAMBI se asocia con un aumento en mecanismos de protección del IEp en el colon, como un incremento de Acs en las heces y de la expresión de defensinas en estado basal.
6. La composición de la microbiota intestinal tiene un papel fundamental en el desarrollo de la colitis-DSS. Si bien no se encontraron diferencias significativas en la composición de la microbiota bacteriana entre ratones WT y BAMBI-KO, la protección de los ratones BAMBI-KO frente al desarrollo de colitis-DSS se relaciona con una expansión de determinadas especies de Bacteroidetes, y el bloqueo de NOD2 conlleva la pérdida de dicha protección.

7. La ausencia de BAMBI protege frente al desarrollo de cáncer de colon secundario a inflamación crónica.

Como Conclusión general, nuestro estudio permite identificar a BAMBI como una molécula implicada en la regulación de la funcionalidad del IEp y como una posible diana terapéutica en EII y cáncer de colon.

VII- BIBLIOGRAFÍA

VII- BIBLIOGRAFÍA

- Abdulmir, A. S., Hafidh, R. R., and Abu Bakar, F. (2011). **The association of *Streptococcus bovis/gallolyticus* with colorectal tumors: the nature and the underlying mechanisms of its etiological role.** *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, 30, 11.
- Abrams, G. D., Bauer, H., and Sprinz, H. (1963). **Influence of the normal flora on mucosal morphology and cellular renewal in the ileum. A comparison of germ-free and conventional mice.** *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 12, 355–364.
- Abreu, M. T. (2010). **Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: How bacterial recognition shapes intestinal function.** *Nature Reviews Immunology*, 10(2), 131–143.
- Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). **Pathogen recognition and innate immunity.** *Cell*, 124(4), 783–801.
- Alazzouzi, H., Alhopuro, P., Salovaara, R., Sammalkorpi, H., Jarvinen, H., Mecklin, J.-P., and Arango, D. (2005). **SMAD4 as a prognostic marker in colorectal cancer.** *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 11(7), 2606–2611.
- Allaire, J. M., Darsigny, M., Marcoux, S. S., Roy, S. A. B., Schmouth, J.-F., Umans, L., Zwijsen, A., Boudreau, F., and Perreault, N. (2011). **Loss of Smad5 leads to the disassembly of the apical junctional complex and increased susceptibility to experimental colitis.** *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 300(4), G586-97.
- Álvarez, P. (2017). **BAMBI, una nueva diana terapéutica para el tratamiento de enfermedades autoinmunes.** Tesis Doctoral. Universidad de Cantabria
- Ambort, D., Johansson, M. E. V., Gustafsson, J. K., Nilsson, H. E., Ermund, A., Johansson, B. R., Koeck, P. J. B., Hebert, H., and Hansson, G. C. (2012). **Calcium and pH-dependent packing and release of the gel-forming MUC2 mucin.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(15), 5645–5650.
- Anand, P. K., Malireddi, R. K. S., Lukens, J. R., Vogel, P., Bertin, J., Lamkanfi, M., and Kanneganti, T.-D. (2012). **NLRP6 negatively regulates innate immunity and host defence against bacterial pathogens.** *Nature*, 488(7411), 389–393.
- Ananthakrishnan, A. N. (2015). **Environmental risk factors for inflammatory bowel diseases: a review.** *Digestive Diseases and Sciences*, 60(2), 290–298.
- Annes, J. P., Chen, Y., Munger, J. S., and Rifkin, D. B. (2004, June). **Integrin $\alpha(V)\beta(6)$ -mediated activation of latent TGF- β requires the latent TGF- β binding protein-1.** *The Journal of Cell Biology*.
- Annes, J. P., Munger, J. S., and Rifkin, D. B. (2003). **Making sense of latent TGFbeta activation.** *Journal of Cell Science*, 116(Pt 2), 217–224.
- Araki, Y., Mukaisyo, K., Sugihara, H., Fujiyama, Y., and Hattori, T. (2010). **Increased apoptosis and decreased proliferation of colonic epithelium in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice.** *Oncology Reports*, 24(4), 869–874.

Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., Cheng, G., Yamasaki, S., Saito, T., Ohba, Y., Taniguchi, T., Takeda, K., Hori, S., Ivanov, I. I., Umesaki, Y., Itoh, K., and Honda, K. (2011). **Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species.** *Science (New York, N.Y.)*, 331(6015), 337–341.

Augustín, J.J. (2017). **Papel de BAMBI en la regulación de la respuesta inmune humoral.** *Tesis Doctoral*. Universidad de Cantabria.

Babyatsky, M. W., Rossiter, G., and Podolsky, D. K. (1996). **Expression of transforming growth factors alpha and beta in colonic mucosa in inflammatory bowel disease.** *Gastroenterology*, 110(4), 975–984.

Bachem, A., Guttler, S., Hartung, E., Ebstein, F., Schaefer, M., Tannert, A., Salama, A., Movassaghi, K., Opitz, C., Mages, H., Henn, V., Kloetzel, P. M., Gurka, S., and Kroczek, R. A. (2010). **Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells.** *The Journal of Experimental Medicine*, 207(6), 1273–1281.

Bain, C. C., Bravo-Blas, A., Scott, C. L., Perdiguero, E. G., Geissmann, F., Henri, S., Malisse, B., Osborne, L. C., Artis, D., and Mowat, A. M. (2014). **Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice.** *Nature Immunology*, 15(10), 929–937.

Bakin, A. V., Tomlinson, A. K., Bhowmick, N. A., Moses, H. L., and Arteaga, C. L. (2000). **Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration.** *The Journal of Biological Chemistry*, 275(47), 36803–36810.

Bancroft, M., and Bellairs, R. (1977). **Placodes of the chick embryo studied by SEM.** *Anatomy and Embryology*, 151(1), 97–108.

Barcellos-Hoff, M. H., and Dix, T. A. (1996). **Redox-mediated activation of latent transforming growth factor-beta 1.** *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 10(9), 1077–1083.

Bartel, D. P. (2004). **MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function.** *Cell*, 116(2), 281–297.

Beebe, D., Garcia, C., Wang, X., Rajagopal, R., Feldmeier, M., Kim, J.-Y., Chytil A., Mosses, H., Ashery-Padan, R., and Rauchman, M. (2004). **Contributions by members of the TGFbeta superfamily to lens development.** *The International Journal of Developmental Biology*, 48(8–9), 845–856.

Belkaid, Y., and Hand, T. W. (2014). **Role of the microbiota in immunity and inflammation.** *Cell*, 157(1), 121–141.

Ben-Neriah, Y., and Karin, M. (2011). **Inflammation meets cancer, with NF-kappaB as the matchmaker.** *Nature Immunology*, 12(8), 715–723.

Benahmed, M., Meresse, B., Arnulf, B., Barbe, U., Mention, J.-J., Verkarre, V., Allez, M., Cellier, C., Hermine, O., and Cerf-Bensussan, N. (2007). **Inhibition of TGF-beta signaling by IL-15: a new role for IL-15 in the loss of immune homeostasis in celiac disease.** *Gastroenterology*, 132(3), 994–1008.

- Bernink, J. H., Peters, C. P., Munneke, M., te Velde, A. A., Meijer, S. L., Weijer, K., Hreggvidsdottir, H. S., Heinsbroek, S. E., Legrand, N., Buskens, C. J., Bemelman, W. A., Mjosberg, J. M., and Spits, H. (2013). **Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues.** *Nature Immunology*, 14(3), 221–229.
- Beura, L. K., Hamilton, S. E., Bi, K., Schenkel, J. M., Odumade, O. A., Casey, K. A., Thompson, E. A., Fraser, K. A., Rosato, P. C., Filali-Mouhim, A., Sekaly R. P., Jenkins, M. K., Vezys, V., Haining, N., Jameson, S. C., and Masopust, D. (2016). **Normalizing the environment recapitulates adult human immune traits in laboratory mice.** *Nature*, 532(7600), 512–516.
- Bhowmick, N. A., Ghiassi, M., Bakin, A., Aakre, M., Lundquist, C. A., Engel, M. E., Arteaga, C. L., and Moses, H. L. (2001). **Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism.** *Molecular Biology of the Cell*, 12(1), 27–36.
- Biancheri, P., Di Sabatino, A., Corazza, G. R., and MacDonald, T. T. (2013). **Proteases and the gut barrier.** *Cell and Tissue Research*, 351(2), 269–280.
- Bianchi, M. E. (2007). **DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger.** *Journal of Leukocyte Biology*, 81(1), 1–5.
- Bischoff, S. C. (2009). **Physiological and pathophysiological functions of intestinal mast cells.** *Seminars in Immunopathology*, 31(2), 185–205.
- Bjerknes, M., and Cheng, H. (1981). **The stem-cell zone of the small intestinal epithelium. I. Evidence from Paneth cells in the adult mouse.** *Am J Anat*, 160(1), 51–63.
- Bogunovic, M., Dave, S. H., Tilstra, J. S., Chang, D. T. W., Harpaz, N., Xiong, H., Mayer, L. F., and Plevy, S. E. (2007). **Enteroendocrine cells express functional Toll-like receptors.** *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 292(6), G1770-83.
- Bogunovic, M., Ginhoux, F., Helft, J., Shang, L., Hashimoto, D., Greter, M., Liu, K., Jakubzick, C., Ingersoll, M. A., Leboeuf, M., Stanley, R., Nussenzweig, M., Lira S. A., Randolph, G. J., and Merad, M. (2009). **Origin of the lamina propria dendritic cell network.** *Immunity*, 31(3), 513–525.
- Bouskra, D., Brezillon, C., Berard, M., Werts, C., Varona, R., Boneca, I. G., and Eberl, G. (2008). **Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis.** *Nature*, 456(7221), 507–510.
- Brandl, K., Sun, L., Neppl, C., Siggs, O. M., Le, S. M., Tomisato, W., and Li, X. (2010). **MyD88 signaling in nonhematopoietic cells protects mice against induced colitis by regulating specific EGF receptor ligands.** *Pnas*, 107, 19967–19972.
- Brandtzaeg, P. (2010). **Function of mucosa-associated lymphoid tissue in antibody formation.** *Immunological Investigations*, 39(4–5), 303–355.
- Brandtzaeg, P., Carlsen, H., and Farstad, I. N. (2005). **The human mucosal B-cell system.** In: Mestecky J, Lamm M. , Ogra P., Strober W., Bienenstock J., McGhee J. and Mayer L. Eds. *Mucosal immunology*, 3rd edition Elsevier, London Academic Press (617–665).
- Brandtzaeg, P., and Johansen, F.-E. (2005). **Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties.** *Immunological Reviews*, 206, 32–63.

- Brinkman, B. M., Becker, A., Ayiseh, R. B., Hildebrand, F., Raes, J., Huys, G., and Vandenabeele, P. (2013). **Gut microbiota affects sensitivity to acute DSS-induced colitis independently of host genotype.** *Inflammatory Bowel Diseases*, 19(12), 2560–2567.
- Buonocore, S., Ahern, P. P., Uhlig, H. H., Ivanov, I. I., Littman, D. R., Maloy, K. J., and Powrie, F. (2010). **Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology.** *Nature*, 464(7293), 1371–1375.
- Burke, J. P., Mulsow, J. J., O’Keane, C., Docherty, N. G., Watson, R. W. G., and O’Connell, P. R. (2007). **Fibrogenesis in Crohn’s disease.** *The American Journal of Gastroenterology*, 102(2), 439–448.
- Cario, E., Gerken, G., and Podolsky, D. K. (2004). **Toll-like receptor 2 enhances ZO-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase C.** *Gastroenterology*, 127(1), 224–238.
- Cazac, B. B., and Roes, J. (2000). **TGF-beta receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA in vivo.** *Immunity*, 13(4), 443–451.
- Cerovic, V., Houston, S. A., Scott, C. L., Aumeunier, A., Yrlid, U., Mowat, A. M., and Milling, S. W. F. (2013). **Intestinal CD103(-) dendritic cells migrate in lymph and prime effector T cells.** *Mucosal Immunology*, 6(1), 104–113.
- Cerutti, A., and Rescigno, M. (2008). **The biology of intestinal immunoglobulin A responses.** *Immunity*, 28(6), 740–750.
- Chassaing, B., Aitken, J. D., Malleshappa, M., and Vijay-Kumar, M. (2014). **Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice.** *Current Protocols in Immunology*, 104, Unit 15.25.
- Chaudhry, S. S., Cain, S. A., Morgan, A., Dallas, S. L., Shuttleworth, C. A., and Kielty, C. M. (2007). **Fibrillin-1 regulates the bioavailability of TGFbeta1.** *The Journal of Cell Biology*, 176(3), 355–367.
- Cheifetz, S., Andres, J. L., and Massague, J. (1988). **The transforming growth factor-beta receptor type III is a membrane proteoglycan. Domain structure of the receptor.** *The Journal of Biological Chemistry*, 263(32), 16984–16991.
- Chen, G., and Nunez, G. (2011). **Inflammasomes in intestinal inflammation and cancer.** *Gastroenterology*, 141(6), 1986–1999.
- Chen, G., Shaw, M. H., Kim, Y.-G., and Nunez, G. (2009). **NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease.** *Annual Review of Pathology*, 4, 365–398.
- Chen, H. Q., Yang, J., Zhang, M., Zhou, Y.-K., Shen, T.-Y., Chu, Z.-X., Zhang M., Hang, X.-M., Jiang, Y.-Q., and Qin, H.-L. (2010). **Lactobacillus plantarum ameliorates colonic epithelial barrier dysfunction by modulating the apical junctional complex and PepT1 in IL-10 knockout mice.** *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 299(6), G1287–97.
- Chen, J., Bush, J. O., Ovitt, C. E., Lan, Y., and Jiang, R. (2007). **The TGF-beta pseudoreceptor gene Bambi is dispensable for mouse embryonic development and postnatal survival.** *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*. United States.

- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.-J., Li, L., Marinos, N., McGrady, and G., Wahl, S. M. (2003). **Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3.** *The Journal of Experimental Medicine*, 198(12), 1875–1886.
- Chen, W., and Ten Dijke, P. (2016). **Immunoregulation by members of the TGFβ superfamily.** *Nature Reviews Immunology*, 16(12), 723–740.
- Chen, Y.-G. (2009). **Endocytic regulation of TGF-beta signaling.** *Cell Research*, 19(1), 58–70.
- Chen, Y., Ali, T., Todorovic, V., O’leary, J. M., Kristina Downing, A., and Rifkin, D. B. (2005). **Amino acid requirements for formation of the TGF-beta-latent TGF-beta binding protein complexes.** *Journal of Molecular Biology*, 345(1), 175–186.
- Chen, Y. G., Liu, F., and Massague, J. (1997). **Mechanism of TGFbeta receptor inhibition by FKBP12.** *The EMBO Journal*, 16(13), 3866–3876.
- Cheroutre, H., Lambolez, F., and Mucida, D. (2011). **The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes.** *Nature Reviews. Immunology*, 11(7), 445–456.
- Chieppa, M., Rescigno, M., Huang, A. Y. C., and Germain, R. N. (2006). **Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell TLR engagement.** *The Journal of Experimental Medicine*, 203(13), 2841–2852.
- Chu, V. T., Beller, A., Rausch, S., Strandmark, J., Zanker, M., Arbach, O., Kruglov A., and Berek, C. (2014). **Eosinophils promote generation and maintenance of immunoglobulin-A-expressing plasma cells and contribute to gut immune homeostasis.** *Immunity*, 40(4), 582–593.
- Clemente, J. C., Ursell, L. K., Parfrey, L. W., and Knight, R. (2012). **The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view.** *Cell*, 148(6), 1258–1270.
- Coll, R. C., and O’Neill, L. A. J. (2010). **New insights into the regulation of signalling by toll-like receptors and nod-like receptors.** *Journal of Innate Immunity*, 2(5), 406–421.
- Conery, A. R., Cao, Y., Thompson, E. A., Townsend, C. M. J., Ko, T. C., and Luo, K. (2004). **Akt interacts directly with Smad3 to regulate the sensitivity to TGF-beta induced apoptosis.** *Nature Cell Biology*, 6(4), 366–372.
- Cooke, A. (2006). **Th17 cells in inflammatory conditions.** *The Review of Diabetic Studies : RDS*, 3(2), 72–75.
- Coombes, J. L., Siddiqui, K. R. R., Arancibia-Carcamo, C. V, Hall, J., Sun, C.-M., Belkaid, Y., and Powrie, F. (2007). **A functionally specialized population of mucosal CD103⁺ DCs induces Foxp3⁺ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism.** *The Journal of Experimental Medicine*, 204(8), 1757–1764.
- Cornes, J. S. (1965). **Number, size, and distribution of Peyer’s patches in the human small intestine: Part I The development of Peyer’s patches.** *Gut*, 6(3), 225–229.
- Crawford, P. A., and Gordon, J. I. (2005). **Microbial regulation of intestinal radiosensitivity.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(37), 13254–13259.

Darmoul, D., and Ouellette, A. J. (1996). **Positional specificity of defensin gene expression reveals Paneth cell heterogeneity in mouse small intestine.** *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 271(1), G68 LP-G74.

Darnaud, M., Dos Santos, A., Gonzalez, P., Augui, S., Lacoste, C., Desterke, C., de Hertogh, G., Valentino, E., Braun, E., Zheng, J., Boisdard, R., Neut, C., Dubuquoy, L., Chiappini, F., Samuel, D., Lepage, P., Guerrieri, F., Dore, J., Brechot, C., Moniaux, N., and Faivre, J. (2018). **Enteric Delivery of Regenerating Family Member 3 alpha Alters the Intestinal Microbiota and Controls Inflammation in Mice With Colitis.** *Gastroenterology*, 154(4), 1009–1023.e14.

Das, J., Ren, G., Zhang, L., Roberts, A. I., Zhao, X., Bothwell, A. L. M., Van Kaer, L., Shi, Y., and Das, G. (2009). **Transforming growth factor beta is dispensable for the molecular orchestration of Th17 cell differentiation.** *The Journal of Experimental Medicine*, 206(11), 2407–2416.

Dasch, J. R., Pace, D. R., Waegell, W., Ineaga, D., and Ellinsworth, L. R. (1989). **Monoclonal antibodies recognizing transforming growth factor beta (TGF- β): bioactivity, neutralization and TGF- β 2 affinity purification.** *J. Immunol.* 1989;142:1536–1541

David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., Ling, A. V., Devlin, A. S., Varma, Y., Fischbach, M. A., Biddinger, S. B., Dutton, R. J., and Turnbaugh, P. J. (2014). **Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome.** *Nature*, 505(7484), 559–563.

De Fazio, L., Cavazza, E., Spisni, E., Strillacci, A., Centanni, M., Candela, M., Pratico, C., Campieri, M., Ricci, C., and Valerii, M. C. (2014). **Longitudinal analysis of inflammation and microbiota dynamics in a model of mild chronic dextran sulfate sodium-induced colitis in mice.** *World Journal of Gastroenterology*, 20(8), 2051–2061.

de Vos, T., and Dick, T. A. (1991). **A rapid method to determine the isotype and specificity of coproantibodies in mice infected with Trichinella or fed cholera toxin.** *Journal of Immunological Methods*, 141(2), 285–288.

Denning, T. L., Norris, B. A., Medina-Contreras, O., Manicassamy, S., Geem, D., Madan, R., Karp, C. L., and Pulendran, B. (2011). **Functional specializations of intestinal dendritic cell and macrophage subsets that control Th17 and regulatory T cell responses are dependent on the T cell/APC ratio, source of mouse strain, and regional localization.** *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 187(2), 733–747.

Derrien, M., Passel, M. W. J. van, Bovenkamp, J. H. B. van de, Schipper, R., Vos, W. de, and Dekker, J. (2010). **Mucin-bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract.** *Gut Microbes*, 1(4), 254–268.

Di Guglielmo, G. M., Le Roy, C., Goodfellow, A. F., and Wrana, J. L. (2003). **Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover.** *Nature Cell Biology*, 5(5), 410–421.

Di Sabatino, A., Biancheri, P., Rovedatti, L., MacDonald, T. T., and Corazza, G. R. (2012). **New pathogenic paradigms in inflammatory bowel disease.** *Inflammatory Bowel Diseases*, 18(2), 368–371.

Di Sabatino, A., Jackson, C. L., Pickard, K. M., Buckley, M., Rovedatti, L., Leakey, N. A. B., Picariello, L., Cazzola, P., Monteleone, G., Tonelli, F., Corazza, G. R., MacDonald, T. T., and

- Pender, S. L. (2009). **Transforming growth factor beta signalling and matrix metalloproteinases in the mucosa overlying Crohn's disease strictures.** *Gut*, 58(6), 777–789.
- Dickson, M. C., Martin, J. S., Cousins, F. M., Kulkarni, A. B., Karlsson, S., and Akhurst, R. J. (1995). **Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice.** *Development (Cambridge, England)*, 121(6), 1845–1854.
- Dohi, T., Ejima, C., Kato, R., Kawamura, Y. I., Kawashima, R., Mizutani, N., Tabuchi, Y., and Kojima, I. (2005). **Therapeutic potential of follistatin for colonic inflammation in mice.** *Gastroenterology*, 128(2), 411–423.
- Donaldson, G. P., Ladinsky, M. S., Yu, K. B., Sanders, J. G., Yoo, B. B., Chou, W.-C., Conner, M. E., Earl, A. M., Knight, R., Bjorkman, P. J., and Mazmanian, S. K. (2018). **Gut microbiota utilize immunoglobulin A for mucosal colonization.** *Science (New York, N.Y.)*, 360(6390), 795–800.
- Dostert, C., Petrilli, V., Van Bruggen, R., Steele, C., Mossman, B. T., and Tschopp, J. (2008). **Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica.** *Science (New York, N.Y.)*, 320(5876), 674–677.
- Dove, W. F., Clipson, L., Gould, K. A., Luongo, C., Marshall, D. J., Moser, A. R., Newton, M. A., and Jacoby, R. F. (1997). **Intestinal neoplasia in the ApcMin mouse: independence from the microbial and natural killer (beige locus) status.** *Cancer Research*, 57(5), 812–814.
- Dziarski, R., Park, S. Y., Kashyap, D. R., Dowd, S. E., and Gupta, D. (2016). **Pglyrp-Regulated Gut Microflora Prevotella falsenii, Parabacteroides distasonis and Bacteroides eggerthii Enhance and Alistipes finegoldii Attenuates Colitis in Mice.** *PloS One*, 11(1), e0146162.
- Ebisawa, T., Fukuchi, M., Murakami, G., Chiba, T., Tanaka, K., Imamura, T., and Miyazono, K. (2001). **Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation.** *The Journal of Biological Chemistry*, 276(16), 12477–12480.
- Edlund, S., Bu, S., Schuster, N., Aspenstrom, P., Heuchel, R., Heldin, N.-E., Ten Dijke, P., Heldin, C.-H., and Landstrom, M. (2003). **Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta)-induced apoptosis of prostate cancer cells involves Smad7-dependent activation of p38 by TGF-beta-activated kinase 1 and mitogen-activated protein kinase kinase 3.** *Molecular Biology of the Cell*, 14(2), 529–544.
- El-Salhy, M., Danielsson, A., Stenling, R., and Grimelius, L. (1997). **Colonic endocrine cells in inflammatory bowel disease.** *Journal of Internal Medicine*, 242(5), 413–419.
- Elinav, E., Strowig, T., Kau, A. L., Henao-Mejia, J., Thaiss, C. A., Booth, C. J., Peaper, D. R., Bertin, J., Eisenbarth, S. C., Gordon, J. I., and Flavell, R. A. (2011). **NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis.** *Cell*, 145(5), 745–757.
- Elliott, R. L., and Blobe, G. C. (2005). **Role of transforming growth factor Beta in human cancer.** *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(9), 2078–2093.

Eom, T., Kim, Y. S., Choi, C. H., Sadowsky, M. J., and Unno, T. (2018). **Current understanding of microbiota-and dietary-therapies for treating inflammatory bowel disease.** *Journal of Microbiology*, 56(3), 189–198.

Esparza-Lopez, J., Montiel, J. L., Vilchis-Landeros, M. M., Okadome, T., Miyazono, K., and Lopez-Casillas, F. (2001). **Ligand binding and functional properties of betaglycan, a co-receptor of the transforming growth factor-beta superfamily. Specialized binding regions for transforming growth factor-beta and inhibin A.** *The Journal of Biological Chemistry*, 276(18), 14588–14596.

Fallingborg, J. (1999). **Intraluminal pH of the human gastrointestinal tract.** *Danish Medical Bulletin*, 46(3), 183–196.

Fantini, M. C., Rizzo, A., Fina, D., Caruso, R., Sarra, M., Stolfi, C., Becker, C., Macdonald, T. T., Pallone, F., Neurath, M. F., and Monteleone, G. (2009). **Smad7 controls resistance of colitogenic T cells to regulatory T cell-mediated suppression.** *Gastroenterology*, 136(4), 1308–16, e1-3.

Farache, J., Koren, I., Milo, I., Gurevich, I., Kim, K. W., Zigmond, E., Furtado, G. C., Lira, S. A., and Shakhar, G. (2013). **Luminal Bacteria Recruit CD103+ Dendritic Cells into the Intestinal Epithelium to Sample Bacterial Antigens for Presentation.** *Immunity*, 38(3), 581–595.

Feagins, L. A. (2010). **Role of transforming growth factor-beta in inflammatory bowel disease and colitis-associated colon cancer.** *Inflammatory Bowel Diseases*, 16(11), 1963–1968.

Ferguson, A. (1977). **Intraepithelial lymphocytes of the small intestine.** *Gut*, 18(11), 921–937.

Ferreira, R. B. R., Gill, N., Willing, B. P., Antunes, L. C. M., Russell, S. L., Croxen, M. A., and Finlay, B. B. (2011). **The intestinal microbiota plays a role in Salmonella-induced colitis independent of pathogen colonization.** *PloS One*, 6(5), e20338.

Franchi, L., Kamada, N., Nakamura, Y., Burberry, A., Kuffa, P., Suzuki, S., Shaw, M. H., Kim, Y.-G., and Nunez, G. (2012). **NLRC4-driven production of IL-1beta discriminates between pathogenic and commensal bacteria and promotes host intestinal defense.** *Nature Immunology*, 13(5), 449–456.

Frank, D. N., St Amand, A. L., Feldman, R. A., Boedeker, E. C., Harpaz, N., and Pace, N. R. (2007). **Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(34), 13780–13785.

Fritzmman, J., Morkel, M., Besser, D., Budczies, J., Kosel, F., Brembeck, F. H., Stein, U., Fichtner, I., Schlag, P. M., and Birchmeier, W. (2009). **A colorectal cancer expression profile that includes transforming growth factor beta inhibitor BAMBI predicts metastatic potential.** *Gastroenterology*, 137(1), 165–175.

Fuchs, A., Vermi, W., Lee, J. S., Lonardi, S., Gilfillan, S., Newberry, R. D., Cella, M., and Colonna, M. (2013). **Intraepithelial type 1 innate lymphoid cells are a unique subset of IL-12- and IL-15-responsive IFN-gamma-producing cells.** *Immunity*, 38(4), 769–781.

Fujimoto, K., Karuppuachamy, T., Takemura, N., Shimohigoshi, M., Machida, T., Haseda, Y.,

- Aoshi, T., Ishii, K. J., Akira, S., and Uematsu, S. (2011). **A new subset of CD103⁺CD8 α ⁺ dendritic cells in the small intestine expresses TLR3, TLR7, and TLR9 and induces Th1 response and CTL activity.** *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 186(11), 6287–6295.
- Fukata, M., and Arditi, M. (2013). **The role of pattern recognition receptors in intestinal inflammation.** *Mucosal Immunology*, 6(3), 451–463.
- Fukata, M., Chen, A., Vamadevan, A. S., Cohen, J., Breglio, K., Krishnareddy, S., Hsu D., Xu R., Harpaz, N., Dannenberg, A. J., Subbaramaiah, K., Cooper, H. S., Itzkowitz, S. H., and Abreu, M. T. (2007). **Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors.** *Gastroenterology*, 133(6), 1869–1881.
- Gabbiani, G. (2003). **The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases.** *The Journal of Pathology*, 200(4), 500–503.
- Gaboriau-Routhiau, V., Rakotobe, S., Lecuyer, E., Mulder, I., Lan, A., Bridonneau, C., Rochet, V., Pisi, A., De Paepe, M., Brandi, G., Eberl, G., Snel, J., Kelly, D., and Cerf-Bensussan, N. (2009). **The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses.** *Immunity*, 31(4), 677–689.
- Gallo, R. L., and Hooper, L. V. (2012). **Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine.** *Nat Rev Immunol*, 12(7), 503–516.
- Gebhardt, T., Lorentz, A., Detmer, F., Trautwein, C., Bektas, H., Manns, M. P., and Bischoff, S. C. (2005). **Growth, phenotype, and function of human intestinal mast cells are tightly regulated by transforming growth factor beta1.** *Gut*, 54(7), 928–934.
- Gebhardt, T., Mueller, S. N., Heath, W. R., and Carbone, F. R. (2013). **Peripheral tissue surveillance and residency by memory T cells.** *Trends in Immunology*, 34(1), 27–32.
- Gentry, L. E., Lioubin, M. N., Purchio, A. F., and Marquardt, H. (1988). **Molecular events in the processing of recombinant type 1 pre-pro-transforming growth factor beta to the mature polypeptide.** *Molecular and Cellular Biology*, 8(10), 4162–4168.
- Gentry, L. E., and Nash, B. W. (1990). **The pro domain of pre-pro-transforming growth factor beta 1 when independently expressed is a functional binding protein for the mature growth factor.** *Biochemistry*, 29(29), 6851–6857.
- Gerbe, F., Sidot, E., Smyth, D. J., Ohmoto, M., Matsumoto, I., Dardalhon, V., Cesses, P., Garnier, L., Pouzolles, M., Brulin, B., Bruschi, M., Harcus, Y., Zimmermann, V. S., Taylor, N., Maizels, R. M., and Jay, P. (2016). **Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites.** *Nature*, 529(7585), 226–230.
- Gerbe, F., Van Es, J. H., Makrini, L., Brulin, B., Mellitzer, G., Robine, S., Romagnolo, B., Shroyer, N. F., Bourgaux, J. F., Pignodel, C., Clevers, H., and Jay, P. (2011). **Distinct ATOH1 and Neurog3 requirements define tuft cells as a new secretory cell type in the intestinal epithelium.** *Journal of Cell Biology*, 192(5), 767–780.
- Gille, H., Kowalski, J., Li, B., LeCouter, J., Moffat, B., Zioncheck, T. F., Pelletien, N., Ferrara, N. (2001). **Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants.** *The Journal of Biological Chemistry*, 276(5), 3222–3230.

- Gong, J., Xu, J., Zhu, W., Gao, X., Li, N., and Li, J. (2010). **Epithelial-specific blockade of MyD88-dependent pathway causes spontaneous small intestinal inflammation.** *Clinical Immunology*, 136(2), 245–256.
- Gonzales, C. B., Simmons, D., and MacDougall, M. (2010). **Competing roles of TGFbeta and Nma/BAMBI in odontoblasts.** *Journal of Dental Research*, 89(6), 597–602.
- Gorelik, L., and Flavell, R. A. (2000). **Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease.** *Immunity*, 12(2), 171–181.
- Goumans, M. J., and Mummery, C. (2000). **Functional analysis of the TGFbeta receptor/Smad pathway through gene ablation in mice.** *The International Journal of Developmental Biology*, 44(3), 253–265.
- Greten, F. R., Eckmann, L., Greten, T. F., Park, J. M., Li, Z.-W., Egan, L. J., Kagnoff M. F., and Karin, M. (2004). **IKKβ links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer.** *Cell*, 118(3), 285–296.
- Guillot, N., Kollins, D., Gilbert, V., Xavier, S., Chen, J., Gentle, M., Reddy, A., Bottinger, E., Jiang, R., Rastaldi, M. P., Corbelli, A., and Schlondorff, D. (2012). **BAMBI regulates angiogenesis and endothelial homeostasis through modulation of alternative TGFbeta signaling.** *PloS One*, 7(6), e39406.
- Hachimine, D., Uchida, K., Asada, M., Nishio, A., Kawamata, S., Sekimoto, G., Murata, M., Yamagata, H., Mori, S., Tahashi, Y., Matsuzaki, K., and Okazaki, K. (2008). **Involvement of Smad3 phosphoisoform-mediated signaling in the development of colonic cancer in IL-10-deficient mice.** *International Journal of Oncology*, 32(6), 1221–1226.
- Hadis, U., Wahl, B., Schulz, O., Hardtke-Wolenski, M., Schippers, A., Wagner, N., Muller, W., Sparwasser, T., Forster, R., and Pabst, O. (2011). **Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3+ regulatory T cells in the lamina propria.** *Immunity*, 34(2), 237–246.
- Hamada, H., Hiroi, T., Nishiyama, Y., Takahashi, H., Masunaga, Y., Hachimura, S., Kaminogawa, S., Takahashi-Iwanaga, H., Iwanaga, T., Kiyono, H., Yamamoto, H., and Ishikawa, H. (2002). **Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine.** *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 168(1), 57–64.
- Hao, Z., Yang, X., Lv, Y., Li, S., Purbey, B. K., and Su, H. (2012). **Intracolonicallly administered adeno-associated virus-bone morphogenetic protein-7 ameliorates dextran sulphate sodium-induced acute colitis in rats.** *The Journal of Gene Medicine*, 14(7), 482–490.
- Haramis, A.-P. G. (2004). **De Novo Crypt Formation and Juvenile Polyposis on BMP Inhibition in Mouse Intestine.** *Science*, 303(5664), 1684–1686.
- Hase, K., Kawano, K., Nochi, T., Pontes, G. S., Fukuda, S., Ebisawa, M., Kadokura, K., Tobe, T., Fujimura, Y., Kawano, S., Yabashi, A., Waguri, S., Nakato, G., Kimura, S., Murakami, T., Imura, M., Hamura, K., Fukuoka, S.-I., Lowe, A. W., Itoh, K., Kiyono, H., and Ohno, H. (2009). **Uptake through glycoprotein 2 of FimH(+) bacteria by M cells initiates mucosal immune response.** *Nature*, 462(7270), 226–230.

- Hayashi, H., Abdollah, S., Qiu, Y., Cai, J., Xu, Y. Y., Grinnell, B. W., Richardson, M. A., Topper, J. N., Gimbrone, M. A. Jr., Wrana, J. L., and Falb, D. (1997). **The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling.** *Cell*, 89(7), 1165–1173.
- Hayday, A., and Gibbons, D. (2008). **Brokering the peace: the origin of intestinal T cells.** *Mucosal Immunology*, 1(3), 172–174.
- He, B., Xu, W., Santini, P. A., Polydorides, A. D., Chiu, A., Estrella, J., Shan, M., Chadburn, A., Villanacci, V., Plebani, A., Knowles, D. M., Rescigno, M., and Cerutti, A. (2007). **Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL.** *Immunity*, 26(6), 812–826.
- He, Y., Ou, Z., Chen, X., Zu, X., Liu, L., Li, Y., Cao, Z., Chen, M., Chen, Z., Chen, H., Qi, L., and Wang, L. (2016). **LPS/TLR4 Signaling Enhances TGF-beta Response Through Downregulating BAMBI During Prostatic Hyperplasia.** *Scientific Reports*, 6, 27051.
- Heimesaat, M. M., Fischer, A., Siegmund, B., Kupz, A., Niebergall, J., Fuchs, D., Jahn, H.-K., Freudenberg, M., Loddenkemper, C., Batra, A., Lehr, H.-A., Liesenfeld, O., Blaut, M., Gobel, U. B., Schumann, R. R., and Bereswill, S. (2007). **Shift towards pro-inflammatory intestinal bacteria aggravates acute murine colitis via Toll-like receptors 2 and 4.** *PloS One*, 2(7), e662.
- Herbertz, S., Sawyer, J. S., Stauber, A. J., Gueorguieva, I., Driscoll, K. E., Estrem, S. T., Cleverly, A. L., Desai, D., Guba, S. C., Benhadji, K. A., Slapak, C. A., and Lahn, M. M. (2015). **Clinical development of galunisertib (LY2157299 monohydrate), a small molecule inhibitor of transforming growth factor-beta signaling pathway.** *Drug Design, Development and Therapy*, 9, 4479–4499.
- Herbrand, H., Bernhardt, G., Forster, R., and Pabst, O. (2008). **Dynamics and function of solitary intestinal lymphoid tissue.** *Critical Reviews in Immunology*, 28(1), 1–13.
- Hering, N. A., Andres, S., Fromm, A., van Tol, E. A., Amasheh, M., Mankertz, J., Fromm, M., and Schulzke, J. D. (2011). **Transforming growth factor-beta, a whey protein component, strengthens the intestinal barrier by upregulating claudin-4 in HT-29/B6 cells.** *The Journal of Nutrition*, 141(5), 783–789.
- Hill, M. J. (1997). **Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis.** *European Journal of Cancer Prevention : The Official Journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, 6 Suppl 1, S43-5.
- Hinck, A. P. (2012). **Structural studies of the TGF-betas and their receptors - insights into evolution of the TGF-beta superfamily.** *FEBS Letters*, 586(14), 1860–1870.
- Hinz, B., Phan, S. H., Thannickal, V. J., Prunotto, M., Desmouliere, A., Varga, J., De Wever, O., Mareel, M., and Gabbiani, G. (2012). **Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling.** *The American Journal of Pathology*, 180(4), 1340–1355.
- Hirano, A., Umeno, J., Okamoto, Y., Shibata, H., Ogura, Y., Moriyama, T., Torisu, T., Fujioka, S., Fuyuno, Y., Kawarabayashi, Y., Matsumoto, T., Kitazono, T., and Esaki, M. (2018). **Comparison of the microbial community structure between inflamed and non-inflamed sites in patients with ulcerative colitis.** *Journal of Gastroenterology and Hepatology*.

Hirota, S. A., Ng, J., Lueng, A., Khajah, M., Parhar, K., Li, Y., Rioux, K. P., Ghosh, S., Xavier, R. J., Colgan, S. P., Tschopp, J., Muruve, D., MacDonald, J. A., and Beck, P. L. (2011). **NLRP3 inflammasome plays a key role in the regulation of intestinal homeostasis.** *Inflammatory Bowel Diseases*, 17(6), 1359–1372.

Ho, S., Pothoulakis, C., and Koon, H. W. (2013). **Antimicrobial Peptides and Colitis.** *Current Pharmaceutical Design*, 19(1), 40–47.

Höfer, D., Püschel, B., and Drenckhahn, D. (1996). **Taste receptor-like cells in the rat gut identified by expression of alpha-gustducin.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(13), 6631–4.

Hooper, L. V., Littman, D. R., and Macpherson, A. J. (2012). **Interactions between the microbiota and the immune system.** *Science (New York, N.Y.)*, 336(6086), 1268–1273.

Hooper, L. V., Stappenbeck, T. S., Hong, C. V., and Gordon, J. I. (2003). **Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity.** *Nature Immunology*, 4(3), 269–273.

Hope, M. E., Hold, G. L., Kain, R., and El-Omar, E. M. (2005). **Sporadic colorectal cancer--role of the commensal microbiota.** *FEMS Microbiology Letters*, 244(1), 1–7.

Horiguchi, M., Ota, M., and Rifkin, D. B. (2012). **Matrix control of transforming growth factor-beta function.** *Journal of Biochemistry*, 152(4), 321–329.

Hoshi, N., Schenten, D., Nish, S. A., Walther, Z., Gagliani, N., Flavell, R. A., Reizis, B., Shen, Z., Fox, J. G., Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2012). **MyD88 signalling in colonic mononuclear phagocytes drives colitis in IL-10-deficient mice.** *Nature Communications*, 3, 1120.

Hovhannisyan, Z., Treatman, J., Littman, D. R., and Mayer, L. (2011). **Characterization of interleukin-17-producing regulatory T cells in inflamed intestinal mucosa from patients with inflammatory bowel diseases.** *Gastroenterology*, 140(3), 957–965.

Howe, K. L., Reardon, C., Wang, A., Nazli, A., and McKay, D. M. (2005). **Transforming Growth Factor-β Regulation of Epithelial Tight Junction Proteins Enhances Barrier Function and Blocks Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7-Induced Increased Permeability.** *The American Journal of Pathology*, 167(6), 1587–1597.

Hu, B., Elinav, E., Huber, S., Booth, C. J., Strowig, T., Jin, C., Eisenbarth, S. C., and Flavell, R. A. (2010). **Inflammation-induced tumorigenesis in the colon is regulated by caspase-1 and NLRC4.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(50), 21635–21640.

Hugot, J. P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cezard, J. P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C. A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Cortot, A., Modigliani, R., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Colombel, J. F., Sahbatou, M., and Thomas, G. (2001). **Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease.** *Nature*, 411(6837), 599–603.

Hume, D. A., Loutit, J. F., and Gordon, S. (1984). **The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80: macrophages of bone and associated connective tissue.** *Journal of Cell Science*, 66, 189–194.

- Iizuka, M., and Konno, S. (2011, May). **Wound healing of intestinal epithelial cells.** *World Journal of Gastroenterology*. United States.
- Imamura, T., Takase, M., Nishihara, A., Oeda, E., Hanai, J., Kawabata, M., and Miyazono, K. (1997). **Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily.** *Nature*, 389(6651), 622–626.
- Imhann, F., Vich Vila, A., Bonder, M. J., Fu, J., Gevers, D., Visschedijk, M. C., Spekhorst, L. M., Alberts, R., Franke, L., van Dullemen, H. M., Ter Steege, R. W. F., Huttenhower, C., Dijkstra, G., Xavier, R. J., Festen, E. A. M., Wijmenga, C., Zhernakova, A., and Weersma, R. K. (2018). **Interplay of host genetics and gut microbiota underlying the onset and clinical presentation of inflammatory bowel disease.** *Gut*, 67(1), 108–119.
- Inman, G. J., Nicolas, F. J., and Hill, C. S. (2002). **Nucleocytoplasmic shuttling of Smads 2, 3, and 4 permits sensing of TGF-beta receptor activity.** *Molecular Cell*, 10(2), 283–294.
- Inui, M., Martello, G., and Piccolo, S. (2010). **MicroRNA control of signal transduction.** *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(4), 252–263.
- Irie, T., Muta, T., and Takeshige, K. (2000). **TAK1 mediates an activation signal from toll-like receptor(s) to nuclear factor-kappaB in lipopolysaccharide-stimulated macrophages.** *FEBS Letters*, 467(2–3), 160–164.
- Ito, R., Kita, M., Shin-Ya, M., Kishida, T., Urano, A., Takada, R., Sakagami, J., Imanishi, J., Iwakura, Y., Okanoue, T., Yoshikawa, T., Kataoka, K., and Mazda, O. (2008). **Involvement of IL-17A in the pathogenesis of DSS-induced colitis in mice.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 377(1), 12–16.
- Itoh, F., Divecha, N., Brocks, L., Oomen, L., Janssen, H., Calafat, J., Itoh, S., and ten Dijke Pt, P. (2002). **The FYVE domain in Smad anchor for receptor activation (SARA) is sufficient for localization of SARA in early endosomes and regulates TGF-beta/Smad signalling.** *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 7(3), 321–331.
- Ivanov, I. I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E. L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K. C., Santee, C. A., Lynch, S. V., Tanoue, T., Imaoka, A., Itoh, K., Takeda, K., Umesaki, Y., Honda, K., and Littman, D. R. (2009). **Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria.** *Cell*, 139(3), 485–498.
- Ivanov, I. I., and Honda, K. (2012). **Intestinal commensal microbes as immune modulators.** *Cell Host & Microbe*, 12(4), 496–508.
- Ivanov, I. I., McKenzie, B. S., Zhou, L., Tadokoro, C. E., Lepelletier, A., Lafaille, J. J., Cua, D. J., and Littman, D. R. (2006). **The orphan nuclear receptor RORgamma directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells.** *Cell*, 126(6), 1121–1133.
- Iwata, M., Hirakiyama, A., Eshima, Y., Kagechika, H., Kato, C., and Song, S.-Y. (2004). **Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells.** *Immunity*, 21(4), 527–538.
- Izcue, A., Coombes, J. L., and Powrie, F. (2009). **Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation.** *Annual Review of Immunology*, 27, 313–338.
- Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., and Nageshwar Reddy, D. (2015). **Role of the normal gut microbiota.** *World Journal of Gastroenterology*, 21(29), 8787–8803.

Javelaud, D., and Mauviel, A. (2004). **Mammalian transforming growth factor-betas: Smad signaling and physio-pathological roles.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(7), 1161–1165.

Johansen, F. E., and Kaetzel, C. S. (2011). **Regulation of the polymeric immunoglobulin receptor and IgA transport: new advances in environmental factors that stimulate pIgR expression and its role in mucosal immunity.** *Mucosal Immunology*, 4(6), 598–602.

Johansen, F. E., Pekna, M., Norderhaug, I. N., Haneberg, B., Hietala, M. A., Krajci, P., Betsholtz, C., and Brandtzaeg, P. (1999). **Absence of epithelial immunoglobulin A transport, with increased mucosal leakiness, in polymeric immunoglobulin receptor/secretory component-deficient mice.** *The Journal of Experimental Medicine*, 190(7), 915–22.

Johansson-Lindbom, B., Svensson, M., Pabst, O., Palmqvist, C., Marquez, G., Förster, R., and Agace, W. W. (2005). **Functional specialization of gut CD103+ dendritic cells in the regulation of tissue-selective T cell homing.** *The Journal of Experimental Medicine*, 202(8), 1063 LP-1073.

Johansson, M. E. V., Larsson, J. M. H., and Hansson, G. C. (2011). **The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(Supplement_1), 4659–4665.

Johansson, M. E. V., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., Hansson, G. C., ... de Vos, W. M. (2008). **The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria.** *Pnas*, 105(39), 15064–15069.

Joossens, M., Huys, G., Cnockaert, M., De Preter, V., Verbeke, K., Rutgeerts, P., Vandamme, P., and Vermeire, S. (2011). **Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives.** *Gut*, 60(5), 631–637.

Juge, N. (2012). **Microbial adhesins to gastrointestinal mucus.** *Trends in Microbiology*, 20(1), 30–39.

Kaartinen, V., Voncken, J. W., Shuler, C., Warburton, D., Bu, D., Heisterkamp, N., and Groffen, J. (1995). **Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction.** *Nature Genetics*, 11(4), 415–421.

Kajino-Sakamoto, R., Inagaki, M., Lippert, E., Akira, S., Robine, S., Matsumoto, K., Jobin, C., and Ninomiya-Tsuji, J. (2008). **Enterocyte-derived TAK1 signaling prevents epithelium apoptosis and the development of ileitis and colitis.** *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(2), 1143–1152.

Kajino-Sakamoto, R., Omori, E., Nighot, P. K., Blikslager, A. T., Matsumoto, K., and Ninomiya-Tsuji, J. (2010). **TGF-beta-activated kinase 1 signaling maintains intestinal integrity by preventing accumulation of reactive oxygen species in the intestinal epithelium.** *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 185(8), 4729–4737.

Kamada, N., Seo, S.-U., Chen, G. Y., and Nunez, G. (2013). **Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease.** *Nature Reviews. Immunology*, 13(5), 321–335.

- Kang, J. S., Liu, C., and Derynck, R. (2009). **New regulatory mechanisms of TGF-beta receptor function.** *Trends in Cell Biology*, 19(8), 385–394.
- Kawamoto, S., Tran, T. H., Maruya, M., Suzuki, K., Doi, Y., Tsutsui, Y., Kato, L. M., and Fagarasan, S. (2012). **The inhibitory receptor PD-1 regulates IgA selection and bacterial composition in the gut.** *Science (New York, N.Y.)*, 336(6080), 485–489.
- Khmaladze, I., Kelkka, T., Guerard, S., Wing, K., Pizzolla, A., Saxena, A., Lundqvist, K., Holmdahl, M., Nandakumar, K. S., and Holmdahl, R. (2014). **Mannan induces ROS-regulated, IL-17A-dependent psoriasis arthritis-like disease in mice.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(35), E3669–78.
- Kim, B. S., Siracusa, M. C., Saenz, S. A., Noti, M., Monticelli, L. A., Sonnenberg, G. F., Hepworth, M. R., Van Voorhees, A. S., Comeau, M., R., and Artis, D. (2013). **TSLP elicits IL-33-independent innate lymphoid cell responses to promote skin inflammation.** *Science Translational Medicine*, 5(170), 170ra16.
- Kim, J.-Y., Kajino-Sakamoto, R., Omori, E., Jobin, C., and Ninomiya-Tsuji, J. (2009). **Intestinal epithelial-derived TAK1 signaling is essential for cytoprotection against chemical-induced colitis.** *PLoS One*, 4(2), e4561.
- Kim, J.-Y., Omori, E., Matsumoto, K., Nunez, G., and Ninomiya-Tsuji, J. (2008). **TAK1 is a central mediator of NOD2 signaling in epidermal cells.** *The Journal of Biological Chemistry*, 283(1), 137–144.
- Klein, J., Ju, W., Heyer, J., Wittek, B., Haneke, T., Knaus, P., Kucherlapati, R., Bottinger, E. P., Nitschke, L., and Kneitz, B. (2006). **B cell-specific deficiency for Smad2 in vivo leads to defects in TGF-beta-directed IgA switching and changes in B cell fate.** *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176(4), 2389–2396.
- Knight, C., Simmons, D., Gu, T. T., Gluhak-Heinrich, J., Pavlin, D., Zeichner-David, M., and MacDougall, M. (2001). **Cloning, characterization, and tissue expression pattern of mouse Nma/BAMBI during odontogenesis.** *Journal of Dental Research*, 80(10), 1895–1902.
- Kobayashi, K. S., Chamaillard, M., Ogura, Y., Henegariu, O., Inohara, N., Nunez, G., and Flavell, R. A. (2005). **Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract.** *Science (New York, N.Y.)*, 307(5710), 731–734.
- Konkel, J. E., and Chen, W. (2011). **Balancing acts: the role of TGF-beta in the mucosal immune system.** *Trends in Molecular Medicine*, 17(11), 668–676.
- Kostic, A. D., Gevers, D., Pedamallu, C. S., Michaud, M., Duke, F., Earl, A. M., Ojesina, A. I., Jung, J., Bass, A. J., Tabernero, J., Baselga, J., Liu, C., Shivdasani, R. A., Ogino, S., Birren, B. W., Huttenhower, C., Garrett, W. S., and Meyerson, M. (2012). **Genomic analysis identifies association of Fusobacterium with colorectal carcinoma.** *Genome Research*, 22(2), 292–298.
- Ku, J.-L., Park, S.-H., Yoon, K.-A., Shin, Y.-K., Kim, K.-H., Choi, J.-S., Kang, H.-C., Kim, I.-J., Han, I.-O., Park, J.-G. (2007). **Genetic alterations of the TGF-beta signaling pathway in colorectal cancer cell lines: a novel mutation in Smad3 associated with the inactivation of TGF-beta-induced transcriptional activation.** *Cancer Letters*, 247(2), 283–292.

- Kufer, T. A., Banks, D. J., and Philpott, D. J. (2006). **Innate immune sensing of microbes by Nod proteins.** *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1072, 19–27.
- Kulkarni, A. B., and Karlsson, S. (1993). **Transforming growth factor-beta 1 knockout mice. A mutation in one cytokine gene causes a dramatic inflammatory disease.** *The American Journal of Pathology*, 143(1), 3–9.
- Kumar, A., Wu, H., Collier-Hyams, L. S., Kwon, Y.-M., Hanson, J. M., and Neish, A. S. (2008). **The Bacterial Fermentation Product Butyrate Influences Epithelial Signaling via Reactive Oxygen Species-Mediated Changes in Cullin-1 Neddylation.** *The Journal of Immunology*, 182(1).
- Kumar, H., Kawai, T., and Akira, S. (2009). **Toll-like receptors and innate immunity.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 388(4), 621–625.
- Kusakabe, M., Cheong, P.-L., Nikfar, R., McLennan, I. S., and Koishi, K. (2008). **The structure of the TGF-beta latency associated peptide region determines the ability of the proprotein convertase furin to cleave TGF-betas.** *Journal of Cellular Biochemistry*, 103(1), 311–320.
- Lala, S., Ogura, Y., Osborne, C., Hor, S. Y., Bromfield, A., Davies, S., Ogunbiyi, O., Nunez, G., and Keshav, S. (2003). **Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells.** *Gastroenterology*, 125(1), 47–57.
- Larsson, E., Tremaroli, V., Lee, Y. S., Koren, O., Nookaew, I., Fricker, A., ... Backhed, F. (2012). **Analysis of gut microbial regulation of host gene expression along the length of the gut and regulation of gut microbial ecology through MyD88.** *Gut*, 61(8), 1124–1131.
- Lawler, S., Feng, X. H., Chen, R. H., Maruoka, E. M., Turck, C. W., Griswold-Prenner, I., and Derynck, R. (1997). **The type II transforming growth factor-beta receptor autophosphorylates not only on serine and threonine but also on tyrosine residues.** *The Journal of Biological Chemistry*, 272(23), 14850–14859.
- Lee, J., Mo, J.-H., Katakura, K., Alkalay, I., Rucker, A. N., Liu, Y.-T., Shen, C., Cojocaru, G., Shenouda, S., Kagnoff, M., Eckmann, L., Ben-Neriah, Y., and Raz, E. (2006). **Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells.** *Nature Cell Biology*, 8(12), 1327–1336.
- Lee, M. K., Pardoux, C., Hall, M. C., Lee, P. S., Warburton, D., Qing, J., Smith, S. M., and Derynck, R. (2007). **TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA.** *The EMBO Journal*, 26(17), 3957–3967.
- Lee, S. H., Hu, L., Gonzalez-navajas, J., Seo, G. S., Shen, C., Brick, J., Herdman, S., Varki, N., Corr, M., Lee, J., and Raz, E. (2010). **ERK activation drives intestinal tumorigenesis in Apcmin/+ mice.** *Nature Medicine*, 16(6), 665–671.
- Lee, Y. K., Menezes, J. S., Umesaki, Y., and Mazmanian, S. K. (2011). **Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 Suppl, 4615–4622.
- Lee, Y. K., Turner, H., Maynard, C. L., Oliver, J. R., Chen, D., Elson, C. O., and Weaver, C. T. (2009). **Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage.** *Immunity*, 30(1), 92–107.

- Letterio, J. J., and Roberts, A. B. (1998). **Regulation of immune responses by TGF-beta.** *Annual Review of Immunology*, 16, 137–161.
- Ley, R. E. (2010). **Obesity and the human microbiome.** *Current Opinion in Gastroenterology*, 26(1), 5–11.
- Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S., and Gordon, J. I. (2006). **Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity.** *Nature*, 444(7122), 1022–1023.
- Li, M. O., Wan, Y. Y., and Flavell, R. A. (2007). **T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation.** *Immunity*, 26(5), 579–591.
- Li, R., Rosendahl, A., Brodin, G., Cheng, A. M., Ahgren, A., Sundquist, C., Kulkarni, S., Pawson, T., Heldin, C.-H., and Heuchel, R. L. (2006). **Deletion of exon I of SMAD7 in mice results in altered B cell responses.** *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176(11), 6777–6784.
- Lin, Z., Gao, C., Ning, Y., He, X., Wu, W., and Chen, Y.-G. (2008). **The pseudoreceptor BMP and activin membrane-bound inhibitor positively modulates Wnt/beta-catenin signaling.** *The Journal of Biological Chemistry*, 283(48), 33053–33058.
- Linden, D. R., Foley, K. F., McQuoid, C., Simpson, J., Sharkey, K. A., and Mawe, G. M. (2005). **Serotonin transporter function and expression are reduced in mice with TNBS-induced colitis.** *Neurogastroenterology and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 17(4), 565–574.
- Lipinski, S., Grabe, N., Jacobs, G., Billmann-born, S., Till, A., and Häslér, R. (2012). **RNAi screening identifies mediators of NOD2 signaling : Implications for spatial specificity of MDP recognition,** 109, 2012.
- Lipinski, S., Till, A., Sina, C., Arlt, A., Grasberger, H., Schreiber, S., and Rosenstiel, P. (2009). **DUOX2-derived reactive oxygen species are effectors of NOD2-mediated antibacterial responses.** *Journal of Cell Science*, 122(Pt 19), 3522–3530.
- Liu, K., Song, X., Ma, H., Liu, L., Wen, X., Yu, J., Wang, H., and Hu, S. (2014). **Knockdown of BAMBI inhibits beta-catenin and transforming growth factor beta to suppress metastasis of gastric cancer cells.** *Molecular Medicine Reports*, 10(2), 874–880.
- Lloyd, G., Green, F. H., Fox, H., Mani, V., and Turnberg, L. A. (1975). **Mast cells and immunoglobulin E in inflammatory bowel disease.** *Gut*, 16(11), 861–865.
- Luci, C., Reynders, A., Ivanov, I. I., Cognet, C., Chiche, L., Chasson, L., Hardwigsen, J., Anguiano, E., Banchereau, J., Chaussabel, D., Dalod, M., Littman, D. R., Vivier, E., and Tomasello, E. (2009). **Influence of the transcription factor RORγt on the development of Nkp46+ cell populations in gut and skin.** *Nature Immunology*, 10(1), 75–82.
- Lyons, R. M., Keski-Oja, J., and Moses, H. L. (1988). **Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium.** *The Journal of Cell Biology*, 106(5), 1659–1665.
- Mabbott, N. A., Donaldson, D. S., Ohno, H., Williams, I. R., and Mahajan, A. (2013). **Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium.** *Mucosal Immunology*, 6(4), 666–677.

Macfarlane, S., and Macfarlane, G. T. (2003). **Regulation of short-chain fatty acid production.** *The Proceedings of the Nutrition Society*, 62(1), 67–72.

Machiels, K., Joossens, M., Sabino, J., De Preter, V., Arijis, I., Eeckhaut, V., Ballet, V., Claes, K., Van Immerseel, F., Verbeke, K., Ferrante, M., Verhaegen, J., Rutgeerts, P., and Vermeire, S. (2014). **A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis.** *Gut*, 63(8), 1275–1283.

Macpherson, A. J., Gatto, D., Sainsbury, E., Harriman, G. R., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. (2000). **A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria.** *Science (New York, N.Y.)*, 288(5474), 2222–2226.

Mangan, P. R., Harrington, L. E., O’Quinn, D. B., Helms, W. S., Bullard, D. C., Elson, C. O., Hatton, R. D., Wahl, S. M., Schoeb, T. R., and Weaver, C. T. (2006). **Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage.** *Nature*, 441(7090), 231–234.

Martinon, F., Mayor, A., and Tschopp, J. (2009). **The inflammasomes: guardians of the body.** *Annual Review of Immunology*, 27, 229–265.

Marwitz, S., Depner, S., Dvornikov, D., Merkle, R., Szczygiel, M., Muller-Decker, K., Lucarelli, P., Wasch, M., Mairbaur, H., Rabe, K. F., Kugler, C., Volimer, E., Reck, M., Scheufele, S., Kroger, M., Ammerpohl, O., Siebert, R., Goldmann, T., and Klingmuller, U. (2016). **Downregulation of the TGFbeta Pseudoreceptor BAMBI in Non-Small Cell Lung Cancer Enhances TGFbeta Signaling and Invasion.** *Cancer Research*, 76(13), 3785–3801.

Massague, J., and Chen, Y. G. (2000). **Controlling TGF-beta signaling.** *Genes & Development*, 14(6), 627–644.

Matteoli, G., Mazzini, E., Iliev, I. D., Mileti, E., Fallarino, F., Puccetti, P., Chieppa, M., and Rescigno, M. (2010). **Gut CD103+ dendritic cells express indoleamine 2,3-dioxygenase which influences T regulatory/T effector cell balance and oral tolerance induction.** *Gut*, 59(5), 595–604.

Maul, J., Loddenkemper, C., Mundt, P., Berg, E., Giese, T., Stallmach, A., Zeitz, M., and Duchmann, R. (2005). **Peripheral and intestinal regulatory CD4+ CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease.** *Gastroenterology*, 128(7), 1868–1878.

Maynard, C. L., Harrington, L. E., Janowski, K. M., Oliver, J. R., Zindl, C. L., Rudensky, A. Y., and Weaver, C. T. (2007). **Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3+ and Foxp3- precursor cells in the absence of interleukin 10.** *Nature Immunology*, 8(9), 931–941.

Mazzini, E., Massimiliano, L., Penna, G., and Rescigno, M. (2014). **Oral Tolerance Can Be Established via Gap Junction Transfer of Fed Antigens from CX3CR1+ Macrophages to CD103+ Dendritic Cells.** *Immunity*, 40(2), 248–261.

McDole, J. R., Wheeler, L. W., McDonald, K. G., Wang, B., Konjufca, V., Knoop, K. A., Newberry, R. D., and Miller, M. J. (2012). **Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine.** *Nature*, 483(7389), 345–349.

Mebius, R. E. (2003). **Organogenesis of lymphoid tissues.** *Nature Reviews. Immunology*, 3(4), 292–303.

- Mebius, R. E., Rennert, P., and Weissman, I. L. (1997). **Developing lymph nodes collect CD4⁺CD3⁻LTβ⁺ cells that can differentiate to APC, NK cells, and follicular cells but not T or B cells.** *Immunity*, 7(4), 493–504.
- Meyer-Hoffert, U., Hornef, M. W., Henriques-Normark, B., Axelsson, L.-G., Midtvedt, T., Putsep, K., and Andersson, M. (2008). **Secreted enteric antimicrobial activity localises to the mucus surface layer.** *Gut*, 57(6), 764–771.
- Miller, H. R., Huntley, J. F., Newlands, G. F., Mackellar, A., Lammas, D. A., and Wakelin, D. (1988). **Granule proteinases define mast cell heterogeneity in the serosa and the gastrointestinal mucosa of the mouse.** *Immunology*, 65(4), 559–566.
- Miller, H. R. P., and Pemberton, A. D. (2002). **Tissue-specific expression of mast cell granule serine proteinases and their role in inflammation in the lung and gut.** *Immunology*, 105(4), 375–390.
- Mitchell, E. J., Fitz-Gibbon, L., and O'Connor-McCourt, M. D. (1992). **Subtypes of betaglycan and of type I and type II transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptors with different affinities for TGF-beta 1 and TGF-beta 2 are exhibited by human placental trophoblast cells.** *Journal of Cellular Physiology*, 150(2), 334–343.
- Miyaki, M., Iijima, T., Konishi, M., Sakai, K., Ishii, A., Yasuno, M., ... Mori, T. (1999). **Higher frequency of Smad4 gene mutation in human colorectal cancer with distant metastasis.** *Oncogene*, 18(20), 3098–3103.
- Miyazono, K. (2000). **Positive and negative regulation of TGF-beta signaling.** *Journal of Cell Science*, 113 (Pt 7), 1101–1109.
- Mizuno, S., Kanai, T., Mikami, Y., Sujino, T., Ono, Y., Hayashi, A., Handa, T., Matsumoto, A., Nakamoto, N., Matsuoka, K., Hisamatsu, T., Takaishi, H., and Hibi, T. (2012). **CCR9⁺ plasmacytoid dendritic cells in the small intestine suppress development of intestinal inflammation in mice.** *Immunology Letters*, 146(1–2), 64–69.
- Monteiro, M., Almeida, C. F., Caridade, M., Ribot, J. C., Duarte, J., Agua-Doce, A., Wollenberg, I., Silva-Santos, B., and Graca, L. (2010). **Identification of regulatory Foxp3⁺ invariant NKT cells induced by TGF-beta.** *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 185(4), 2157–2163.
- Monteleone, G., Del Vecchio Blanco, G., Monteleone, I., Fina, D., Caruso, R., Gioia, V., Ballerini, S., Federici, G., Bernardini, S., Pallone, F., and MacDonald, T. T. (2005). **Post-transcriptional regulation of Smad7 in the gut of patients with inflammatory bowel disease.** *Gastroenterology*, 129(5), 1420–1429.
- Monteleone, G., Kumberova, A., Croft, N. M., McKenzie, C., Steer, H. W., and MacDonald, T. T. (2001). **Blocking Smad7 restores TGF-beta1 signaling in chronic inflammatory bowel disease.** *The Journal of Clinical Investigation*, 108(4), 601–609.
- Monteleone, G., Pallone, F., and MacDonald, T. T. (2004). **Smad7 in TGF-beta-mediated negative regulation of gut inflammation.** *Trends in Immunology*, 25(10), 513–517.
- Monticelli, L. A., Sonnenberg, G. F., Abt, M. C., Alenghat, T., Ziegler, C. G. K., Doering, T. A., Angelosanto, J. M., Laidlaw, B. J., Yang, C. Y., Sathaliyawala, T., Kubota, M., Turner, D., Diamond, A. W., Farber, D. L., Collman, R. G., Wherry, E. J., and Artis, D. (2011). **Innate lymphoid cells promote lung-tissue homeostasis after infection with influenza virus.**

Nature Immunology, 12(11), 1045–1054.

Monticelli, L. A., Sonnenberg, G. F., and Artis, D. (2012). **Innate lymphoid cells: critical regulators of allergic inflammation and tissue repair in the lung.** *Current Opinion in Immunology*, 24(3), 284–289.

Mora, J. R., and von Andrian, U. H. (2008). **Differentiation and homing of IgA-secreting cells.** *Mucosal Immunology*, 1(2), 96–109.

Moustakas, A., and Heldin, C.-H. (2009). **The regulation of TGFbeta signal transduction.** *Development (Cambridge, England)*, 136(22), 3699–3714.

Mowat, A. M. (2003). **Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens.** *Nature Reviews. Immunology*, 3(4), 331–341.

Mowat, A. M., and Agace, W. W. (2014). **Regional specialization within the intestinal immune system.** *Nature Reviews. Immunology*, 14(10), 667–685.

Mukherjee, S., Zheng, H., Derebe, M., Callenberg, K., Partch, C. L., Rollins, D., Propheter, D. C., Rizo, J., Grabe, M., Jiang, Q.-X., and Hooper, L. V. (2014). **Antibacterial membrane attack by a pore-forming intestinal C-type lectin.** *Nature*, 505(7481), 103–107.

Murphy-Ullrich, J. E., and Poczatek, M. (2000). **Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1: mechanisms and physiology.** *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 11(1–2), 59–69.

Muzaki, A. R. B. M., Tetlak, P., Sheng, J., Loh, S. C., Setiagani, Y. A., Poidinger, M., Zolezzi, F., Karjalainen, K., and Ruedl, C. (2016). **Intestinal CD103(+)CD11b(-) dendritic cells restrain colitis via IFN-gamma-induced anti-inflammatory response in epithelial cells.** *Mucosal Immunology*, 9(2), 336–351.

Nagashima, R., Maeda, K., Imai, Y., and Takahashi, T. (1996). **Lamina propria macrophages in the human gastrointestinal mucosa: their distribution, immunohistological phenotype, and function.** *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 44(7), 721–731.

Nakanishi, Y., Sato, T., and Ohteki, T. (2015). **Commensal Gram-positive bacteria initiates colitis by inducing monocyte/macrophage mobilization.** *Mucosal Immunology*, 8(1), 152–160.

Nakato, G., Fukuda, S., Hase, K., Goitsuka, R., Cooper, M. D., and Ohno, H. (2009). **New approach for M-Cell-specific molecules screening by comprehensive transcriptome analysis.** *DNA Research*, 16(4), 227–235.

Neill, D. R., Wong, S. H., Bellosi, A., Flynn, R. J., Daly, M., Langford, T. K. A., Bucks, C., Kane, C. M., Fallon, P. G., Panell, R., Jolin, H. E., and McKenzie, A. N. J. (2010). **Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity.** *Nature*, 464(7293), 1367–1370.

Nenci, A., Becker, C., Wullaert, A., Gareus, R., Van Loo, G., Danese, S., Huth, M., Nikolaev, A., Neufert, C., Madison, B., Gumucio, D., Neurath, M. F., and Pasparakis, M. (2007). **Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation.** *Nature*, 446(7135), 557–561.

- Neufert, C., Becker, C., and Neurath, M. F. (2007). **An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression.** *Nature Protocols*, 2(8), 1998–2004.
- Niess, J. H., Brand, S., Gu, X., Landsman, L., Jung, S., McCormick, B. A., Vyas, J. M., Boes, M., Ploegh, H. L., Fox, J. G., Littman, D. R., and Reinecker, H.-C. (2005). **CX3CR1-Mediated Dendritic Cell Access to the Intestinal Lumen and Bacterial Clearance.** *Science*, 307(5707), 254 LP-258.
- Nik, A. M., and Carlsson, P. (2013). **Separation of intact intestinal epithelium from mesenchyme.** *BioTechniques*, 55(1), 42–44.
- Ninomiya-Tsuji, J., Kishimoto, K., Hiyama, A., Inoue, J., Cao, Z., and Matsumoto, K. (1999). **The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway.** *Nature*, 398(6724), 252–256.
- Nishida, Y., Murase, K., Isomoto, H., Furusu, H., Mizuta, Y., Riddell, R. H., and Kohno, S. (2002). **Different distribution of mast cells and macrophages in colonic mucosa of patients with collagenous colitis and inflammatory bowel disease.** *Hepato-Gastroenterology*, 49(45), 678–682.
- Noah, T. K., Donahue, B., and Shroyer, N. F. (2011). **Intestinal development and differentiation.** *Experimental Cell Research*, 317(19), 2702–2710.
- Nordlander, S., Pott, J., and Maloy, K. J. (2014). **NLR4 expression in intestinal epithelial cells mediates protection against an enteric pathogen.** *Mucosal Immunology*, 7(4), 775–785.
- Normand, S., Delanoye-Crespin, A., Bressenot, A., Huot, L., Grandjean, T., Peyrin-Biroulet, L., Lemoine, Y., Hot, D., and Chamaillard, M. (2011). **Nod-like receptor pyrin domain-containing protein 6 (NLRP6) controls epithelial self-renewal and colorectal carcinogenesis upon injury.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(23), 9601–9606.
- Ogura, Y., Bonen, D. K., Inohara, N., Nicolae, D. L., Chen, F. F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R. H., Achkar, J.-P., Brant, S. R., Bayless, T. M., Hanauer, S. B., Nunez, G., and Cho, J. H. (2001). **A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease.** *411*(May), 603–606.
- Ogura, Y., Lala, S., Xin, W., Smith, E., Dowds, T. A., Chen, F. F., Zimmermann, E., Tretiakova, M., Cho, J. H., Hart, J., Greenson, J. K., Keshav, S., and Nunez, G. (2003). **Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis.** *Gut*, 52(11), 1591–1597.
- Okai, S., Usui, F., Yokota, S., Hori-I, Y., Hasegawa, M., Nakamura, T., Kurosawa, M., Okada, S., Yamamoto, K., Nishiyama, E., Mori, H., Yamada, T., Kurokawa, K., Matsumoto, S., Nanno, M., Naito, T., Watanabe, Y., Kato, T., Miyauchi, E., Ohno, H., and Shinkura, R. (2016). **High-affinity monoclonal IgA regulates gut microbiota and prevents colitis in mice.** *Nature Microbiology*, 1(9), 16103.
- Olszak, T., An, D., Zeissig, S., Vera, M. P., Richter, J., Franke, A., Glickman, J. N., Siebert, R., Baron, R. M., Kasper, D., and Blumberg, R. S. (2012). **Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function.** *Science (New York, N.Y.)*, 336(6080), 489–493.

Onichtchouk, D., Chen, Y. G., Dosch, R., Gawantka, V., Delius, H., Massague, J., and Niehrs, C. (1999). **Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI.** *Nature*, 401(6752), 480–485.

Ouellette, A. J. (2005). **Paneth cell alpha-defensins: peptide mediators of innate immunity in the small intestine.** *Springer Seminars in Immunopathology*, 27(2), 133–146.

Owen, R. L., Piazza, A. J., and Ermak, T. H. (1991). **Ultrastructural and cytoarchitectural features of lymphoreticular organs in the colon and rectum of adult BALB/c mice.** *The American Journal of Anatomy*, 190(1), 10–18.

Ozdamar, B., Bose, R., Barrios-Rodiles, M., Wang, H.-R., Zhang, Y., and Wrana, J. L. (2005). **Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity.** *Science (New York, N.Y.)*, 307(5715), 1603–1609.

Pabst, O., and Bernhardt, G. (2010). **The puzzle of intestinal lamina propria dendritic cells and macrophages.** *European Journal of Immunology*, 40(8), 2107–2111.

Packey, C. D., and Sartor, R. B. (2008). **Interplay of commensal and pathogenic bacteria, genetic mutations, and immunoregulatory defects in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases.** *Journal of Internal Medicine*, 263(6), 597–606.

Palazzo, M., Balsari, A., Rossini, A., Selleri, S., Calcaterra, C., Gariboldi, S., Zanobbio, L., Arnaboldi, F., Shirai, Y. F., Serrao, G., and Rumio, C. (2007). **Activation of enteroendocrine cells via TLRs induces hormone, chemokine, and defensin secretion.** *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178(7), 4296–4303.

Palm, N. W., de Zoete, M. R., Cullen, T. W., Barry, N. A., Stefanowski, J., Hao, L., Degnan, P. H., Hu, J., Peter, I., Zhang, W., Ruggiero, E., Cho, J. H., Goodman, A. L., and Flavell, R. A. (2014). **Immunoglobulin A coating identifies colitogenic bacteria in inflammatory bowel disease.** *Cell*, 158(5), 1000–1010.

Pan, W.-H., Sommer, F., Falk-Paulsen, M., Ulas, T., Best, P., Fazio, A., Kachroo, P., Luzius, A., Jentzsch, M., Rehman, A., Muller, F., Lengauer, T., Walter, J., Kunzel, S., Baines, J. F., Schreiber, S., Franke, A., Schultze, J. L., Backhed, F., and Rosenstiel, P. (2018). **Exposure to the gut microbiota drives distinct methylome and transcriptome changes in intestinal epithelial cells during postnatal development.** *Genome Medicine*, 10(1), 27.

Penack, O., Smith, O. M., Cunningham-Bussel, A., Liu, X., Rao, U., Yim, N., Na, I.-K., Holland, A. M., Ghosh, A., Lu, S. X., Jenq, R. R., Liu, C., Murphy, G. F., Bandl, K., and van den Brink, M. R. M. (2009). **NOD2 regulates hematopoietic cell function during graft-versus-host disease.** *The Journal of Experimental Medicine*, 206(10), 2101–2110.

Penheiter, S. G., Mitchell, H., Garamszegi, N., Edens, M., Dore, J. J. E. J., and Leof, E. B. (2002). **Internalization-dependent and -independent requirements for transforming growth factor beta receptor signaling via the Smad pathway.** *Molecular and Cellular Biology*, 22(13), 4750–4759.

Persson, E. K., Scott, C. L., Mowat, A. M., and Agace, W. W. (2013). **Dendritic cell subsets in the intestinal lamina propria: Ontogeny and function.** *European Journal of Immunology*, 43(12), 3098–3107.

- Persson, E. K., Uronen-Hansson, H., Semmrich, M., Rivollier, A., Hagerbrand, K., Marsal, J., Gudjonsson, S., Hakansson, U., Reizis, B., Kotarsky, K., and Agace, W. W. (2013). **IRF4 transcription-factor-dependent CD103(+)CD11b(+) dendritic cells drive mucosal T helper 17 cell differentiation.** *Immunity*, 38(5), 958–969.
- Peters, T., Sindrilaru, A., Hinz, B., Hinrichs, R., Menke, A., Al-Azzeh, E. A. D., Holwarth, K., Oreshkova, T., Wang, H., Kess, D., Walzog, B., Sulyok, S., Sunderkotter, C., Friedrich, W., Wlaschek, M., Krieg, T., and Scharffetter-Kochanek, K. (2005). **Wound-healing defect of CD18(-/-) mice due to a decrease in TGF-beta1 and myofibroblast differentiation.** *The EMBO Journal*, 24(19), 3400–3410.
- Peterson, L. W., and Artis, D. (2014). **Intestinal epithelial cells: Regulators of barrier function and immune homeostasis.** *Nature Reviews Immunology*, 14(3), 141–153.
- Petersson, J., Schreiber, O., Hansson, G. C., Gendler, S. J., Velcich, A., Lundberg, J. O., Roos, S., Holm, L., Phillipson, M. (2011). **Importance and regulation of the colonic mucus barrier in a mouse model of colitis.** *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 300(2), G327-33.
- Petnicki-Ocwieja, T., Hrnčir, T., Liu, Y.-J., Biswas, A., Hudcovic, T., Tlaskalova-Hogenova, H., and Kobayashi, K. S. (2009). **Nod2 is required for the regulation of commensal microbiota in the intestine.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(37), 15813–15818.
- Piek, E., Heldin, C. H., and Ten Dijke, P. (1999). **Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling.** *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 13(15), 2105–2124.
- Pils, D., Wittinger, M., Petz, M., Gugerell, A., Gregor, W., Alfanz, A., Horvat, R., Braicu, E.-I., Sehouli, J., Zeillinger, R., Mikulits, W., and Krainer, M. (2010). **BAMBI is overexpressed in ovarian cancer and co-translocates with Smads into the nucleus upon TGF-beta treatment.** *Gynecologic Oncology*, 117(2), 189–197.
- Pils, M. C., Bleich, A., Prinz, I., Fasnacht, N., Bollati-Fogolin, M., Schippers, A., Rozell, B., and Muller, W. (2011). **Commensal gut flora reduces susceptibility to experimentally induced colitis via T-cell-derived interleukin-10.** *Inflammatory Bowel Diseases*, 17(10), 2038–2046.
- Podolsky, D. K., Gerken, G., Eyking, A., and Cario, E. (2009). **Colitis-associated variant of TLR2 causes impaired mucosal repair because of TFF3 deficiency.** *Gastroenterology*, 137(1), 209–220.
- Poniatowski, L. A., Wojdasiewicz, P., Gasik, R., and Szukiewicz, D. (2015). **Transforming growth factor beta family: Insight into the role of growth factors in regulation of fracture healing biology and potential clinical applications.** *Mediators of Inflammation*.
- Postigo, J. (2013). **BAMBI, un inhibidor de la señalización de TGFβ, en la actividad biológica de los linfocitos T CD4⁺.** Tesis Doctoral. Universidad de Cantabria.
- Postigo, J., Iglesias M., Alvarez P., Jesus Augustin J., Buelta L., Merino J., Merino R. (2016) **Bone Morphogenetic Protein and Activin Membrane-Bound Inhibitor, a Transforming Growth Factor beta rheostate that controls murine Treg cell/Th17 cell differentiation and the development of autoimmune arthritis by reducing interleukin-2 signalling.** *Arthritis & Rheumatology*, 68, 1551-1562.

Putsep, K., Axelsson, L. G., Boman, A., Midtvedt, T., Normark, S., Boman, H. G., and Andersson, M. (2000). **Germ-free and colonized mice generate the same products from enteric prodefensins.** *The Journal of Biological Chemistry*, 275(51), 40478–40482.

Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D. R., Li, J., Xu, J., Li, S., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J.-M., Hansen, T., Le Palier, D., Linnenberg, A., Nielsen, H. B., Pelletier, E., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Yu, C., Li, S., Jian, M., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Li, S., Qin, N., Yang, H., Wang, J., Brunak, S., Dore, J., and Wang, J. (2010). **A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing.** *Nature*, 464(7285), 59–65.

Rakoff-Nahoum, S., and Medzhitov, R. (2007). **Regulation of Spontaneous Intestinal Tumorigenesis Through the Adaptor Protein MyD88,** 317(July), 124–128.

Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-varzaneh, F., Edberg, S., and Medzhitov, R. (2004). **Recognition of Commensal Microflora by Toll- Like Receptors Is Required for Intestinal Homeostasis.** *Cell*, 118(February), 229–241.

Rani, R., Smulian, A. G., Greaves, D. R., Hogan, S. P., and Herbert, D. R. (2011). **TGF-beta limits IL-33 production and promotes the resolution of colitis through regulation of macrophage function.** *European Journal of Immunology*, 41(7), 2000–2009.

Razani, B., Zhang, X. L., Bitzer, M., von Gersdorff, G., Bottinger, E. P., and Lisanti, M. P. (2001). **Caveolin-1 regulates transforming growth factor (TGF)-beta/SMAD signaling through an interaction with the TGF-beta type I receptor.** *The Journal of Biological Chemistry*, 276(9), 6727–6738.

Reese, T. A., Bi, K., Kambal, A., Filali-Mouhim, A., Beura, L. K., Burger, M. C., Pulendran, B., Sekaly, R.-P., Jameson, S. C., Masopust, D., Haining, W. N., and Virgin, H. W. (2016). **Sequential Infection with Common Pathogens Promotes Human-like Immune Gene Expression and Altered Vaccine Response.** *Cell Host & Microbe*, 19(5), 713–719.

Renz, H., Brandtzaeg, P., and Hornef, M. (2011). **The impact of perinatal immune development on mucosal homeostasis and chronic inflammation.** *Nature Reviews. Immunology*, 12(1), 9–23.

Rescigno, M., and Di Sabatino, A. (2009). **Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease.** *The Journal of Clinical Investigation*, 119(9), 2441–2450.

Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J.-P., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). **Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria.** *Nat Immunol*, 2(4), 361–367.

Rimoldi, M., Chieppa, M., Salucci, V., Avogadri, F., Sonzogni, A., Sampietro, G. M., Nespole, A., Viale, G., Allavena, P., and Rescigno, M. (2005). **Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells.** *Nature Immunology*, 6(5), 507–514.

- Rizzo, A., Waldner, M. J., Stolfi, C., Sarra, M., Fina, D., Becker, C., Neurath, M. F., Macdonald, T. T., Pallone, F., Monteleone, G., and Fantini, M. C. (2011). **Smad7 expression in T cells prevents colitis-associated cancer.** *Cancer Research*, 71(24), 7423–7432.
- Ross, S., and Hill, C. S. (2008). **How the Smads regulate transcription.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(3), 383–408.
- Rosshart, S. P., Vassallo, B. G., Angeletti, D., Hutchinson, D. S., Morgan, A. P., Takeda, K., Hickman, H. D., McCulloch, J. A., Badger, J. H., Ajami, N. J., Trinchieri, G., Pardo-Manuel de Villena, F., Yewdell, J. W., and Rehermann, B. (2017). **Wild Mouse Gut Microbiota Promotes Host Fitness and Improves Disease Resistance.** *Cell*, 171(5), 1015–1028.e13.
- Rothenberg, M. E., and Hogan, S. P. (2006). **The Eosinophil.** *Annual Review of Immunology*, 24(147–174).
- Round, J. L., Lee, S. M., Li, J., Tran, G., Jabri, B., Chatila, T. A., and Mazmanian, S. K. (2011). **The Toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota.** *Science (New York, N.Y.)*, 332(6032), 974–977.
- Round, J. L., and Mazmanian, S. K. (2009). **The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease.** *Nature Reviews. Immunology*, 9(5), 313–323.
- Rubin, D. C., Zhang, H., Qian, P., Lorenz, R. G., Hutton, K., and Peters, M. G. (2000). **Altered enteroendocrine cell expression in T cell receptor alpha chain knock-out mice.** *Microscopy Research and Technique*, 51(2), 112–120.
- Sakurai, H., Suzuki, S., Kawasaki, N., Nakano, H., Okazaki, T., Chino, A., Doi, T., and Saiki, I. (2003). **Tumor necrosis factor-alpha-induced IKK phosphorylation of NF-kappaB p65 on serine 536 is mediated through the TRAF2, TRAF5, and TAK1 signaling pathway.** *The Journal of Biological Chemistry*, 278(38), 36916–36923.
- Salmela, M. T., Pender, S. L. F., Karjalainen-Lindsberg, M.-L., Puolakkainen, P., Macdonald, T. T., and Saarialho-Kere, U. (2004). **Collagenase-1 (MMP-1), matrilysin-1 (MMP-7), and stromelysin-2 (MMP-10) are expressed by migrating enterocytes during intestinal wound healing.** *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 39(11), 1095–1104.
- Sanapareddy, N., Legge, R. M., Jovov, B., McCoy, A., Burcal, L., Araujo-Perez, F., Randall, T. A., Galanko, J., Benson, A., Sandler, R. S., Rawls, J. F., Abdo, Z., Fodor, A. A., and Keku, T. O. (2012). **Increased rectal microbial richness is associated with the presence of colorectal adenomas in humans.** *The ISME Journal*, 6(10), 1858–1868.
- Sanford, L. P., Ormsby, I., Gittenberger-de Groot, A. C., Sariola, H., Friedman, R., Boivin, G. P., Cardell, E. L., and Doetschman, T. (1997). **TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes.** *Development (Cambridge, England)*, 124(13), 2659–2670.
- Sanos, S. L., Bui, V. L., Mortha, A., Oberle, K., Heners, C., Johnner, C., and Diefenbach, A. (2009). **RORyt and commensal microflora are required for the differentiation of mucosal interleukin 22-producing NKp46+ cells.** *Nature Immunology*, 10(1), 83–91.
- Santibanez, J. F., Quintanilla, M., and Bernabeu, C. (2011). **TGF-beta/TGF-beta receptor system and its role in physiological and pathological conditions.** *Clinical Science (London, England : 1979)*, 121(6), 233–251.

- Sathaliyawala, T., Kubota, M., Yudanin, N., Turner, D., Camp, P., Thome, J. J. C., Bickham, K. L., Lerner, H., Goldstein, M., Sykes, M., Kato, T., and Farber, D. L. (2013). **Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T cell subsets.** *Immunity*, 38(1), 187–197.
- Sato, S., Sanjo, H., Takeda, K., Ninomiya-Tsuji, J., Yamamoto, M., Kawai, T., Matsumoto, K., Takeuchi, O., and Akira, S. (2005). **Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses.** *Nature Immunology*, 6(11), 1087–1095.
- Sato, T., Vries, R. G., Snippert, H. J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D. E., van Es, J. H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P. J., and Clevers, H. (2009). **Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche.** *Nature*, 459(7244), 262–265.
- Sawa, S., Lochner, M., Satoh-Takayama, N., Dulauroy, S., Berard, M., Kleinschek, M., Cua, D., Di Santo, J. P., and Eberl, G. (2011). **RORgammat+ innate lymphoid cells regulate intestinal homeostasis by integrating negative signals from the symbiotic microbiota.** *Nature Immunology*, 12(4), 320–326.
- Schauber, J., Svanholm, C., Termen, S., Iffland, K., Menzel, T., Scheppach, W., Melcher, R., Agerberth, B., Luhrs, H., and Gudmundsson, G. H. (2003). **Expression of the cathelicidin LL-37 is modulated by short chain fatty acids in colonocytes: relevance of signalling pathways.** *Gut*, 52(5), 735–741.
- Scheel, C., and Weinberg, R. A. (2012). **Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: concepts and molecular links.** *Seminars in Cancer Biology*, 22(5–6), 396–403.
- Scheppach, W. (1994). **Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function.** *Gut*, 35(1 Suppl), S35–8.
- Scher, J. U., Sczesnak, A., Longman, R. S., Segata, N., Ubeda, C., Bielski, C., Rostron, T., Cerundolo, V., Pamer, E. G., Abramson, S. B., Huttenhower, C., and Littman, D. R. (2013). **Expansion of intestinal Prevotella copri correlates with enhanced susceptibility to arthritis.** *ELife*, 2, e01202.
- Schneikert, J., and Behrens, J. (2007). **The canonical Wnt signalling pathway and its APC partner in colon cancer development.** *Gut*, 56(3), 417–425.
- Schon, M. P., Arya, A., Murphy, E. A., Adams, C. M., Strauch, U. G., Agace, W. W., Marsal, J., Donohue, J. P., Her, H., Beier, D.R., Olson, S., Lefrancois, L., Brenner, M. B., Grusby, M. J., and Parker, C. M. (1999). **Mucosal T lymphocyte numbers are selectively reduced in integrin alpha E (CD103)-deficient mice.** *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 162(11), 6641–6649.
- Schroeder, B. O., Ehmann, D., Precht, J. C., Castillo, P. A., Kuchler, R., Berger, J., Schaller, M., Stange, E. F., and Wehkamp, J. (2015). **Paneth cell alpha-defensin 6 (HD-6) is an antimicrobial peptide.** *Mucosal Immunology*, 8(3), 661–671.
- Schulz, O., Jaensson, E., Persson, E. K., Liu, X., Worbs, T., Agace, W. W., and Pabst, O. (2009). **Intestinal CD103+, but not CX3CR1+, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions.** *The Journal of Experimental Medicine*, 206(13), 3101 LP-3114.

- Schwitalla, S., Fingerle, A. A., Cammareri, P., Nebelsiek, T., Göktuna, S. I., Ziegler, P. K., Canli, O., Heijmans, J., Huels, D. J., Moreaux, G., Rupec, R. A., Gerhard, M., Schmid, R., Barker, N., Clevers, H., Lang, R., Neumann, J., Kirchner, T., Taketo, M. M., Brink, G. R. van Den, Sansom, O. J., Arkan, M. C., Greten, F. R. (2013). **Intestinal Tumorigenesis Initiated by Dedifferentiation and Acquisition of Stem-Cell-like Properties.** *Cell*, 152, 25–38.
- Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C. M., and Finlay, B. B. (2010). **Gut microbiota in health and disease.** *Physiological Reviews*, 90(3), 859–904.
- Sekiya, T., Oda, T., Matsuura, K., and Akiyama, T. (2004). **Transcriptional regulation of the TGF-beta pseudoreceptor BAMBI by TGF-beta signaling.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 320(3), 680–684.
- Seo, G.-Y., Jang, Y.-S., Kim, H.-A., Lee, M.-R., Park, M.-H., Park, S.-R., Lee, J.-M., Chloe, J., and Kim, P.-H. (2013). **Retinoic acid, acting as a highly specific IgA isotype switch factor, cooperates with TGF-beta1 to enhance the overall IgA response.** *Journal of Leukocyte Biology*, 94(2), 325–335.
- Seoane, J., Le, H.-V., Shen, L., Anderson, S. A., and Massague, J. (2004). **Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation.** *Cell*, 117(2), 211–223.
- Sharma, R., Schumacher, U., Ronaasen, V., and Coates, M. (1995). **Rat intestinal mucosal responses to a microbial flora and different diets.** *Gut*, 36(2), 209–214.
- Shaw, M. H., Kamada, N., Kim, Y.-G., and Núñez, G. (2012). **Microbiota-induced IL-1 β , but not IL-6, is critical for the development of steady-state T_H 17 cells in the intestine.** *The Journal of Experimental Medicine*, 209(2), 251–258.
- Shi, Y., and Massagué, J. (2003). **Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus.** *Cell*, 113(6), 685–700.
- Shim, J.-H., Xiao, C., Paschal, A. E., Bailey, S. T., Rao, P., Hayden, M. S., Lee, K.-Y., Bussey, C., Steckel, M., Tanaka, N., Yamada, G., Akira, S., Matsumoto, K., and Ghosh, S. (2005). **TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo.** *Genes & Development*, 19(22), 2668–2681.
- Shull, M. M., Ormsby, I., Kier, A. B., Pawlowski, S., Diebold, R. J., Yin, M., Allen, R., Sidman, C., Proetzel, G., and Calvin, D. (1992). **Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease.** *Nature*, 359(6397), 693–699.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., and Jemal, A. (2016). **Cancer statistics, 2016.** *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 66(1), 7–30.
- Singh, J., Rivenson, A., Tomita, M., Shimamura, S., Ishibashi, N., and Reddy, B. S. (1997). **Bifidobacterium longum, a lactic acid-producing intestinal bacterium inhibits colon cancer and modulates the intermediate biomarkers of colon carcinogenesis.** *Carcinogenesis*, 18(4), 833–841.
- Smit, J. J., Bol-Schoenmakers, M., Hassing, I., Fiechter, D., Boon, L., Bleumink, R., and Pieters, R. H. H. (2011). **The role of intestinal dendritic cells subsets in the establishment of food allergy.** *Clinical and Experimental Allergy : Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 41(6), 890–898.

- Smit, L., Baas, A., Kuipers, J., Korswagen, H., van de Wetering, M., and Clevers, H. (2004). **Wnt activates the Tak1/Nemo-like kinase pathway.** *The Journal of Biological Chemistry*, 279(17), 17232–17240.
- Smith, P. D., Smythies, L. E., Shen, R., Greenwell-Wild, T., Gliozzi, M., and Wahl, S. M. (2011). **Intestinal macrophages and response to microbial encroachment.** *Mucosal Immunology*, 4(1), 31–42.
- Smythies, L. E., Maheshwari, A., Clements, R., Eckhoff, D., Novak, L., Vu, H. L., Mosteller-Barnum, L. M., Sellers, M., and Smith, P. D. (2006). **Mucosal IL-8 and TGF-beta recruit blood monocytes: evidence for cross-talk between the lamina propria stroma and myeloid cells.** *Journal of Leukocyte Biology*, 80(3), 492–499.
- Sommer, F., and Bäckhed, F. (2013). **The gut microbiota-masters of host development and physiology.** *Nature Reviews Microbiology*, 11(4), 227–238.
- Sommer, F., Nookaew, I., Sommer, N., Fogelstrand, P., and Backhed, F. (2015). **Site-specific programming of the host epithelial transcriptome by the gut microbiota.** *Genome Biology*, 16, 62.
- Song-Zhao, G. X., Srinivasan, N., Pott, J., Baban, D., Frankel, G., and Maloy, K. J. (2014). **Nlrp3 activation in the intestinal epithelium protects against a mucosal pathogen.** *Mucosal Immunology*, 7(4), 763–774.
- Sorokin, L. (2010). **The impact of the extracellular matrix on inflammation.** *Nature Reviews. Immunology*, 10(10), 712–723.
- Sorrentino, A., Thakur, N., Grimsby, S., Marcusson, A., von Bulow, V., Schuster, N., Zhang, S., Heldin, C.-H., and Landstrom, M. (2008). **The type I TGF-beta receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner.** *Nature Cell Biology*, 10(10), 1199–1207.
- Souza, R. F., Lei, J., Yin, J., Appel, R., Zou, T. T., Zhou, X., Wang, S., Rhyu, M. G., Cymes, K., Chan, O., Park, W. S., Krasna, M. J., Greenwald, B. D., Cottrell, J., Abraham, J. M., Simms, L., Leggett, B., Young, J., Harpaz, N., and Meltzer, S. J. (1997). **A transforming growth factor beta 1 receptor type II mutation in ulcerative colitis-associated neoplasms.** *Gastroenterology*, 112(1), 40–45.
- Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J. P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R. M., McKenzie, N. J., Mebius, R. E., Powrie, F., and Vivier, E. (2013). **Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature.** *Nature Reviews. Immunology*, 13(2), 145–149.
- Spits, H., and Cupedo, T. (2012). **Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function.** *Annual Review of Immunology*, 30, 647–675.
- Surana, N. K., and Kasper, D. L. (2017). **Moving beyond microbiome-wide associations to causal microbe identification.** *Nature*, 552(7684), 244–247.
- Suzuki, K., Meek, B., Doi, Y., Muramatsu, M., Chiba, T., Honjo, T., and Fagarasan, S. (2004). **Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(7), 1981–1986.

- Suzuki, T. (2013). **Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions.** *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 70(4), 631–659.
- Swanson, P. A., Kumar, A., Samarin, S., Vijay-kumar, M., Kundu, K., and Murthy, N. (2011). **Enteric commensal bacteria potentiate epithelial restitution via reactive oxygen species-mediated inactivation of focal adhesion kinase phosphatases.** *Pnas*, 108, 8803–8808.
- Swidsinski, A., Khilkin, M., Kerjaschki, D., Schreiber, S., Ortner, M., Weber, J., and Lochs, H. (1998). **Association between intraepithelial Escherichia coli and colorectal cancer.** *Gastroenterology*, 115(2), 281–286.
- Swidsinski, A., Loening-Baucke, V., Lochs, H., and Hale, L.-P. (2005). **Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: a fluorescence in situ hybridization study in mice.** *World Journal of Gastroenterology*, 11(8), 1131–1140.
- Tachon, S., Lee, B., and Marco, M. L. (2014). **Diet alters probiotic Lactobacillus persistence and function in the intestine.** *Environ Microbiology*, 16(9), 2915–2926.
- Taipale, J., and Beachy, P. A. (2001). **The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer.** *Nature*, 411(6835), 349–354.
- Tait Wojno, E. D., and Artis, D. (2012). **Innate lymphoid cells: Balancing immunity, inflammation, and tissue repair in the intestine.** *Cell Host and Microbe*, 12(4), 445–447.
- Tamoutounour, S., Henri, S., Lelouard, H., de Bovis, B., de Haar, C., van der Woude, C. J., Woltman, A. M., Reyat, Y., Bonnet, D., Sichien, D., Bain, C. C., Mowat, A. M., Reis e Sousa, C., Poulin, L. F., Malissen, B., and Guilliams, M. (2012). **CD64 distinguishes macrophages from dendritic cells in the gut and reveals the Th1-inducing role of mesenteric lymph node macrophages during colitis.** *European Journal of Immunology*, 42(12), 3150–3166.
- Taupin, D. R., Kinoshita, K., and Podolsky, D. K. (2000). **Intestinal trefoil factor confers colonic epithelial resistance to apoptosis.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(2), 799–804.
- Tezuka, H., Abe, Y., Iwata, M., Takeuchi, H., Ishikawa, H., Matsushita, M., Shiohara, T., Akira, S., and Ohteki, T. (2007). **Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cells.** *Nature*, 448(7156), 929–933.
- Taskalova-Hogenova, H., Tuckova, L., Stepankova, R., Hudcovic, T., Palova-Jelinkova, L., Kozakova, H., Rossmann, P., Sanchez, D., Cinova, J., Hrnčíř, T., Kverka, M., Frolova, L., Uhlig, H., Powrie, F., and Bland, P. (2005). **Involvement of innate immunity in the development of inflammatory and autoimmune diseases.** *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1051, 787–798.
- Todorovic, V., Jurukovski, V., Chen, Y., Fontana, L., Dabovic, B., and Rifkin, D. B. (2005). **Latent TGF-beta binding proteins.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(1), 38–41.
- Togo, N., Ohwada, S., Sakurai, S., Toya, H., Sakamoto, I., Yamada, T., Nakano, T., Muroya, K., Takeyoshi, I., Nakajima, T., Sekiya, T., Yamazumi, Y., Nakamura, T., and Akiyama, T. (2008). **Prognostic significance of BMP and activin membrane-bound inhibitor in colorectal cancer.** *World Journal of Gastroenterology*, 14(31), 4880–4888.

Toprak, N. U., Yagci, A., Gulluoglu, B. M., Akin, M. L., Demirkalem, P., Celenk, T., and Soyletir, G. (2006). **A possible role of *Bacteroides fragilis* enterotoxin in the aetiology of colorectal cancer.** *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 12(8), 782–786.

Tramullas, M., Lantero, A., Diaz, A., Morchon, N., Merino, D., Villar, A., Buscher, D., Merino, R., Hurle, J. M., Izpisua-Belmonte, J. C., and Hurle, M. A. (2010). **BAMBI (bone morphogenetic protein and activin membrane-bound inhibitor) reveals the involvement of the transforming growth factor-beta family in pain modulation.** *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(4), 1502–1511.

Travassos, L. H., Carneiro, L. A. M., Ramjeet, M., Hussey, S., Kim, Y.-G., Magalhaes, J. G., Yuan, L., Soares, F., Chea, E., Le Bourhis, L., Boneca, I., Allaoui, A., Jones, N. L., Nunez, G., Girardin, S. E., and Philpott, D. J. (2010). **Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry.** *Nature Immunology*, 11(1), 55–62.

Travis, M. A., Reizis, B., Melton, A. C., Masteller, E., Tang, Q., Proctor, J. M., Wang, Y., Bernstein, X., Huang, X., Reichardt, L. F., Bluestone, J. A., and Sheppard, D. (2007). **Loss of integrin alpha(v)beta8 on dendritic cells causes autoimmunity and colitis in mice.** *Nature*, 449(7160), 361–365.

Tsuji, M., Suzuki, K., Kitamura, H., Maruya, M., Kinoshita, K., Ivanov, I. I., Itoh, K., Littman, D. R., and Fagarasan, S. (2008). **Requirement for Lymphoid Tissue-Inducer Cells in Isolated Follicle Formation and T Cell-Independent Immunoglobulin A Generation in the Gut.** *Immunity*, 29(2), 261–271.

Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunenko, T., Cantarel, B. L., Duncan, A., Ley, R. E., Sogin, M. L., Jones, W. J., Roe, B. A., Affourtit, J. P., Egholm, M., Henrissat, B., Heath, A. C., Knight, R., and Gordon, J. I. (2009). **A core gut microbiome in obese and lean twins.** *Nature*, 457(7228), 480–484.

Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., and Gordon, J. I. (2006). **An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest.** *Nature*, 444(7122), 1027–1031.

Uematsu, S., Fujimoto, K., Jang, M. H., Yang, B.-G., Jung, Y.-J., Nishiyama, M., Sato, S., Tsujimura, T., Yamamoto, M., Yokota, Y., Kiyono, H., Miyasaka, M., Ishii, K. J., and Akira, S. (2008). **Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5.** *Nature Immunology*, 9(7), 769–776.

Uronis, J. M., and Jobin, C. (2009). **Microbes and colorectal cancer: is there a relationship?** *Current Oncology (Toronto, Ont.)*, 16(4), 22–24.

Vaday, G. G., Schor, H., Rahat, M. A., Lahat, N., and Lider, O. (2001). **Transforming growth factor-beta suppresses tumor necrosis factor alpha-induced matrix metalloproteinase-9 expression in monocytes.** *Journal of Leukocyte Biology*, 69(4), 613–621.

Vaishnava, S., Yamamoto, M., Severson, K. M., Ruhn, K. A., Yu, X., Koren, O., Ley, R., Wakeland, E. K., and Hooper, L. V. (2011). **The antibacterial lectin RegIII promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine.** *Science (New York, N.Y.)*, 334(6053), 255–258.

- Valderrama-Carvajal, H., Cocolakis, E., Lacerte, A., Lee, E.-H., Krystal, G., Ali, S., and Lebrun, J.-J. (2002). **Activin/TGF-beta induce apoptosis through Smad-dependent expression of the lipid phosphatase SHIP.** *Nature Cell Biology*, 4(12), 963–969.
- van der Fits, L., Mourits, S., Voerman, J. S. A., Kant, M., Boon, L., Laman, J. D., Cornelissen, F., Mus, A. M., Florencia, E., Prens, E. P., and Lubberts, E. (2009). **Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis.** *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182(9), 5836–5845.
- Van der Flier, L. G., and Clevers, H. (2009). **Stem Cells, Self-Renewal, and Differentiation in the Intestinal Epithelium.** *Annual Review of Physiology*, 71(1), 241–260.
- Van der Sluis, M., De Koning, B. A. E., De Bruijn, A. C. J. M., Velcich, A., Meijerink, J. P. P., Van Goudoever, J. B., Büller, H. A., Dekker, J., Van Seuningen, I., Renes, I. B., Einerhand, A. W. C. (2006). **Muc2-Deficient Mice Spontaneously Develop Colitis, Indicating That MUC2 Is Critical for Colonic Protection.** *Gastroenterology*, 131(1), 117–129.
- Van Kaer, L., Parekh, V. V., and Wu, L. (2011). **Invariant natural killer T cells: bridging innate and adaptive immunity.** *Cell and Tissue Research*, 343(1), 43–55.
- Van Klinken, B. J., Dekker, J., Buller, H. A., and Einerhand, A. W. (1995). **Mucin gene structure and expression: protection vs. adhesion.** *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 269(5), G613 LP-G627.
- van Meeteren, L. A., and ten Dijke, P. (2012). **Regulation of endothelial cell plasticity by TGF-beta.** *Cell and Tissue Research*, 347(1), 177–186.
- Vetrano, S., Correale, C., Borroni, E. M., Pagano, N., Savino, B., Locati, M., Malesci, A., Repici, A., and Danese, S. (2008). **Colifagina, a novel preparation of 8 lysed bacteria ameliorates experimental colitis.** *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 21(2), 401–407.
- Villar, A. V, Garcia, R., Llano, M., Cobo, M., Merino, D., Lantero, A., Tramullas, M., Hurle, J. M., Hurle, M. A., and Nistal, J. F. (2013). **BAMBI (BMP and activin membrane-bound inhibitor) protects the murine heart from pressure-overload biomechanical stress by restraining TGF-beta signaling.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 1832(2), 323–335.
- Vinals, F., and Pouyssegur, J. (2001). **Transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) promotes endothelial cell survival during in vitro angiogenesis via an autocrine mechanism implicating TGF-alpha signaling.** *Molecular and Cellular Biology*, 21(21), 7218–7230.
- Vonarbourg, C., Mortha, A., Bui, V. L., Hernandez, P. P., Kiss, E. A., Hoyler, T., Flach, M., Bengsch, B., Thimme, T., Holscher, C., Honig, M., Pannicke, U., Schwarz, K., Ware, C. E., Finke, D., and Diefenbach, A. (2010). **Regulated expression of nuclear receptor RORgammat confers distinct functional fates to NK cell receptor-expressing RORgammat(+) innate lymphocytes.** *Immunity*, 33(5), 736–751.
- Voorneveld, P. W., Kodach, L. L., Jacobs, R. J., Liv, N., Zonneville, A. C., Hoogenboom, J. P., Biemond, I., Verspaget, H. W., Hommes, D. W., de Rooij, K., van Noesel, C. J. M., Morreau, H., van Wezel, T., Offerhaus, G. H. A., van den Brink, G. R., Peppelenbosch, M. P., Ten Dijke, P., and Hardwick, J. C. H. (2014). **Loss of SMAD4 alters BMP signaling to promote colorectal cancer cell metastasis via activation of Rho and ROCK.** *Gastroenterology*, 147(1), 196–208.e13.

Wakefield, L. M., and Hill, C. S. (2013). **Beyond TGFbeta: roles of other TGFbeta superfamily members in cancer.** *Nature Reviews. Cancer*, 13(5), 328–341.

Walker, A. W., Ince, J., Duncan, S. H., Webster, L. M., Holtrop, G., Ze, X., Brown, D., Stares, M. D., Scott, P., Bergerat, A., Louis, P., McIntosh, F., Johnstone, A. M., Lobley, G. E., Parkhill, J., and Flint, H. J. (2011). **Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota.** *The ISME Journal*, 5(2), 220–230.

Walker, J. A., Barlow, J. L., and McKenzie, A. N. J. (2013). **Innate lymphoid cells--how did we miss them?** *Nature Reviews. Immunology*, 13(2), 75–87.

Wang, C.-Z., Huang, W.-H., Zhang, C.-F., Wan, J.-Y., Wang, Y., Yu, C., Williams, S., He, T.-C., Du, W., Musch, M. W., Chang, E. B., Yuan, C.-S. (2018). **Role of intestinal microbiome in American ginseng-mediated colon cancer prevention in high fat diet-fed AOM/DSS mice [corrected].** *Clinical & Translational Oncology : Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, 20(3), 302–312.

Wang, D., Chen, X., and Zhang, R. (2018). **BAMBI promotes macrophage proliferation and differentiation in gliomas.** *Molecular Medicine Reports*, 17(3), 3960–3966.

Wang, S., Xia, P., Chen, Y., Qu, Y., Xiong, Z., Ye, B., Du, Y., Tian, Y., Yin, Z., Xu, Z., and Fan, Z. (2017). **Regulatory Innate Lymphoid Cells Control Innate Intestinal Inflammation.** *Cell*, 171(1), 201–216.e18.

Wang, T., Li, B. Y., Danielson, P. D., Shah, P. C., Rockwell, S., Lechleider, R. J., Martin, J., Manganaro, T., and Donahoe, P. K. (1996). **The immunophilin FKBP12 functions as a common inhibitor of the TGF beta family type I receptors.** *Cell*, 86(3), 435–444.

Weber, B., Saurer, L., Schenk, M., Dickgreber, N., and Mueller, C. (2011). **CX3CR1 defines functionally distinct intestinal mononuclear phagocyte subsets which maintain their respective functions during homeostatic and inflammatory conditions.** *European Journal of Immunology*, 41(3), 773–779.

Wehkamp, J., Salzman, N. H., Porter, E., Nuding, S., Weichenthal, M., Petras, R. E., Shen, B., Schaeffeler, E., Schwab, M., Linzmeier, R., Feathers, R. W., Chu, H., Lima, H. Jr., Fellermann, K., Ganz, T., Stange, E. F., and Bevins, C. L. (2005). **Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(50), 18129–18134.

Weir, T. L., Manter, D. K., Sheflin, A. M., Barnett, B. A., Heuberger, A. L., and Ryan, E. P. (2013). **Stool microbiome and metabolome differences between colorectal cancer patients and healthy adults.** *PloS One*, 8(8), e70803.

Weiss, A., and Attisano, L. (2013). **The TGFbeta superfamily signaling pathway.** *Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology*, 2(1), 47–63.

Wendland, M., Czeloth, N., Mach, N., Malissen, B., Kremmer, E., Pabst, O., and Forster, R. (2007). **CCR9 is a homing receptor for plasmacytoid dendritic cells to the small intestine.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(15), 6347–6352.

Wenzel, U. A., Jonstrand, C., Hansson, G. C., and Wick, M. J. (2015). **CD103+ CD11b+ Dendritic Cells Induce Th17 T Cells in Muc2-Deficient Mice with Extensively Spread Colitis.** *PloS One*, 10(6), e0130750.

- Wipff, P.-J., and Hinz, B. (2008). **Integrins and the activation of latent transforming growth factor beta1 - an intimate relationship.** *European Journal of Cell Biology*, 87(8–9), 601–615.
- Wipff, P.-J., Rifkin, D. B., Meister, J.-J., and Hinz, B. (2007). **Myofibroblast contraction activates latent TGF-beta1 from the extracellular matrix.** *The Journal of Cell Biology*, 179(6), 1311–1323.
- Wlodarska, M., Thaiss, C. A., Nowarski, R., Henao-Mejia, J., Zhang, J.-P., Brown, E. M., Flankel, G., Levy, M., Katz, M. N., Philbrick, M. N., Elinav, E., Finlay, B. B., and Flavell, R. A. (2014). **NLRP6 inflammasome orchestrates the colonic host-microbial interface by regulating goblet cell mucus secretion.** *Cell*, 156(5), 1045–1059.
- Wlodarska, M., Willing, B., Keeney, K. M., Menendez, A., Bergstrom, K. S., Gill, N., Russell, S. L., Vallance, B. A., and Finlay, B. B. (2011). **Antibiotic treatment alters the colonic mucus layer and predisposes the host to exacerbated *Citrobacter rodentium*-induced colitis.** *Infection and Immunity*, 79(4), 1536–1545.
- Worthington, J. J., Klementowicz, J. E., and Travis, M. A. (2011). **TGFbeta: a sleeping giant awoken by integrins.** *Trends in Biochemical Sciences*, 36(1), 47–54.
- Wrana, J. L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F., and Massague, J. (1994). **Mechanism of activation of the TGF-beta receptor.** *Nature*, 370(6488), 341–347.
- Wu, H.-J., Ivanov, I. I., Darce, J., Hattori, K., Shima, T., Umesaki, Y., ... Mathis, D. (2010). **Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells.** *Immunity*, 32(6), 815–827.
- Wu, M., Wu, Y., Deng, B., Li, J., Cao, H., Qu, Y., Qian, X., and Zhong, G. (2016). **Isoliquiritigenin decreases the incidence of colitis-associated colorectal cancer by modulating the intestinal microbiota.** *Oncotarget*, 7(51), 85318–85331.
- Xu, J., and Gordon, J. I. (2003). **Honor thy symbionts.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(18), 10452–10459.
- Xu, W., He, B., Chiu, A., Chadburn, A., Shan, M., Buldys, M., Ding, A., Knowles, D. M., Santini, P. A., and Cerutti, A. (2007). **Epithelial cells trigger frontline immunoglobulin class switching through a pathway regulated by the inhibitor SLPI.** *Nature Immunology*, 8(3), 294–303.
- Xu, Y., and Pasche, B. (2007). **TGF-beta signaling alterations and susceptibility to colorectal cancer.** *Human Molecular Genetics*, 16 Spec No, R14–20.
- Yamaguchi, K., Shirakabe, K., Shibuya, H., Irie, K., Oishi, I., Ueno, N., Taniguchi, T., Nishida, E., and Matsumoto, K. (1995). **Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction.** *Science (New York, N.Y.)*, 270(5244), 2008–2011.
- Yamashita, M., Fatyol, K., Jin, C., Wang, X., Liu, Z., and Zhang, Y. E. (2008). **TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF-beta.** *Molecular Cell*, 31(6), 918–924.
- Yan, X., Lin, Z., Chen, F., Zhao, X., Chen, H., Ning, Y., and Chen, Y.-G. (2009). **Human BAMBI cooperates with Smad7 to inhibit transforming growth factor-beta signaling.** *The Journal of Biological Chemistry*, 284(44), 30097–30104.

Yan, Y., Kolachala, V., Dalmasso, G., Nguyen, H., Laroui, H., Sitaraman, S. V., and Merlin, D. (2009). **Temporal and Spatial Analysis of Clinical and Molecular Parameters in Dextran Sodium Sulfate Induced Colitis.**

Yanaba, K., Yoshizaki, A., Asano, Y., Kadono, T., Tedder, T. F., and Sato, S. (2011). **IL-10-producing regulatory B10 cells inhibit intestinal injury in a mouse model.** *The American Journal of Pathology*, 178(2), 735–743.

Yang, X., Letterio, J. J., Lechleider, R. J., Chen, L., Hayman, R., Gu, H., Roberts, A. B., and Deng, C. (1999). **Targeted disruption of SMAD3 results in impaired mucosal immunity and diminished T cell responsiveness to TGF-beta.** *The EMBO Journal*, 18(5), 1280–1291.

Yang, X. O., Chang, S. H., Park, H., Nurieva, R., Shah, B., Acero, L., Wang, Y.-H., Schluns, K. S., Broadbush, R. R., Zhu, Z., and Dong, C. (2008). **Regulation of inflammatory responses by IL-17F.** *The Journal of Experimental Medicine*, 205(5), 1063–1075.

Yang, X. O., Pappu, B. P., Nurieva, R., Akimzhanov, A., Kang, H. S., Chung, Y., Ma, L., Shah, B., Panopoulos, A. D., Schluns, K. S., Watowich, S. S., Tian, Q., Jetten, A. M., and Dong, C. (2008). **T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma.** *Immunity*, 28(1), 29–39.

Yang, Z., Fuss, I. J., Watanabe, T., Asano, N., Davey, M. P., Rosenbaum, J. T., Strober, W., and Kitani, A. (2007). **NOD2 transgenic mice exhibit enhanced MDP-mediated down-regulation of TLR2 responses and resistance to colitis induction.** *Gastroenterology*, 133(5), 1510–1521.

Yashiro, M. (2014). **Ulcerative colitis-associated colorectal cancer.** *World Journal of Gastroenterology*, 20(44), 16389–16397.

Ye, J., Lee, J. W., Presley, L. L., Bent, E., Wei, B., Braun, J., Schiller, N. L., Straus, D. S., and Borneman, J. (2008). **Bacteria and bacterial rRNA genes associated with the development of colitis in IL-10(-/-) mice.** *Inflammatory Bowel Diseases*, 14(8), 1041–1050.

Yi, J. Y., Shin, I., and Arteaga, C. L. (2005). **Type I transforming growth factor beta receptor binds to and activates phosphatidylinositol 3-kinase.** *The Journal of Biological Chemistry*, 280(11), 10870–10876.

Younes, H., Coudray, C., Bellanger, J., Demigne, C., Rayssiguier, Y., and Remesy, C. (2001). **Effects of two fermentable carbohydrates (inulin and resistant starch) and their combination on calcium and magnesium balance in rats.** *The British Journal of Nutrition*, 86(4), 479–485.

Yu, Q., and Stamenkovic, I. (2000). **Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis.** *Genes & Development*, 14(2), 163–176.

Yu, W., and Chai, H. (2017). **Inhibition of BAMBI reduces the viability and motility of colon cancer via activating TGF-beta/Smad pathway in vitro and in vivo.** *Oncology Letters*, 14(4), 4793–4799.

Zaki, H., Boyd, K. L., Vogel, P., Kastan, M. B., Lamkanfi, M., and Kanneganti, T.-D. (2010). **The NLRP3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis.** *Immunity*, 32(3), 379–391.

- Zenewicz, L. A., Yancopoulos, G. D., Valenzuela, D. M., Murphy, A. J., Stevens, S., and Flavell, R. A. (2008). **Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease.** *Immunity*, 29(6), 947–957.
- Zeng, H., Ishaq, S. L., Zhao, F.-Q., and Wright, A.-D. G. (2016). **Colonic inflammation accompanies an increase of beta-catenin signaling and Lachnospiraceae /Streptococcaceae bacteria in the hind gut of high-fat diet-fed mice.** *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 35, 30–36.
- Zeng, M. Y., Cisalpino, D., Varadarajan, S., Hellman, J., Warren, H. S., Cascalho, M., Inohara, N., and Nunez, G. (2016). **Gut Microbiota-Induced Immunoglobulin G Controls Systemic Infection by Symbiotic Bacteria and Pathogens.** *Immunity*, 44(3), 647–658.
- Zhang, J.-C., Chen, G., Chen, L., Meng, Z.-J., Xiong, X.-Z., Liu, H.-J., Jin, Y., Tao, X.-N., Wu, J.-H., and Sun, S.-W. (2016). **TGF-beta/BAMBI pathway dysfunction contributes to peripheral Th17/Treg imbalance in chronic obstructive pulmonary disease.** *Scientific Reports*, 6, 31911.
- Zhang, Y.-J., Li, S., Gan, R.-Y., Zhou, T., Xu, D.-P., and Li, H.-B. (2015). **Impacts of gut bacteria on human health and diseases.** *International Journal of Molecular Sciences*, 16(4), 7493–7519.
- Zhang, Y. E. (2009). **Non-Smad pathways in TGF-beta signaling.** *Cell Research*, 19(1), 128–139.
- Zheng, Y., Valdez, P. A., Danilenko, D. M., Hu, Y., Sa, S. M., Gong, Q., Abbas, A. R., Modrusa, Z., Ghilardi, N., de Sauvage, F. J., and Ouyang, W. (2008). **Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens.** *Nature Medicine*, 14(3), 282–289.
- Zhou, L., Park, J., Jang, K. Y., Park, H. S., Wagle, S., Yang, K. H., Lee, K.-B., Park, B.-H., and Kim, J. R. (2013). **The overexpression of BAMBI and its involvement in the growth and invasion of human osteosarcoma cells.** *Oncology Reports*, 30(3), 1315–1322.
- Zigmond, E., Bernshtein, B., Friedlander, G., Walker, C. R., Yona, S., Kim, K.-W., Brenner, O., Krauthgamer, R., Varol, C., Muller, W., and Jung, S. (2014). **Macrophage-restricted interleukin-10 receptor deficiency, but not IL-10 deficiency, causes severe spontaneous colitis.** *Immunity*, 40(5), 720–733.

ANEXO:
Publicaciones del periodo predoctoral

Sanz-Garcia C., Sánchez Á., Contreras-Jurado C., Cales C., Barranquero C., Muñoz M., Merino R. , Escudero P., Sanz M.J., Osada J., Aranda A., Alemany S. *Map3k8 Modulates Monocyte State and Atherogenesis in ApoE^{-/-} Mice.*

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2017 Feb; 37 (2):237-246.

[doi: 10.1161/ATVBAHA.116.308528.](https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.308528)

