



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Resposta T específica contra antígens de la microbiota comensal en la malaltia de Crohn i inhibició de ROR γ t com a estratègia terapèutica

Helena Bassolas Molina

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Facultat de Medicina

Universitat de Barcelona

“Resposta T específica contra antígens de la microbiota comensal en la malaltia de Crohn i inhibició de ROR γ t com a estratègia terapèutica”

Helena Bassolas Molina

Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS)

Departament de Gastroenterologia

Laboratori de Malaltia Inflamatòria Intestinal

Barcelona, Espanya

Tesi Doctoral supervisada per:

Directora/Tutora:

Azucena Salas Martinez, PhD

Tesi per a obtenir el títol en Doctorat en Biomedicina per la Universitat de Barcelona

2018

AGRAÏMENTS

Arriba el final d'aquesta etapa i amb ella l'inici d'aquesta tesi, la secció d'agraïments. Vull donar les gràcies a totes aquelles persones que m'han ajudat de manera directa, ensenyant-me a pipetejar, a pensar i a escriure, però també als qui, sense tenir ni idea de ciència, han sabut fer-me costat en tot moment.

En primer lloc, vull agrair aquesta tesi a l'Azu. Gràcies per la confiança que vas dipositar en mi des del primer dia. Em recordo arribant a la planta 3 del CEK per les escales perquè no vaig trobar l'ascensor de lo nerviosa que estava, i em sembla realment impressionant que decidissis contractar-me. Gràcies per oferir-me fer el TFG, el TFM i la tesi aquí, te debo todo mi currículum académico. Des d'aquell dia tan llunyà fins avui, tu i el teu grup m'heu ajudat a créixer. T'agraeixo molt tots els consells, explicacions i correccions, així com també totes les oportunitats que m'has donat al llarg d'aquests anys, des de tots els congressos als que m'has portat fins a totes les facilitats que m'has donat per iniciar la meva aventura com a profe.

Al Julià, el gran jefe. Des del primer dia que et vaig conèixer he admirat a parts iguals els teus coneixements i la teva modèstia. Agraieixo molt les teves aportacions en tots els lab meetings. Tenim una cursa ciclista pendent!

A les post-docs, gràcies per les vostres ganes d'ensenyar. Isa, gracias por tu espíritu crítico a la hora de corregir el paper, por tu compañía en todos los congresos y por las horas compartidas en tu despacho, estuviéramos escribiendo o hablando de viajes idílicos y de restaurantes gluten-free. Marisol, m'hauria encantat haver coincidit més temps amb tu al lab. Des de que vas arribar vaig notar que ets capaç d'encomanar la teva passió per la ciència a qualsevol. Gràcies per aquest entusiasme i per l'interès i ajuda que has posat en aquest projecte.

A les veus de l'experiència. Míriam, t'he d'agrair que em fessis sentir còmode des del primer dia entre cafès i pipetes. Junes les hem vist de tots colors, des de rebre sangs que no esperàvem fins a sacrificis de ratolins fets en temps rècord. T'agraeixo les hores de feina compartides. Ara queden lluny, però sé que van ser indispensables per la realització d'aquest projecte. Així que ja saps, una part d'aquesta tesi és teva, ja la pots sumar a la teva col·lecció. Montse, mi compañera de pueblo. Gracias por poner orden en este laboratorio desde que llegaste, por tu eficiencia con los envíos y el papeleo, así como también por estar dispuesta a ayudar siempre que ha sido necesario.

Als meus companys de taula, gràcies per aguantar amb tanta calma les meves esbufegades cada cop que el meu ordinador decidia apagar-se. Ana, gràcies per escoltar-me sempre que ho he necessitat, pels trajectes compartits en tren o en bici, per ajudar-me amb els mails in english, pels xiclets i per la teva paciència explicant temes bioinformàtics que semblen impossibles d'entendre. Molts ànims amb la tesi, ja ho tens això! Lluís, tot i que només hem compartit una petita part d'aquest doctorat ja he pogut veure que estàs disposat a donar un cop de mà sempre que cal. Et desitjo molta sort en aquesta nova etapa, estàs en bones mans!

A dos grans fitxatges pel lab i per la meua life. Aida, des del primer dia que et vaig veure vaig pensar que et volia en el nostre equip. L'energia, el sentit de l'humor i la motivació que vaig intuir en tu s'han confirmat i a això s'ha sumat una gran amistat. Gràcies per la confiança que m'has donat i per totes les converses, has estat una peça molt important dins i fora del lab. Alba, una micro muy macro. Eres el claro ejemplo de que en el pot petit hi ha la bona confitura. Me habría encantado compartir más experimentos contigo porque creo que nos entendemos muy bien. Ten claro que tu amor por la inmuno y tus ganas de aprender han hecho que quiera más al RORyt. Espero no tener que echar nunca de menos tus audios.

A l'Elena, iguales pero sin H. La divina i la campesina juntes fins al final. És una sort immensa haver passat aquesta etapa amb tu. Ja sigui estudiant a la biblio, matant ratolins o pelant patates hem après, rigut, patit i gaudit juntes. Tenir-te al costat és estar a casa. Tot i que ja no compartirem mai més campana, espero que ens partim com a mínim un menú cada setmana.

A aquells i aquelles que ja no treballen al lab però que en van formar part durant un període més o menys llarg. A l'Eli, mi madre científica. Gràcies per tot el que em vas ensenyar des d'aquell primer dia on no sabia ni que era un sobrenedant. Amb tu vaig aprendre que la ciència pot ser divertida entre els submarinos, las fiestas de la espuma i el mira que bonito. A més, et vull agrair totes les herències que em vas deixar, en especial el pàrking de la bici, la gradeta color-favorito i les classes de fàrmaco a Manresa. T'agraeixo molt que tornessis a creure en mi. A la Núria, la meua companya de taula durant molt de temps. Ets energia pura i contagies als qui t'envolten de ganes de fer coses, ja sigui posar-se a fer gràfics o anar a pujar muntanyes. Em fa il·lusió acabar la tesi gairebé ahora, espero que gaudeixis molt de la teua nova etapa, jo tornaré a fer-te una visita pel Nord. A la Rut, gràcies per les ganes de fer bé les coses. Es troba a faltar el teu gran sentit de l'humor, el teu ordre i les teves diapos animades. Al Dani, a la Raquel, a la Carol i a la Gina, gràcies a tot el DC team pels consells i pel temps compartit al lab. A la Ciru, gracias por hacerme reír durante el tiempo que estuviste en Barcelona y por demostrarme que existen cirujanos humildes. A Hugo, mi Sinterklass. Cuando me dijeron que vendría un chico de prácticas holandés pensé que sería un coñazo porque tendría que hablar en inglés. Después te conocí y vi que además de ser capaz de aprender un idioma en una semana, eras un tío superxaxi que se convirtió en un amigo para siempre.

També vull donar les gràcies a tot l'equip de clínics, a l'Elena, la Íngrid, l'Ignacio, i a tots els que van i venen per la vostra col·laboració i disposició. Gràcies a la Marta, la Rebeca, l'Àngel i l'Anna per la vostra amabilitat i per totes les extraccions. A la Maica, per fer de pont entre hospital i lab, per portar-me les mostres, ajudar-me a calcular els CDEIs i resoldre'm qualsevol dubte sempre que t'ho he demanat. Gràcies també a tots els pacients que han participat en aquest estudi, ja que sense la seva disposició, aquesta tesi no hagués estat possible.

A tot l'equip de quiròfan, d'anatomia patològica i d'endoscòpia de l'Hospital Clínic, gràcies per la recollida de mostres. Als membres del biobanc, de genòmica i a la plataforma de citometria, gràcies per l'ajuda que m'heu ofert sempre.

A tota la gent amb qui hem fet col·laboracions. A la Clàudia de Bellvitge, a tot l'equip de la Mútua de Terrassa, en especial a l'Anna i l'Eva, així com també al grup de Diabetis, sobretot al Jesús i a l'Albert. Gràcies a tots i totes per la vostra generositat i ganes de fer bé les coses, ha estat un plaer col·laborar amb gent com vosaltres.

A tots els grups que m'heu ajudat en algun moment, en especial als de la planta 3, gràcies pels reactius i cafès compartits al llarg d'aquest temps. Gràcies a Pepa per la teva gran capacitat de trobar sempre solucions per tot i de saber trobar tot el que necessitem dins d'aquell despatx.

A la resta d'amics de l'edifici, al Josep, que m'acompanya des de que no tenia ni un pèl a la barba. Com me n'alegro d'haver compartit tantes etapes amb tu al costat. La teva calma i bondat són tan grans que no cabrien ni en un dels teus tupperes. Y hablando de super tupperes... no me olvido de Ana Carolina, gracias por hacernos ver las cosas de la forma más bonita siempre. A la Marta, gràcies per explicar-me els cotilleos sota el morning sunshine cada vegada que anava a buscar gel i gràcies també per cedir-me la tassa, a partir d'ara ja podràs tornar a prendre cafè. A la Cortés, gràcies per l'energia cedida en els dinars compartits. Ets un dels carregadors més eficaços que conec. A l'Eli, gràcies per tenir sempre un somriure a la cara i al calaix algun trosset de xocolata.

Als tots els amics i amigues d'aquí i d'allà, gràcies per ser-hi sempre.

A l'Helga i a la Roser, les millors compis de pis que em podrien haver tocat. Compartir el 168 amb vosaltres ha suposat també compartir aquesta etapa, i no se m'acut millor companyia amb qui barrejar cafès amb cèl·lules, cerveses amb biòpsies i diapos amb sèries. Gràcies per fer que darrere d'aquella porta la vida fos bonica i gens complicada. Heu sigut arrels i m'heu fet de marge.

A la meva família, als Bassolas i als Molina, perquè no em puc sentir més orgullosa de portar aquests dos cognoms. Gràcies per la vostra preocupació i interès durant tot aquest temps i gràcies per avançar, perquè sé que juntando lo mejor de cada casa, farem un super càtering. A ma cosina Marta, gràcies pel disseny de les portades i per fer cas de les meves manietes amb tanta professionalitat y con tanto arte. Al meu cosí Aleix, perquè de no ser per tu segurament mai m'hauria interessat per la malaltia de Crohn.

Als meus avis, gràcies per ensenyar-me que amb esforç i constància som capaços de tot, molt especialment durant aquests últims mesos.

Als meus pares i al Martí, gràcies per fer-me sentir tan afortunada, per creure en mi sempre i per fer-me costat cada dia des de fa ja més de 10000 dies.

ÍNDEX

ABREVIACIONS	9
INTRODUCCIÓ	13
SECCIÓ I: MALALTIA DE CROHN	15
Malalties inflamatòries intestinals	15
Classificació de la MC	16
Simptomatologia i diagnòstic	18
Epidemiologia	19
Fisiopatologia	20
▪ Factors genètics	21
▪ Factors ambientals	22
▪ Microbiota	24
▪ Sistema immunitari	25
SECCIÓ II: SISTEMA IMMUNITARI A LA MUCOSA	27
Barrera epitelial	27
Teixit limfoide associat a l'intestí	29
▪ GALT organitzat	29
▪ Plaques de Peyer	29
▪ Fòlicles limfoides aïllats	29
▪ Nòduls limfàtics mesentèrics	30
▪ GALT difús	30
Immunitat innata	31
▪ Fagòcits	31
▪ Cèl·lules NK	32
▪ Sistema de complement	33
▪ Limfòcits intraepiteliais	33
▪ Cèl·lules limfoides innates	33
Immunitat adaptativa	35
▪ Limfòcits B	35

▪ Limfòcits T	35
▪ Limfòcits T citotòxics	36
▪ Limfòcits T col·laboradors	36
▪ Limfòcits Th1	37
▪ Limfòcits Th2	38
▪ Limfòcits Th17	38
▪ Limfòcits T reguladors	38
SECCIÓ III: IMPLICACIÓ DELS LIMFÒCITS TH17 A LA MC	40
Descobriments dels limfòcits Th17	40
Diferenciació dels limfòcits Th17	41
Regulació transcripcional de les cèl·lules Th17	43
▪ STAT3	43
▪ ROR γ t	44
Altres factors de transcripció	47
Funció de les cèl·lules Th17	47
Limfòcits Th17 en la inflamació intestinal	49
Plasticitat de les cèl·lules Th17	52
▪ Th1/Th17	52
▪ Treg/Th17	52
Interacció entre les cèl·lules Th17 i la microbiota	54
Cèl·lules del sistema immunitari innat productores d'IL-17	55
▪ Cèl·lules T $\gamma\delta$	55
▪ Cèl·lules NK invariants	56
▪ ILC3	56
SECCIÓ IV: TRACTAMENT DE LA MC I DIANES TERAPÈUTIQUES EMERGENTS	57
Tractaments actuals	57
▪ Corticosteroides	57
▪ Immunosupressors	57
▪ Biològics	58
▪ Anti-TNF- α	58

▪ Vedolizumab	58
▪ Ustekinumab	59
▪ Altres tractaments	59
Teràpies en desenvolupament	59
▪ Inhibidors de les Janus kinasa	59
▪ Inhibidors de la migració leucocitària	60
▪ Oligonucleòtids	60
▪ Fàrmacs que bloquegen les citocines	61
▪ Inhibidors de ROR γ t	63

OBJECTIUS	65
------------------------	-----------

METODOLOGIA	69
--------------------------	-----------

Subjectes d'estudi	71
Aïllament de les cèl·lules mononuclears de sang perifèrica	74
Descripció de l'inhibidor de ROR γ t.....	74
Estimulació de les PBMCs amb antígens de la microbiota intestinal.....	75
Mesura de la proliferació amb timidina tritiada	76
Mesura de la proliferació per dilució de CFSE.....	76
Mesura d'anticossos antimicrobians en sèrum	76
Anàlisi de les citocines en els sobrenedants de les PBMCs.....	77
Marcatge intracel·lular de citocines.....	77
Separació dels limfòcits T CD4 ⁺ específics d'antigen per FACS	78
Aïllament del RNA	79
Anàlisi de les dades transcriptòmiques.....	79
Reacció en cadena de la polimerasa a temps real (RT-PCR)	80
Marcatge de superfície de β 7	80
Aïllament i cultiu de criptes intestinals humanes	80
Obtenció i cultiu de biòpsies intestinals de pacients amb MC.....	82
Model murí de colitis a partir de la transferència de les cèl·lules CD4 ⁺ CD45RB ^{high}	82

Dosificació del compost BI119 en els ratolins.....	83
Anàlisi del teixit intestinal dels ratolins.....	84
Mesurament de la lipocalina en les mostres fecals dels ratolins.....	84
Mesurament de CD14 soluble en el plasma dels ratolins.....	84
Anàlisi estadístic.....	85
RESULTATS	87
ESTUDI I: Els limfòcits T CD4⁺ específics contra antígens de la microbiota comensal exhibeixen un fenotip Th17 proinflamatori en pacients amb MC	89
Els limfòcits T CD4 ⁺ dels pacients amb MC presenten una proliferació augmentada enfront d'antígens de la microbiota comensal	89
Relació entre les respostes de la immunitat adaptativa i les característiques de la MC.....	94
El limfòcits T CD4 ⁺ de pacients amb MC que reaccionen específicament contra FlaX, A4-fla2 i YidX presenten un fenotip proinflamatori Th1 i Th17	95
Els limfòcits T CD4 ⁺ específics pels antígens de la microbiota comensal dels pacients amb MC presenten una signatura transcripcional relacionada amb la població Th17	97
ESTUDI II: Un inhibidor oral del RORγt modula les respostes Th17 en sang i en biòpsies intestinals de pacients amb MC i prevé la malaltia en un model murí de colitis	107
L'expressió dels gens relacionats amb la població Th17 es redueix amb l'ús del BI119.....	107
El BI119 redueix els efectes proinflamatoris de les cèl·lules T CD4 ⁺ específiques d'antígens comensals en criptes intestinals sanes	111
Efecte del BI119 en la mucosa intestinal inflamada de pacients amb MC activa	113
L'ús del BI119 en un model murí de colitis prevé l'aparició de la malaltia.....	116
DISCUSSIÓ	121
ESTUDI I: Els limfòcits T CD4⁺ específics contra antígens de la microbiota comensal exhibeixen un fenotip Th17 proinflamatori en pacients amb MC	123
ESTUDI II: Un inhibidor oral del RORγt modula les respostes Th17 en sang i en biòpsies intestinals de pacients amb MC i prevé la malaltia en un model murí de colitis	129
CONCLUSIONS	135
BIBLIOGRAFIA	139
ANNEX	159

ÍNDIX DE TAULES

Taula 1: Classificació de Montreal per a la MC	18
Taula 2. Descripció dels controls i dels pacients amb MC utilitzats en el primer estudi	71
Taula 3. Descripció dels controls i dels pacients amb MC dels quals es van fer servir les PBMCs per dur a terme el segon estudi	72
Taula 4. Descripció dels pacients amb MC dels quals es van fer servir les biòpsies per dur a terme el segon estudi.....	73
Taula 5. Antígens usats per estimular les PBMCs del primer i segon estudi	75

ÍNDEX DE FIGURES

Figura 1: Diferències entre la malaltia de Crohn i la colitis ulcerosa	16
Figura 2: Fenotips de la MC.....	17
Figura 3: Factors que poden contribuir a l'aparició de la MC	20
Figura 4: Diversitat microbiana a l'intestí d'una persona sana i d'un pacient amb MC	24
Figura 5: Distribució de les cèl·lules epitelials a les criptes intestinals	28
Figura 6: Sistema immunitari intestinal en un estat sa i en un estat inflamatori	30
Figura 7: Presentació antigènica	32
Figura 8: Classificació de les ILCs.....	34
Figura 9: Generació de les diferents subpoblacions de limfòcits T col·laboradors.....	37
Figura 10: Diferenciació dels limfòcits Th17	43
Figura 11: Diferents membres i isoformes de la família del ROR	44
Figura 12: Funcionament dels agonistes i dels agonistes inversos de ROR	46
Figura 13: Plasticitat de les cèl·lules Th17.....	53
Figura 14: Principals cèl·lules productores de IL-17 que pertanyen al sistema immunitari innat.	56
Figura 15: Fàrmacs biològics usats en el tractament actual de la MC i teràpies en desenvolupament	63
Figura 16. Aïllament de les PBMCs.....	74
Figura 17. Marcatge intracel·lular de citocines.....	78
Figura 18. Separació cel·lular per FACS.....	79
Figura 19. Cultiu de les criptes intestinals amb els sobredants	81
Figura 20. Generació del model murí de colitis	83
Figura 21: Resposta exacerbada de les PBMCs dels pacients amb MC contra diferents antígens de la microbiota comensal	90
Figura 22: Major proliferació de les cèl·lules T CD4 ⁺ dels pacients amb MC contra diferents antígens de la microbiota comensal comparada amb la resposta en donants sans	91
Figura 23: Co-ocurrència de la reactivitat de les cèl·lules T CD4 ⁺ enfront dels diferents antígens comensals.....	92

Figura 24: Resposta combinada d'anticossos i limfòcits T CD4 ⁺ a antígens de la microbiota comensal en pacients amb MC	93
Figura 25: Associació d'anticossos específics contra YidX amb les característiques dels pacients	94
Figura 26: Les PBMCs dels pacients amb MC estimulades amb els antígens de la microbiota comensal mostren més secreció d'IFN- γ i d'IL-17.....	95
Figura 27: Les cèl·lules T CD4 ⁺ específiques per FlaX, A4-fla2 i YidX dels pacients amb MC presenten un fenotip proinflamatori Th17/Th1.....	96
Figura 28: Les cèl·lules T CD4 ⁺ de pacients amb MC específiques contra FlaX, A4-fla2 i YidX presenten un perfil transcripcional Th17.....	98
Figura 29. Expressió diferencial dels gens relacionats amb la població Th17 en les cèl·lules T CD4 ⁺ de pacients amb MC específiques pels antígens de la microbiota comensal	99
Figura 30. Els gens relacionats amb la població Th1 i el TNFA s'expressen de forma similar en les cèl·lules T CD4 ⁺ de controls i de pacients	99
Figura 36. Major secreció d'IL-17 de les PBMCs de pacients amb MC estimulades amb els antígens de la microbiota comensal	108
Figura 37. El BI119 és capaç d'inhibir els gens relacionats amb la població Th17 en les PBMCs dels pacients amb MC estimulades amb diferents antígens	109
Figura 38. El BI119 inhibeix la població Th17 en les PBMCs dels pacients amb MC.....	110
Figura 39. La inhibició de ROR γ t en les cèl·lules T CD4 ⁺ activades contra dos antígens de la microbiota comensal redueix l'expressió de les quimiocines que recluten neutròfils i limfòcits Th17 per part de les criptes intestinals.....	112
Figura 40. Expressió diferencial de gens entre les mostres procedents de còlon i d'ili de pacients amb MC activa	114
Figura 41. Expressió gènica en biòpsies intestinals de pacients actius quan es tracten amb BI119	115
Figura 42. Impacte del tractament amb BI119 d'un model murí de colitis basat en la transferència de cèl·lules T CD4 ⁺ CD45 ^{high}	118
Figura 43. Canvis en l'expressió gènica en el model murí de colitis basat en la transferència de cèl·lules T CD4 ⁺ CD45 ^{high}	120
Figura 44: Efecte de les cèl·lules Th17 específiques d'antígens de la microbiota comensal	126
Figura 45: Lloc d'actuació dels mAbs dirigits a inhibir les subunitats p19 o p40	133

AhR	<i>Aryl hydrocarbon receptor</i>
AINEs	Antiinflamatoris no-esteroides
ANCA	Anticossos contra el citoplasma de neutròfils
APCs	Cèl·lules presentadores d'antigen
ASCA	Anticossos anti- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ASCA-Ag	Antigen de l'oligomanà <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
AU	Unitats arbitràries
BATF	<i>Basic Leucine Zipper ATF-Like Transcription Factor</i>
BCR	Receptor de la cèl·lula B
BSA	Albúmina sèrica bovina
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CD	Clúster de diferenciació
CDEIS	Índex de severitat endoscòpica de la MC
Cèl·lules iTreg	Cèl·lules T reguladores induïbles
Cèl·lules NK	Cèl·lules assassines naturals
Cèl·lules Treg	Cèl·lules T reguladores
CFSE	<i>Carboxy fluorescein succinimidyl ester</i>
CIA	Artritis induïda per col·lagen
cm	Centímetre
CU	Colitis ulcerosa
DBD	<i>DNA-binding domain</i>
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DNA	Àcid desoxiribonucleic
DSS	<i>Dextran sulfate sodium</i>
EAE	Encefalomièlitis autoimmune experimental

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Fab	<i>Antigen-binding fragment</i>
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
FBS	Sèrum boví fetal
fdr	<i>False discovery rate</i>
GALT	Teixit limfoide associat a l'intestí
GEO	<i>Gene Expression Omnibus</i>
GM-CSF	Factor estimulant de colònies de macròfags i granulòcits
GWAS	Estudi d'escaneig del genoma
HIF-1	Factor induïble d'hipòxia
HLA	<i>Human leucocyte antigen</i>
H&E	Hematoxilina-eosina
IELs	Limfòcits intraepiteliais
IFNγ	Interferó gamma
Ig	Immunoglobulina
IL	Interleucina
ILCs	Cèl·lules limfoïdes innates
iNKT	Cèl·lules NKT invariants
IRF4	<i>Interferon regulatory factor 4</i>
IU	Unitats internacionals
JAK	Janus kinasa
kg	Kilogram
<i>K. pneumonia</i>	<i>Klebsiella pneumonia</i>
LBD	Domini d'unió al lligand

LPS	Lipopolisacàrid
LTi	Cèl·lules limfoides inductores de teixit
mAbs	Anticossos monoclonals
MadCAM-1	<i>Mucosal addressin cellular adhesion molecule 1</i>
MC	Malaltia de Crohn
MDR1	<i>Multidrug resistance type 1</i>
MFI	Intensitat de fluorescència mitjana
mg	Mil·ligrams
MHC II	Complex major d'histocompatibilitat tipus II
MII	Malalties inflamatòries intestinals
ml	Mil·lilitre
mRNA	RNA missatger
μCi	Microcurie
μg	Micrograms
μM	Micromolar
ng	Nanograms
NCR	Receptor natural citotòxic
NLM	Nòduls limfàtics mesentèrics
NLR	Receptors NOD-like
NOD2	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2</i>
O.D.	Densitat òptica
PAMPs	Patrons moleculars associats a patògens
PBMCs	Cèl·lules mononuclears de sang perifèrica
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Proteïna C reactiva

pg	Picograms
PRRs	Receptors de reconeixement de patrons
PMA	<i>Phorbol myristate acetate</i>
r-IL-17	IL-17 recombinant
r-TNF-α	TNF- α recombinant
RIN	Valor d'integritat del RNA
RNA	Àcid ribonucleic
ROR	Receptor orfe nuclear de l'àcid retinoic
RORE	<i>ROR binding elements</i>
RT-PCR	Reacció en cadena de la polimerasa a temps real
RUNX1	<i>Runt related transcription factor 1</i>
SCID	Immunodeficiència severa combinada
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SFB	Bacteris segmentats filamentosos
SI	Índex d'estimulació
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
TCR	Receptor dels limfòcits T
TGF-β	<i>Transforming growth factor-beta</i>
Th	Limfòcits T col·laboradors
TMB	<i>Tetramethyl benzidine substrate</i>
TNBS	<i>Trinitrobenzene sulfonic acid</i>
TNF-α	Factor de necrosi tumoral alfa
TT	Toxoide tetànic
TYK	Tirosin quinasa
U	Unitats



INTRODUCCIÓ

SECCIÓ I: MALALTIA DE CROHN

Malalties inflammatòries intestinals

La malaltia de Crohn (MC) s'inclou, juntament amb la colitis ulcerosa (CU), dins de les anomenades malalties inflammatòries intestinals (MII). Es tracta de malalties cròniques que es produeixen a causa d'una activació exacerbada del sistema immunitari front a la microbiota comensal¹.

Totes dues malalties cursen en forma de brots o exacerbacions, és a dir, períodes on la malaltia està activa, intercalats amb períodes de remissió, en els que no trobem manifestacions clíniques. No obstant, es tracta de dues malalties diferents, amb característiques clíniques, endoscòpiques i histològiques pròpies i estan associades a diferents factors de risc².

Una de les principals característiques diferencials és que en la MC hi pot haver afectació de qualsevol tram del tracte gastrointestinal, mentre que en la CU la inflamació es limita únicament al còlon. Una altra diferència és que en cas de patir MC, ens trobem davant d'una inflamació en mosaic, és a dir, una afectació que s'estableix de manera discontinua al llarg del tracte. A més, en aquest cas l'afectació és transmural, és a dir que pot afectar totes les capes de l'intestí, des de la mucosa fins a la serosa externa².

Per últim, un dels trets diferencials característic d'aquesta malaltia és la presència d'unes lesions histològiques típiques anomenades granulomes que poden aparèixer a qualsevol capa de la paret intestinal i que consisteixen en cèl·lules multinucleades gegants. En canvi, en la CU observem unes lesions diferents que s'anomenen abscessos i consisteixen en nombrosos neutròfils que es troben infiltrant el lumen de les criptes³.

Les principals característiques diferencials entre aquestes dues malalties es representen de manera esquemàtica a la Figura 1.

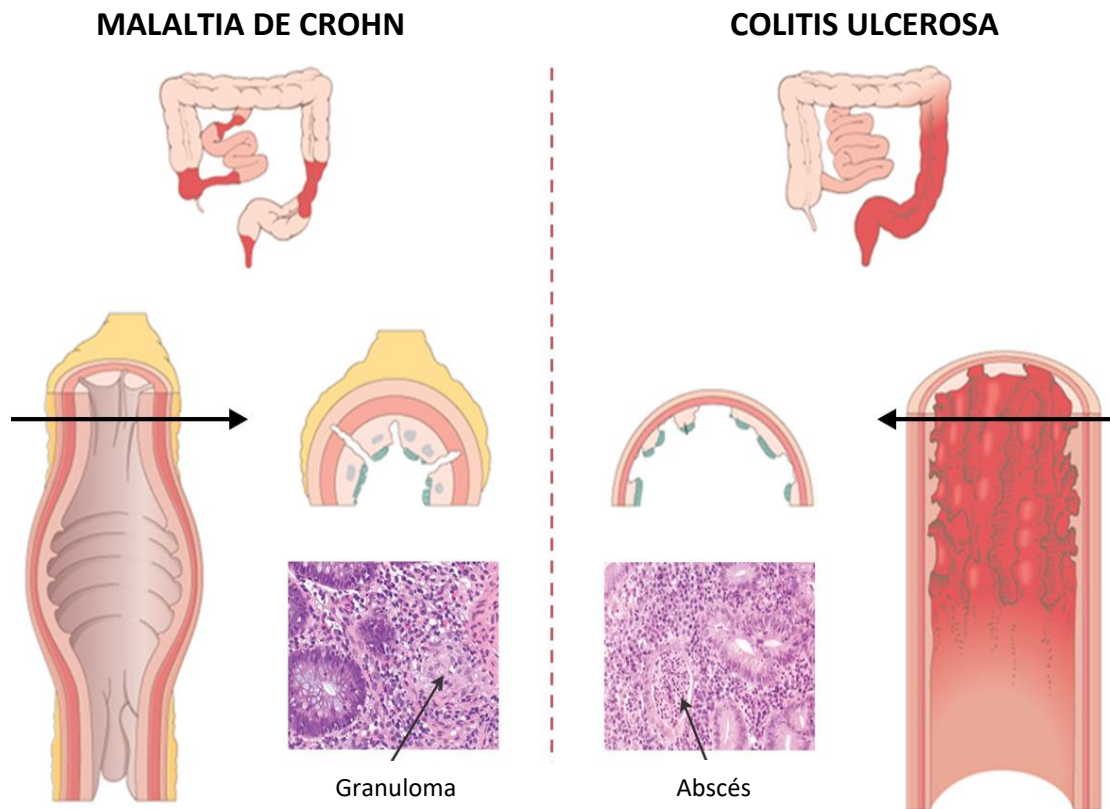


Figura 1: Diferències entre la malaltia de Crohn i la colitis ulcerosa. Esquema on es mostren les característiques diferencials d'aquestes dues MII. Adaptada Robbins Basic Pathology 8th Edition⁴.

Classificació de la MC

La MC va ser descrita l'any 1932 per Oppenheimer, Ginzburg i Crohn, qui li va atorgar el nom⁵. Tot i que inicialment va ser descrita com una patologia ileal, actualment es considera que pot afectar qualsevol part del tracte gastrointestinal, des de la boca fins a l'anus.

No obstant, les zones que trobem afectades habitualment, són el còlon i l'ili i en funció d'això es classifica els malalts segons si tenen inflamació limitada a ili, a còlon o si presenten simultàniament signes d'inflamació a totes dues parts. L'afectació perianal també és bastant comú, essent present en un terç dels pacients⁶.

En canvi, l'afectació de les zones altes és menys comú i normalment s'acompanya també d'afectació intestinal. De fet, menys del 5% dels pacients presenten afectacions aïllades de les zones altes⁷.

A més de classificar els pacients segons la zona afectada, aquests es poden categoritzar segons el comportament de la malaltia, que pot esdevenir únicament inflamatori o pot evolucionar cap a l'aparició de certes complicacions, com poden ser les estenosis, que s'originen quan hi ha un engruiximent de la paret intestinal que dóna lloc a una disminució de la llum del tub digestiu, o les lesions penetrants com serien les fistules⁸. A la Figura 2 es poden veure diferents imatges extretes de colonoscòpies on es mostren aquest tipus de complicacions.

Totes aquestes característiques descrites fan que els pacients amb MC siguin un grup molt heterogeni, difícil d'analitzar i de tractar com a un únic conjunt. És per aquest motiu que resulta molt útil classificar els malalts segons si el fenotip és inflamatori, estenosant o fistulitzant.

De fet, s'ha observat que aquests patrons no són estàtics sinó que evolucionen al llarg dels anys. Per exemple, s'ha vist que la major part de pacients en el moment del diagnòstic tenen un patró inflamatori però al cap dels anys evolucionen cap a formes més agressives, ja siguin penetrants o estenosants⁹.

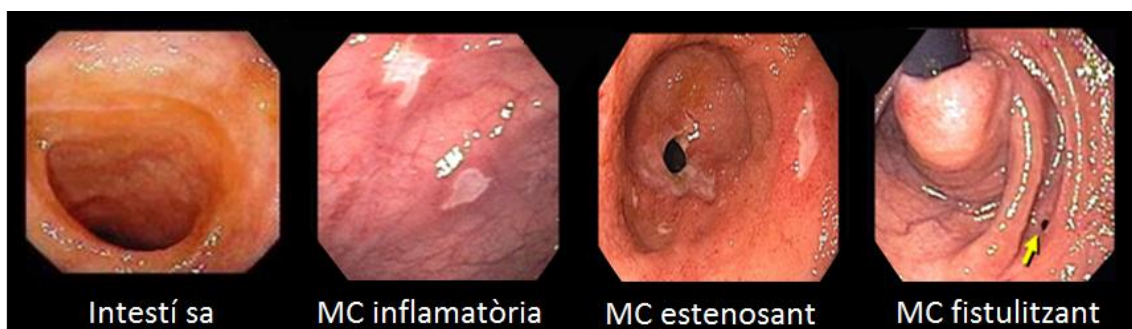


Figura 2: Fenotips de la MC. Imatges de diferents colonoscòpies realitzades en una persona sana i en tres pacients amb MC que presenten diferents fenotips de la MC: inflamatori, estenosant i fistulitzant.

Així doncs, la complexitat de la MC ha obligat a definir patrons de comportament concrets que s'han establert en la classificació de Montreal⁸. En aquesta classificació es tenen en compte diferents paràmetres com són l'edat de diagnòstic (A, Age), el comportament de la malaltia (B, Behaviour) i la localització (L, Location). La classificació de tots aquests paràmetres estan resumits en la Taula 1 i són els que s'han seguit a l'hora de classificar als pacients amb MC que han participat en els estudis que s'han dut a terme per a la realització d'aquest projecte.

<p>Edat al diagnòstic (A):</p> <ul style="list-style-type: none"> • A1: ≤16 anys • A2: 17 a 40 anys • A3: > 40 anys
<p>Patró clínic (B):</p> <ul style="list-style-type: none"> • B1: Inflamatori • B2: Estenosant • B3: Fistulitzant <p>Si, a més, hi ha afectació perianal s'indica amb "p" (B1p; B2p; B3p)</p>
<p>Localització (L):</p> <ul style="list-style-type: none"> • L1: Ili terminal • L2: Còlon • L3: Ileo-còlica • L4: Tracte digestiu superior <p>A més, es poden presentar les següents combinacions: L1+L4; L2+L4; L3+L4</p>

Taula 1: Classificació de Montreal per a la MC⁸.

Simptomatologia i diagnòstic

Els símptomes que apareixen en aquesta malaltia són molt variables i engloben mal de panxa, diarrea, pèrdua de pes, anorèxia, febre, etc. que resulten en un deteriorament de la qualitat de vida¹⁰. De fet, el 40% dels pacients que fa més de 10 anys que es van diagnosticar han estat sotmesos a algun tipus de cirurgia¹¹.

A més dels símptomes que deriven pròpiament d'una afectació intestinal, trobem una sèrie de manifestacions que poden afectar a altres òrgans, com per exemple inflamació en articulacions o complicacions a nivell de la pell, dels ulls, del fetge i de la coagulació sanguínia¹².

Pel que fa al diagnòstic de la malaltia, després d'una exploració exhaustiva del pacient i de valorar la simptomatologia que presenta s'hauran de dur a terme diverses proves. El millor mètode de diagnòstic és l'endoscòpia, ja que aquesta permetrà al metge veure l'estat de la mucosa de les parets i diferenciar-la d'altres malalties intestinals.

Com s'ha dit abans, l'alteració de la mucosa més freqüent en la MC són els canvis en mosaic, amb presència de zones sanes i zones ulcerades alternades i això serà un paràmetre que permetrà als metges fer el diagnòstic diferencial de la malaltia. D'altra banda, un altre mètode diagnòstic útil és la ressonància magnètica, tot i que no s'utilitza tant com l'endoscòpia¹³.

A més, aquestes proves s'acompanyen d'un anàlisi de sang on solen aparèixer diversos factors alterats que estaran relacionats amb la inflamació. Entre ells destaca la leucocitosi, la velocitat de sedimentació globular elevada, l'augment de la proteïna C reactiva (PCR), i l'anèmia¹⁴. També és freqüent trobar anticossos anti-*Sacharomyces cerevisiae* (ASCA) en sèrum, esdevenint una característica útil per tal de diferenciar-la d'altres MII^{14, 15}. Altrament, es pot realitzar un anàlisi de la femta d'aquests pacients, on s'observarà un increment de la calprotectina fecal¹⁴.

Epidemiologia

L'edat d'aparició de la MC té una distribució bimodal. Sol aparèixer entre la segona i la tercera dècada, però hi ha un segon pic entre els 50 i els 60 anys. Pel que fa a la distribució en funció del sexe, veiem que és similar en dones i homes¹⁶. No obstant, cal remarcar que en la MC infantil, trobem molts més casos en nens que en nenes¹⁷.

Si ens fixem en la raça dels pacients veiem una distribució molt diferent. El risc de patir una MII és tres vegades superior en poblacions jueves¹⁸, mentre que els afroamericans i els asiàtics són la ètnia amb menys risc de patir-la¹⁹.

La incidència i la prevalença de la MC són majors en els països desenvolupats i en les àrees urbanes, destacant zones del Nord d'Amèrica i d'Europa²⁰. La incidència anual registrada més elevada va ser de 12.7 per cada 100000 habitants a Europa i de 20.2 per cada 100000 a Nord-Amèrica. La taxa de prevalença representa uns 20 cops la taxa d'incidència²⁰.

S'ha observat que existeix un gradient nord-sud en la incidència de la MC en les latituds de l'hemisferi Nord, de manera que la incidència és més gran en les zones del nord que en les zones del sud^{21, 22}. En canvi, a l'hemisferi sud la relació és inversa²³.

Un fet destacable és que s'ha observat un increment de la incidència paral·lela a la industrialització dels països en via de desenvolupament²⁰.

A més d'aquest fet, és important destacar que les alteracions genètiques que s'havien descrit en poblacions de Nord-Amèrica i Europa, no estan presents en els pacients que viuen en aquestes poblacions emergents²⁴. Conjuntament aquests factors emfatitzen la possibilitat de què l'ambient pot tenir un rol important en l'aparició de la malaltia.

Fisiopatologia

Tot i que l'etiologia concreta de la MC es desconeix, sabem que es tracta d'una malaltia multifactorial, on moltes variables poden estar alterades. La hipòtesi prevalent és que hi ha una desregulació del sistema immunitari front a la microbiota comensal en pacients que són genèticament susceptibles²⁵.

Per tant, cal considerar diversos factors quan s'estudia aquesta malaltia, entre els que destaquen les alteracions genètiques, els factors ambientals, les modificacions en la microbiota i els desordres del sistema immunitari, tant innat com adaptatiu (Figura 3).

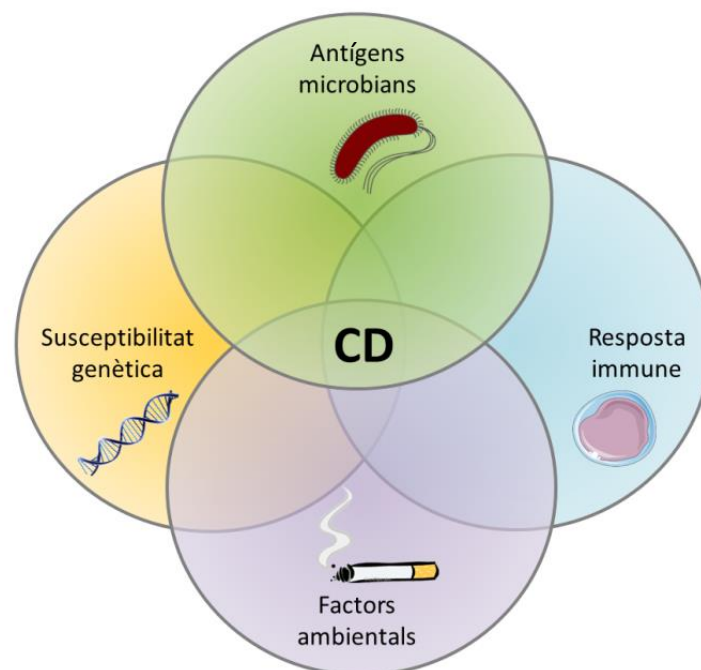


Figura 3: Factors que poden contribuir a l'aparició de la MC. Esquema que mostra els diferents factors que s'han associat a la patogènesi de la MC: alteracions genètiques, factors ambientals, canvis en la microbiota i desordres del sistema immunitari. Modificada de Sartor et al²⁶.

▪ Factors genètics

L'evidència de la importància de la genètica en la patogènesi de la MC deriva d'estudis d'agregació familiar i d'estudis realitzats en bessons. Així doncs, s'ha descrit que entre un 2% i un 14% dels pacients tenen antecedents de MC²⁷.

A més, s'ha definit que el risc relatiu de desenvolupar la MC en un pacient de primer grau està al voltant del 5% en la població no-jueva i del 8% en els pacients jueus²⁸. Estudis de concordança realitzats en bessons han suggerit que existeix un component hereditari ja que si els bessons són monozigòtics la probabilitat de que el segon estigui afectat és del 20-50%, mentre que en bessons dizigòtics és del 10%²⁷.

Diversos estudis han identificat gens candidats gràcies a diverses associacions a loci genètics. El primer gen relacionat amb la MC va ser identificat l'any 2001 i va resultar ser l'associació més important per patir aquesta malaltia^{29, 30}. Es tracta del gen NOD2 (*Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2*), un receptor intracel·lular del muramil dipèptid que és un component de la paret bacteriana. Per tant, veiem que mutacions en aquest gen estaran associades a una detecció alterada dels bacteris i conseqüentment a una resposta inadequada.

L'homozigosi del gen NOD2 està associada amb un increment del risc de la malaltia de 20-40 vegades, mentre que l'heterozigosi confereix un risc només de 2-4 vegades superior²⁹. Clínicament, les mutacions en aquest gen han estat associades amb una malaltia que afecta sobretot a l'ili, així com també amb malalties que mostren fenotips estenosants o fistulitzants i que tenen més risc d'acabar necessitant cirurgia³¹. Cal remarcar que, tal i com es comentava a l'apartat anterior, aquesta mutació no està present en els pacients asiàtics, tot i que el patró clínic sigui molt semblant a la resta de pacients.

Diferents estudis d'escaneig del genoma (els anomenats GWAS) han identificat alteracions en 163 loci diferents³². Altres variants genètiques que ofereixen un risc augmentat de patir la MC també estan relacionades amb funcions del sistema immunitari (TLR4, TNFSF15) i sobretot amb una població de limfòcits anomenada Th17 (IL23R, IL12B, STAT3, AK2, TYK2, etc.) que es presentarà més endavant, ja que és la

població en la que centrarem el nostre projecte. També s'han descrit alteracions en gens relacionats amb l'autofàgia (ATG16L1, IRGM), amb la resposta a l'estrès oxidatiu i amb el manteniment de la integritat de la barrera epitelial.

Tot i que aquestes mutacions han estat relacionades amb la MC, no cal oblidar que es tracta d'una malaltia multifactorial, de manera que moltes vegades les variacions genètiques no són suficients per desencadenar la malaltia. No obstant, una combinació d'aquestes juntament amb canvis en la composició bacteriana intestinal i en el sistema immunitari, podran acabar ocasionant el desenvolupament de la malaltia.

Cal tenir en compte que existeixen individus sans que poden ser portadors dels al·lels de risc associats a la malaltia, de la mateixa manera que molts pacients amb MC poden no presentar cap dels polimorfismes de risc descrits. De fet, tots els polimorfismes de risc descrits fins ara poden explicar tan sols el 25% dels casos.

D'altra banda, és interessant remarcar que, tot i que la majoria de casos de Crohn són causats per una contribució poligènica, s'han descrit al voltant de 50 desordres genètics que han estat associats a una immunopatologia similar a la de la MC. Per simplificar, les malalties ocasionades per aquests desordres es coneixen amb el nom de MII monogènica. Aquests desordres apareixen en edats molt temperanes i s'associen a fenotips molt extrems. Molts d'aquests pacients presenten mutacions en gens relacionats amb la interleucina (IL)-10, una molècula relacionada amb una activitat reguladora o en els seus receptors, IL10RA i IL10RB³³.

Altres estudis realitzats en poblacions pediàtriques mostren mutacions que alteren la barrera epitelial (ADAM17, GUCY2C), els fagòcits (CYBB, NCF1) o els limfòcits B i T (ICOS, RAG2), així com també s'han descrit defectes que indueixen autoinflamació (PLCG2, XIAP)³⁴.

- **Factors ambientals**

S'ha investigat la possible relació entre diversos factors ambientals i la patogènesi de la MC, com per exemple la dieta o l'ús d'antibiòtics, però l'únic factor que ha demostrat estar associat és el tabaquisme. Així, s'ha descrit que el consum de tabac augmenta el

risc de patir la malaltia, de la mateixa manera que l'agreuja, ja que els pacients amb MC que continuen sent fumadors presenten símptomes més severes així com també més recaigudes en comparació amb els pacients que no són fumadors^{35, 36}.

Pel que fa a la dieta, diferents investigacions han intentat establir alguna relació entre dieta i malaltia. Els estudis realitzats apunten a què una dieta rica en sucres i hidrats de carboni però pobre en fibra podria augmentar el risc de patir la malaltia, però no hi ha dades suficients per establir aquesta causalitat^{37, 38}. No obstant, s'han documentat casos en els que petits canvis d'estil de vida milloren la severitat de la malaltia, així que sempre serà un factor a tenir en compte.

D'altra banda, es va intentar establir una relació amb la higiene per tal d'intentar justificar l'increment d'aquestes malalties autoimmunitàries en els països desenvolupats. Diferents estudis semblen donar suport a la teoria de la higiene, ja que la MC s'associa de manera inversa a la mida de la família, a prendre llet sense pasteuritzar i a viure en granges¹⁸. No obstant, la majoria d'aquests estudis tenien un disseny de cas-control i per tant no podem descartar que hi hagi biaixos.

Un altre factor de risc a considerar en el desenvolupament de la MC és el consum de certs fàrmacs com els anticonceptius orals o els antiinflamatoris no-esteroides (AINEs). L'ús prolongat d'anticonceptius orals o les altes dosis d'estrògens semblen augmentar el risc de desenvolupar la MC³⁹, mentre que els AINEs poden promoure l'empitjorament de la malaltia o l'aparició d'un brot⁴⁰.

Per últim, també s'ha investigat la relació que pot tenir amb l'estil de vida. L'estrès pot afectar a la inflamació intestinal a través de diversos mecanismes alterant l'eix hipotàlem-hipòfisi-glàndules adrenals, resultant en l'augment de la inflamació i en l'alteració de la permeabilitat de la paret intestinal⁴¹. En ratolins s'ha vist una clara associació entre l'exposició a estímuls estressants i la reducció de la microbiota⁴², mentre que en humans, estudis observacionals en cohorts àmplies donen suport a l'associació entre estrès i malaltia⁴³. A més, sembla que la MC també s'associa al sedentarisme⁴⁴ i a la son interrompuda⁴⁵, però hi ha poques dades en referència a aquests factors, així que són temes que necessitarien ser analitzats amb més detall.

▪ **Microbiota**

Al tractar-se d'una malaltia intestinal, resulta evident la necessitat d'avaluar el paper que pugui tenir la microbiota que està colonitzant el tracte gastrointestinal en la patogènesi de la malaltia.

Diversos estudis mostren que els pacients amb MC presenten disbiosi, és a dir, una alteració en la composició de la microbiota. En la majoria d'estudis s'observa una reducció de *Faecalibacterium prausnitzii* en pacients amb MC, mentre que sembla que hi ha un increment d'*Escherichia coli* (*E. coli*). Consistent amb això, en el sèrum de pacients amb MII s'han detectat nivells elevats de lipopolisacàrid (LPS) que és un component de la paret cel·lular bacteriana dels bacteris Gram-negatius⁴⁶.

D'altra banda, diversos estudis han demostrat que hi ha menys diversitat microbiana en la femta de pacients amb MC comparada amb la de persones sanes (Figura 4), mostrant una composició de comunitats microbianes més inestables⁴⁷.

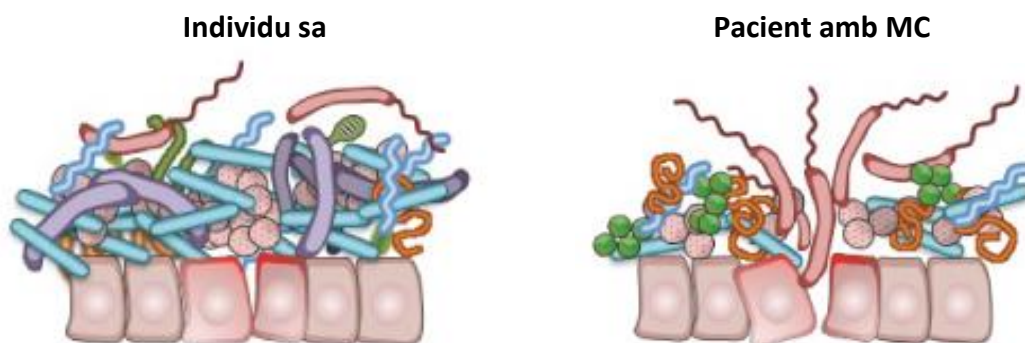


Figura 4: Diversitat microbiana a l'intestí d'una persona sana i d'un pacient amb MC. En aquest dibuix representatiu es mostra com en l'intestí de l'individu sa hi ha més biodiversitat i hi abunden bacteris protectors. En canvi, en l'intestí del pacient amb MC hi ha disbiosi, de manera que la microbiota és menys diversa i hi abunden més patògens oportunistes. Modificada de Nygard et al⁴⁸.

Com s'ha dit, existeix una relació entre l'alteració de la microbiota i la resposta del sistema immunitari contra aquesta. Diferents estudis fets en models animals d'inflamació intestinal donen suport a aquest punt de vista ja que s'ha demostrat que hi ha respostes de les cèl·lules T CD4⁺ dirigides a components de la microbiota entèrica⁴⁹⁻⁵².

En els pacients amb MC, s'han detectat anticossos contra diferents components microbians en sèrum, indicant una resposta del sistema immunitari adquirit

exacerbada. Aquests anticossos es detecten en aproximadament el 50% dels pacients amb MC i reconeixen diferents components microbians com l'antigen de l'oligomanà *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA-Ag)¹⁵ o diverses parts d'*E. coli*, ja sigui una proteïna de la membrana externa anomenada OmpC⁵³ o diversos subtipus de flagelines com A4-fla2, FlaX, FliC o CBir1⁵⁴⁻⁵⁶. La cerca de noves immunoglobulines (Ig) presents en el sèrum de pacients amb MC dirigits contra diferents parts de bacteris ha donat lloc a la identificació de noves proteïnes derivades d'*E. coli* com per exemple YidX, FrvX, Era i GabT⁵⁷.

És important destacar que la seroreactivitat als antígens microbians es correlaciona amb una malaltia més complicada^{58, 59} i això afavoreix la seva possible futura explotació com a predictors del curs de la malaltia^{60, 61}. Tot i que la presència d'anticossos antimicrobians en els pacients amb MC suggereix amb fermesa que també es genera una resposta específica de les cèl·lules T col·laboradores contra aquests components, hi ha poca evidència de la resposta T específica contra antígens concrets en pacients amb MC⁶². De fet, la majoria d'estudis que s'han centrat en analitzar la reactivitat de les cèl·lules T contra la microbiota intestinal, han usat sonicats de bacteris sencers o barreges de proteïnes bacterianes per tal d'estimular les cèl·lules T⁶³⁻⁶⁵. Tot i que aquests estudis mostren que les cèl·lules T d'aquests pacients amb MC reaccionen de manera exacerbada contra els bacteris intestinals, no s'han identificat antígens específics. Més recentment, el grup dirigit per Targan, basant-se en el que s'havia descrit en models animals amb MII, va ser capaç de detectar cèl·lules T reactives contra CBir1 en pacients amb MC⁶².

- **Sistema immunitari**

El sistema immunitari es divideix en sistema immunitari innat i sistema immunitari adaptatiu. La immunitat innata es caracteritza per ser una resposta ràpida i de reconeixement de patrons comuns presents en els agents microbians. Aquestes cèl·lules no tenen capacitat de generar memòria, és a dir, que davant d'un determinat agent respondran sempre de la mateixa manera. Dins d'aquest sistema trobem diferents cèl·lules com els macròfags, les cèl·lules dendrítiques i moltes altres que es comentaran més endavant.

Al contrari del que trobem en la immunitat innata, tenim un tipus de resposta anomenada immunitat adquirida o adaptativa, que es caracteritza per ser més tardana però també per tenir memòria immunitària, és a dir, per presentar la capacitat d'adaptar-se als repetits encontres amb un mateix antigen per tal de generar una resposta més ràpida i potent el segon cop que el reconeix. En aquest grup trobem bàsicament els limfòcits B i T.

En la MC trobem diversos defectes a diferents nivells d'aquest sistema immunitari que s'explicaran detalladament en la segona secció. Breument, cal destacar que s'ha descrit que en la MC hi ha una major permeabilitat de la barrera epitelial que ocasionarà que hi hagi un major contacte entre els antígens luminals i el sistema immunitari resident a la mucosa intestinal⁶⁶.

Conseqüentment, hi haurà una resposta anormal per part d'aquestes cèl·lules i es produiran diferents mediadors inflamatoris que portaran al reclutament i activació d'altres cèl·lules del sistema immunitari innat i adquirit. Aquestes, al seu torn, produiran altres molècules proinflamatòries que acabaran provocant dany al teixit intestinal i així potencialment tindrà lloc l'aparició de la malaltia.

SECCIÓ II: SISTEMA IMMUNITARI A LA MUCOSA

La funció fisiològica de l'intestí consisteix en absorbir nutrients i per això aquest òrgan presenta una superfície mucosa prima i permeable. No obstant, això crea més vulnerabilitat a infeccions, representant la major via d'entrada d'agents infecciosos. És per aquest motiu que l'intestí compta amb el sistema immunitari que serà capaç de limitar l'accés de microorganismes patògens a l'organisme. Paradoxalment, el desenvolupament d'aquest sistema de defensa contra patògens requereix la presència d'una microbiota comensal complexa. Així ho demostren diversos estudis realitzats en animals lliures de gèrmens ja que, en absència de bacteris, aquests ratolins presenten ganglis limfàtics atrofiats, nivells molts baixos d'Ig en sèrum i una gran susceptibilitat a patir infeccions⁶⁷. Tot seguit es descriu la organització d'aquest sistema immunitari present a la mucosa intestinal.

Barrera epitelial

La primera línia de defensa amb la que es troben els bacteris quan intenten penetrar a l'intestí és la barrera epitelial. Aquest epiteli representa una barrera física ja que està format per diverses cèl·lules que s'encarreguen de mantenir la integritat de la barrera mitjançant diferents unions com poden ser les unions gap, els desmosomes, les unions adherents i les unions estretes. En pacients amb MC s'ha documentat la presència de defectes en la barrera epitelial associada a una major permeabilitat intestinal⁶⁶.

A més, aquest epiteli ofereix una protecció química gràcies a la capa de moc que el recobreix. Quan aquesta s'altera, la permeabilitat de la barrera es veu compromesa i el risc de què hi hagi una entrada de bacteris amb la conseqüent resposta inflamatòria és major. De fet, un estudi mostra que l'expressió de la mucina MUC1 és menor en els ilis de pacients amb MC activa en comparació amb els de controls⁶⁸. En línia amb això, diversos estudis utilitzen ratolins MUC2^{-/-} com a model ja que desenvolupen colitis.

Així mateix, certes cèl·lules epitelials tenen la capacitat de secretar pèptids antimicrobians incloent les defensines α i β . Hi ha estudis on es demostra que els pacients que pateixen la MC tenen una menor inducció de defensines β ⁶⁹. També s'ha

associat una menor expressió de defensines α en pacients amb MC que pateixen malaltia ileal⁷⁰.

Les cèl·lules que formen l'epiteli intestinal (Figura 5) són les següents:

- 1) Cèl·lules caliciformes: produeixen el moc que està compost principalment de proteïnes altament glicosilades per impedir l'adherència i invasió de bacteris patògens.
- 2) Cèl·lules enteroendocrines: secreten hormones peptídiques que faciliten la motilitat intestinal.
- 3) Enteròcits: estan especialitzats en l'absorció gràcies a la presència dels microvil·lis que faran que la superfície de contacte amb el lumen sigui més extensa. Existeixen un tipus d'enteròcits que s'anomenen cèl·lules M i estan especialitzades en la captació d'antígens luminals, gràcies a la seva morfologia, ja que en la seva superfície luminal presenten plects enlloc dels microvil·lis característics de la resta d'enteròcits.
- 4) Cèl·lules de Paneth: es troben a la base de les criptes intestinals. Secreten diverses proteïnes antibacterianes, entre elles lisozims i defensines que regularan la microbiota intestinal. Es tracta de cèl·lules mare que es renoven constantment i formen la resta de cèl·lules diferenciades.

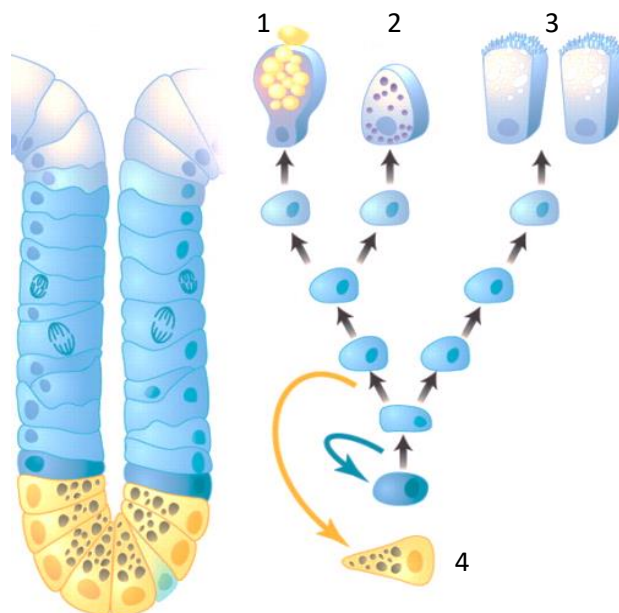


Figura 5: Distribució de les cèl·lules epitelials a les criptes intestinals. Les cèl·lules diferenciades es troben a la part superior de la cripta i es classifiquen en (1) cèl·lules caliciformes, (2) cèl·lules enteroendocrines i (3) enteròcits. En canvi, les cèl·lules mare es troben a la base i s'anomenen (4) cèl·lules de Paneth. Entre les cèl·lules mare (en groc) i les cèl·lules diferenciades (en lila) hi ha una sèrie de cèl·lules que s'anomenen de trànsit (en blau) i es van diferenciant a mesura que es desplacen a la part apical de la cripta, tal i com es representa a l'esquema. Modificada de Radtke et al⁷¹.

Teixit limfoide associat a l'intestí

No obstant, la barrera més efectiva de defensa és la que es troba sota aquestes cèl·lules epitelials i està constituïda pel teixit limfoide associat a l'intestí (GALT). Anatòmicament el GALT es divideix en dos compartiments. D'una banda, hi ha el GALT organitzat, on es troben les plaques de Peyer, els fol·licles limfoïdes aïllats i els ganglis limfàtics mesentèrics, responsables de la inducció de la resposta immunitària. D'altra banda, trobem el GALT difús, que constitueix el lloc efector de la resposta immunitària i que està format pels limfòcits que es troben dispersos al llarg de l'epiteli i pels limfòcits que estan a la làmina pròpia de la mucosa.

- **GALT organitzat**

- **Plaques de Peyer**

Les plaques de Peyer són agregats limfoïdes macroscòpics que es troben en la submucosa al llarg de l'intestí. Les plaques de Peyer madures consisteixen principalment en fol·licles rics en cèl·lules B, que estan envoltats per una àrea interfol·licular rica en cèl·lules T, on hi ha nombroses vècules endotelials altes, que permeten la migració cel·lular i la recirculació limfocítica (Figura 6). Aquestes àrees limfocítiques estan separades de la llum intestinal per una capa de cèl·lules epitelials formades majoritàriament per cèl·lules M. Com s'ha dit, la característica principal d'aquestes cèl·lules és la seva elevada capacitat de transport transepitelial d'antígens. Aquests antígens són captats des de la llum intestinal i són transportats intactes a la zona basolateral, on són alliberats. Just per sota d'aquest epiteli hi ha una zona difusa formada bàsicament per cèl·lules dendrítiques amb una funció principal de captació i presentació d'antígens. Aquesta zona també conté limfòcits T, cèl·lules plasmàtiques, macròfags i cèl·lules B.

- **Fol·licles limfoïdes aïllats**

Són agregats limfoïdes microscòpics que es localitzen a la mucosa intestinal. Aquests fol·licles són estructuralment i funcionalment molt similars als fol·licles que formen les plaques de Peyer i es creu que són un sistema equivalent o complementari d'aquestes.

• **Nòduls limfàtics mesentèrics**

Els nòduls limfàtics mesentèrics (NLM) es localitzen en el mesenteri de l'intestí. Els limfòcits T naïve circulants arriben a aquests ganglis a través de les vènules endotelials altes. En aquest òrgan es dona la presentació antigènica que s'explicarà més endavant.

▪ **GALT difús**

Aquest compartiment té una funció efectora ja que prevé l'entrada de patògens i elimina els microorganismes que han aconseguit entrar. Està format pels limfòcits intraepitelials (IELs), que es troben distribuïts entre les cèl·lules epitelials així com també per les cèl·lules que es troben a la làmina pròpia. La làmina pròpia és la capa de teixit connectiu que hi ha entre l'epiteli i la *muscularis mucosae* i està infiltrada per un gran nombre de cèl·lules immunitàries que s'explicaran amb més detall a continuació.

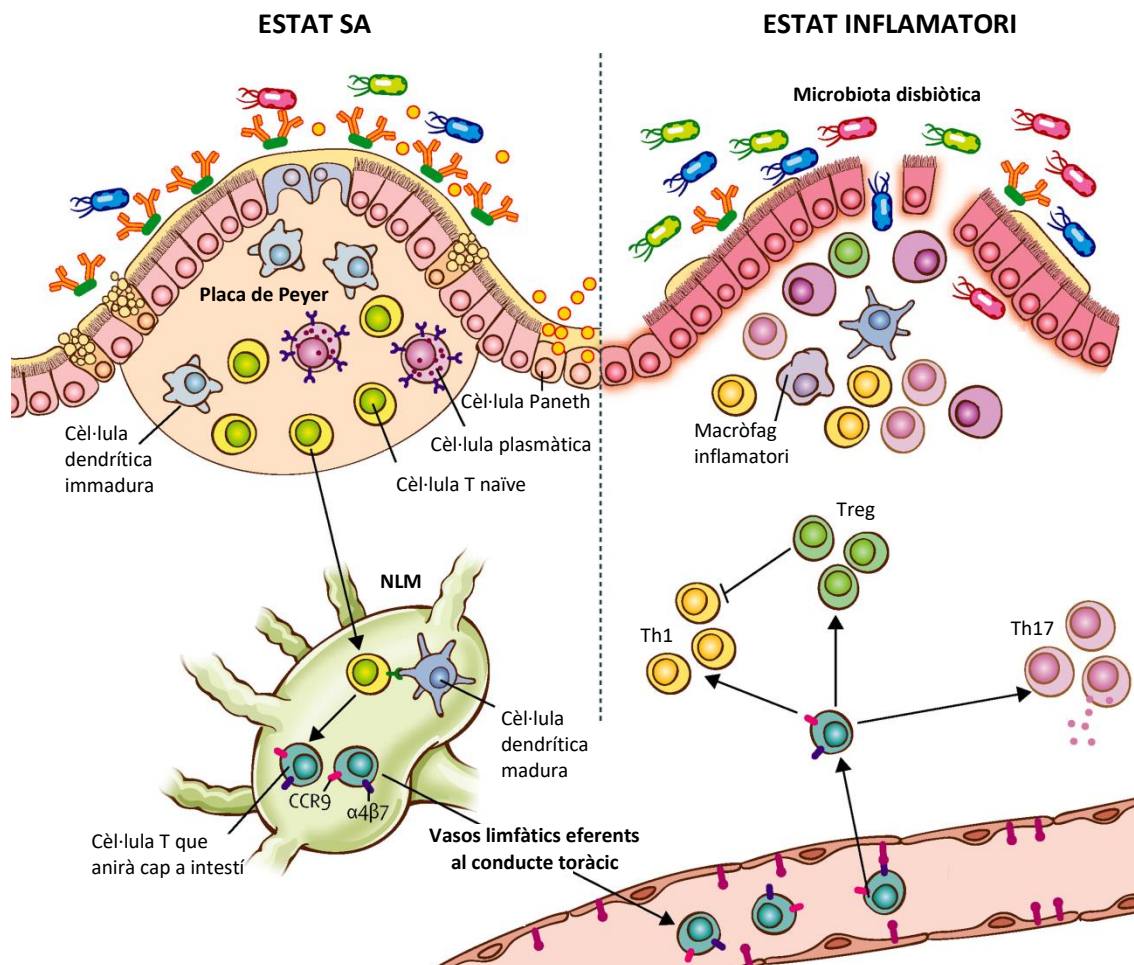


Figura 6: Sistema immunitari intestinal en un estat sa i en un estat inflamatori. Representació de la captació i la presentació antigènica i de la posterior resposta inflamatòria. Adaptada de Torres et al⁷².

Immunitat innata

Així doncs, un cop els agents infecciosos aconseguen superar la barrera epitelial es troben amb una altra línia de defensa que correspon a les cèl·lules del sistema immunitari innat. Dins d'aquestes trobem els neutròfils, els macròfags, les cèl·lules dendrítiques, les cèl·lules assassines naturals (cèl·lules NK), el sistema del complement, els IELs i les cèl·lules limfoides innates (ILCs). Més endavant veurem el rol de cadascuna d'aquestes cèl·lules i la implicació que tenen en la MC. La major part d'aquestes cèl·lules, com s'ha dit anteriorment, se solen situar a les plaques de Peyer, ja que són les zones on hi ha més entrada de microorganismes.

En primer lloc, és molt important que aquestes cèl·lules puguin distingir els components que són propis o innocus dels patògens. El reconeixement de l'antigen es dona gràcies a la interacció d'uns receptors presents en aquestes cèl·lules anomenats receptors de reconeixement de patrons (PRRs) amb uns patrons moleculars associats a patògens (PAMPs) que es troben en els microbis. També hi ha uns PRR intracitoplasmàtics anomenats receptors NOD-like (NLR), encarregats de reconèixer components del peptidoglicà bacterià. Com s'ha comentat abans, mutacions del gen NOD2 s'han associat a la susceptibilitat de patir MC^{29, 30}. Altres dèficits originats en la detecció microbiana, així com també defectes en la integritat de la barrera intestinal o errors en els processos d'autofàgia també poden propiciar l'aparició de la MC.

A continuació, es fa un breu apunt sobre el rol que pot jugar cadascun dels components de la immunitat innata en la patogènesi de la MC.

- **Fagòcits**

Els neutròfils són molt importants en la inflamació aguda, ja que són les cèl·lules que arribaran abans al lloc on s'ha produït una infecció. Durant molt de temps van ser considerats un dels tipus cel·lulars més importants en el desenvolupament de la MC. De fet, s'han descrit molts defectes associats a neutròfils en pacients amb MC que s'han relacionat amb la migració d'aquestes cèl·lules cap al lloc d'infecció així com també amb la seva funció bactericida⁷³.

Dins dels fagòcits, a més dels neutròfils, trobem dos tipus cel·lulars més que inclouen els macròfags i les cèl·lules dendrítiques. Aquests tres tipus cel·lulars reconeixen els agents infecciosos a través dels PRRs per tal de poder-los fagocitar posteriorment. A més, produeixen una sèrie de molècules conegudes amb el nom de citocines i quimiocines que activaran i reclutaran altres cèl·lules per tal d'amplificar la resposta.

D'altra banda, els macròfags i les cèl·lules dendrítiques tenen una altra funció molt important que consisteix en processar aquests microbis i presentar-los com a antígens als limfòcits T a través d'unes molècules del complex major d'histocompatibilitat (MHC) anomenades HLA (*human leucocyte antigen*). Gràcies a aquesta funció, aquestes cèl·lules s'anomenen cèl·lules presentadores d'antigen (APCs) (Figura 7).

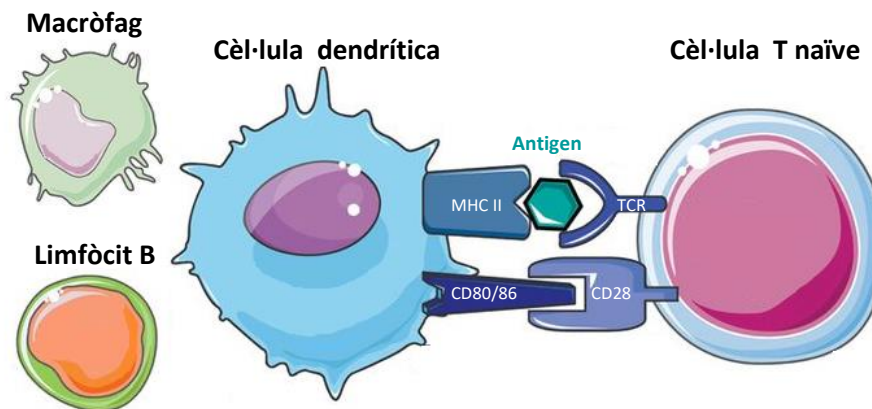


Figura 7: Presentació antigènica. Les APCs professionals són les cèl·lules dendrítiques, els macròfags i els limfòcits B. Aquestes cèl·lules capten l'antigen, el processen i l'expressen a la seva superfície a través de les molècules del MHC de classe II. Gràcies al reconeixement d'aquestes MHC i de l'antigen, així com també d'altres molècules co-estimuladores, els limfòcits T hi poden interaccionar i induir una resposta. Modificada de Idris-Khodja et al⁷⁴.

- **Cèl·lules NK**

Aquestes cèl·lules tenen activitat citotòxica contra cèl·lules tumorals i cèl·lules infectades per determinats virus. A més, tenen la capacitat de secretar una citocina proinflamatòria molt important que s'anomena interferó (IFN)- γ , que posteriorment activarà la funció bactericida dels fagòcits. Hi ha diversos estudis que associen una major proporció de cèl·lules NK a la lamina pròpia de pacients amb MC⁷⁵. Així mateix, s'ha observat una disminució en el nombre d'aquestes cèl·lules quan els pacients són sotmesos a tractament⁷⁶.

- **Sistema de complement**

Aquestes molècules s'encarreguen de reconèixer patrons conservats dels microbis per tal de procedir a la seva lisi. Altres funcions efectores del sistema del complement són l'opsonització dels microbis per facilitar-ne la posterior fagocitosi i l'amplificació de la senyal d'inflamació mitjançada pels fragments resultants de la proteòlisi de diverses proteïnes del complement (C5a, C3a, etc.) per reclutar noves cèl·lules efectores.

- **Limfòcits intraepiteliais**

Són un conjunt de cèl·lules efectores que es troben situades entre els enteròcits. Aquestes cèl·lules són diferents de la població limfocítica de la circulació sistèmica i dels limfòcits de la làmina pròpia. Malgrat que la funció d'aquestes cèl·lules no està clarament determinada, es creu que actuen principalment com a cèl·lules citotòxiques proporcionant una primera línia de defensa enfront de patògens a través de l'eliminació de cèl·lules epitelials infectades. Una particularitat que mostren els IELs és que poden respondre a diferents antígens bacterians sense requerir-ne la seva presentació, fet que suggereix que aquestes cèl·lules estan implicades en la defensa innata. Els IELs també contribueixen a la reparació del teixit i a la regeneració cel·lular després de la resolució de la resposta immunitària, mitjançant la producció de citocines i factors de creixement.

- **Cèl·lules limfoides innates**

Les ILCs es troben principalment a les mucoses i ofereixen immunitat protectora a l'hoste en aquests teixits. Aquestes cèl·lules pertanyen al llinatge limfoide però no presenten receptors específics per l'antigen. Es caracteritzen per expressar el clúster de diferenciació (CD)127 (receptor de la IL-7) i es divideixen en 3 grups en funció de les citocines que produeixen i dels factors de transcripció que les regulen (Figura 8).

Les ILC1 estan regulades per T-bet i produeixen IFN- γ i el factor de necrosi tumoral (TNF)- α , mentre que les ILC2 expressen GATA3 i produeixen IL-4, IL-5 i IL-13. Per últim, trobem les ILC3, la població que més abunda a l'intestí. Aquestes cèl·lules estan regulades pel receptor orfe nuclear de l'àcid retinoic (ROR γ t) i es classifiquen en 3

poblacions diferents (Figura 8). D'una banda trobem les cèl·lules limfoides inductores de teixit (LTi) que expressen CCR6 i són les responsables de la inducció dels teixits limfoides secundaris durant el desenvolupament^{77, 78}. D'altra banda, trobem les ILC3 que s'expandeixen postnatalment en resposta a senyals derivades de la microbiota⁷⁹⁻⁸² i perden l'expressió de CCR6⁸³. Dins d'aquestes cèl·lules trobem un grup que expressa el receptor natural citotòxic (NCR) anomenat NKp44 en humans i NKp46 en ratolins. Aquestes cèl·lules únicament produeixen IL-22 que serà important en la tolerància front als bacteris comensals i en el manteniment de la barrera intestinal^{84, 85}. En condicions normals les ILC3s NCR⁺ representen el 70% del total d'ILCs de la mucosa intestinal. Per últim, trobem les ILC3s NCR⁻ que representen el 15% del total d'ILCs^{86, 87} i produeixen IL-17A, IL22 i TNF- α .

Recentment les ILCs s'han implicat en la patogènesi de la MC ja que s'han descrit alteracions en el nombre d'aquestes cèl·lules⁸⁸. S'ha documentat que les ILC3s NCR⁻ estan incrementades en l'ili i en el còlon dels pacients amb MC⁸⁹. També s'ha trobat un increment de les ILC1 a la mucosa intestinal dels pacients amb MC, passant de representar un 10% a un 40% del total d'ILCs^{86, 87, 90}. A més, aquest increment es relaciona amb la severitat de la malaltia⁹¹. Aquest augment de les ILC1 s'acompanya d'una disminució de les ILC3 NCR⁺, que passen de representar un 70% del total a ser només un 20%^{75, 87}. Cal destacar que s'ha demostrat que les ILC3s es poden diferenciar a ILC1 en presència d'IL-12, tot i que aquesta diferenciació és reversible⁸⁶.

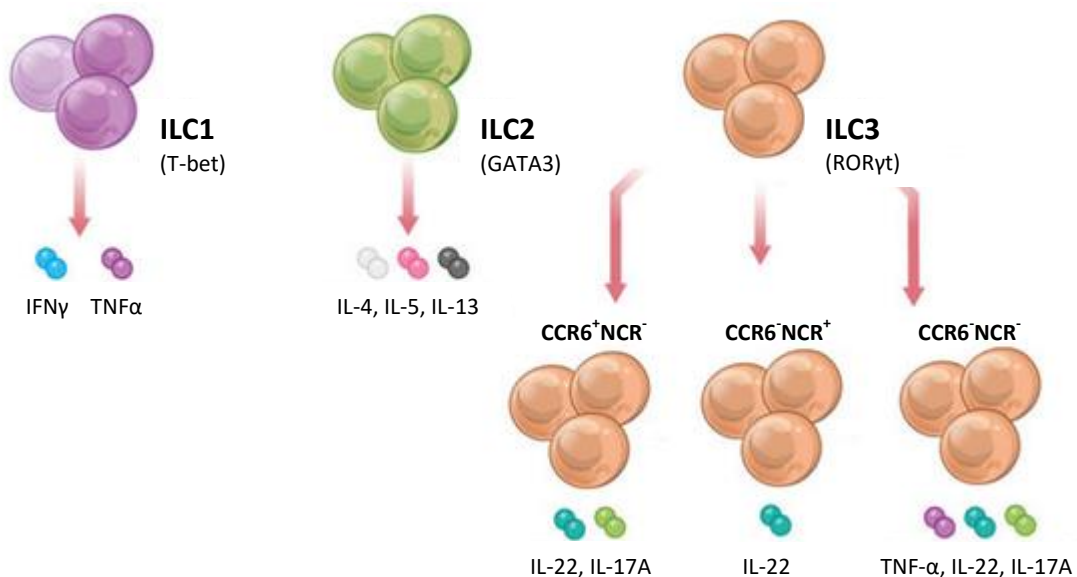


Figura 8: Classificació de les ILCs. Les ILCs es classifiquen en ILC1, ILC2 i ILC3. Modificada de Artis et al⁹².

Immunitat adaptativa

El sistema immunitari adaptatiu o adquirit, com s'ha dit, esdevé una resposta més tardana però més específica, ja que presenta la capacitat de respondre a un repertori molt més ampli d'antígens i, a més, presenta memòria immunitària. S'ha descrit que aquest sistema té un rol central en el procés inflamatori implicat en la patogènesi de la MC. Els components principals de la immunitat adaptativa són els limfòcits B i els limfòcits T, que alhora es divideixen en limfòcits T col·laboradors i limfòcits T citotòxics. A continuació es descriuen les principals implicacions d'aquests tipus cel·lulars en la patogènesi de la MC.

▪ **Limfòcits B**

Són els efectors de la immunitat coneguda amb el nom d'humoral. Reconeixen els antígens mitjançant el receptor de la cèl·lula B (BCR) i es caracteritzen per la producció d'anticossos solubles i de membrana. Els limfòcits B a l'intestí es troben localitzats principalment en els fol·licles limfoides i en els NLM i posteriorment es diferencien a cèl·lules plasmàtiques que migren a la làmina pròpia i secreten predominantment IgA. S'han descrit respostes anormals dels limfòcits B en pacients amb MC, que inclouen nombres elevats de cèl·lules secretores d'Ig⁹³, així com també la presència d'ASCA i d'anticossos contra el citoplasma de neutròfils (ANCA)^{94,61}. Aquestes cèl·lules també són APCs professionals, i tenen la capacitat de produir citocines, de manera que poden regular les respostes de les cèl·lules T, que seran molt importants en la patogènesi de la MC⁹⁵. No obstant, no està del tot clar quina influència poden tenir aquests limfòcits B en l'activitat de la MC, degut a que estudis en models murins han documentat resultats ambigus, recolzant tant un paper regulador com un d'inflamatori en la inflamació intestinal⁹⁶.

▪ **Limfòcits T**

Són els efectors de la immunitat cel·lular. El receptor dels limfòcits T (TCR) només reconeix l'antigen quan es presenta a través d'una molècula de MHC. Aquestes cèl·lules es classifiquen en limfòcits T citotòxics i limfòcits T col·laboradors (Th).

- **Limfòcits T citotòxics**

També s'anomenen limfòcits T CD8⁺ perquè expressen aquesta proteïna a la seva superfície. Aquests limfòcits són importants en l'eliminació de cèl·lules del propi organisme infectades per virus i altres patògens intracel·lulars. A través del seu TCR reconeixen complexos antígen-MHC I que estaran situats a la superfície de la cèl·lula diana que posteriorment lisarà.

- **Limfòcits T col·laboradors**

Els limfòcits T col·laboradors també s'anomenen limfòcits T CD4⁺ ja que expressen aquest co-receptor del TCR a la seva superfície. Aquests limfòcits ocupen un paper central en el sistema immunitari regulant l'activitat d'altres cèl·lules (macròfags, limfòcits B i limfòcits T citotòxics, entre altres) mitjançant la secreció de citocines.

Molts grups que investiguen la MC centren els seus estudis en aquestes cèl·lules degut a la clara implicació que tenen en la malaltia. Una de les evidències que recolzen la seva importància en la MC és l'acumulació d'aquests limfòcits T CD4⁺ en animals que presenten colitis⁹⁷ i en pacients amb MC^{98, 99}. D'altra banda, cal destacar que amb la transferència de diferents subgrups d'aquestes cèl·lules en ratolins immunodeficients podem ser capaços de transferir la malaltia¹⁰⁰.

Els limfòcits T col·laboradors reconeixen l'antigen presentat pel complex MHC II present a la superfície de les APCs. Davant un determinat agent infecciós, el limfòcit T CD4⁺ pot respondre de diferents maneres en funció de quin sigui el mecanisme efector més eficaç per eliminar-lo. La responsabilitat d'aquesta decisió recau en les citocines produïdes per les pròpies APCs que induiran una o altra població. Així, segons quins siguin els PAMPs reconeguts a través dels PRRs de les cèl·lules del sistema immunitari innat es produiran un tipus o altre de citocines que portaran a les cèl·lules T a patir un procés de diferenciació complex, generant diferents subtipus cel·lulars.

Així doncs, les cèl·lules T CD4⁺ naïve en activar-se de forma específica enfront d'un antígen, es poden diferenciar a Th1, Th2, Th17 o limfòcits T reguladors (Treg) a través d'aquest procés controlat per les diferents citocines produïdes per les APCs (Figura 9).

No obstant, cal tenir en compte que les cèl·lules T col·laboradores presenten la propietat de ser flexibles i plàstiques i això els hi atorga la capacitat de poder convertir-se a un altre llinatge en funció del microambient on es trobin un cop ja s'han diferenciat. Aquesta diferenciació ha d'estar altament regulada, ja que un desenvolupament anormal d'una d'aquestes subpoblacions pot acabar originant una resposta immunitària específica contra antígens exacerbada o inadequada.

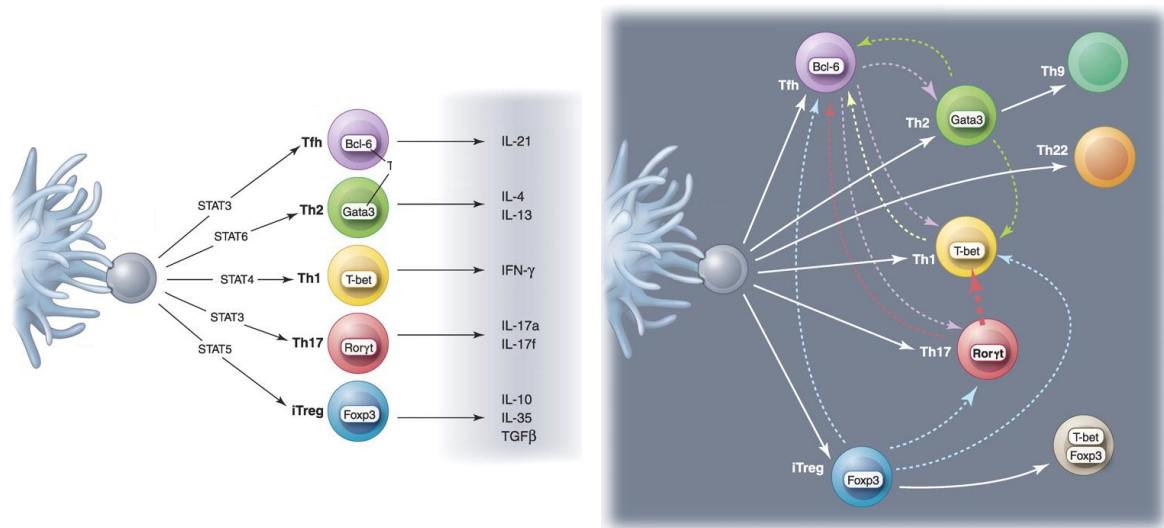


Figura 9: Generació de les diferents subpoblacions de limfòcits T col·laboradors. A l'esquerra es mostren els limfòcits Th1, Th2, Th17 i Treg, així com també els seus factors de transcripció i les principals citocines que produeixen. A la dreta es pot observar que aquestes cèl·lules presenten flexibilitat i plasticitat i poden canviar d'una població a altra. Adaptada de O'Shea et al.¹⁰¹.

• Limfòcits Th1

La producció d'IL-12 per part de les APCs portarà a la diferenciació dels limfòcits T naïve cap al llinatge Th1. Aquests limfòcits expressen el factor de transcripció T-bet¹⁰² i produeixen fonamentalment IFN-γ i TNF-α¹⁰³, defensant a l'organisme de patògens intracel·lulars i extracel·lulars. Tot i la seva funció protectora, aquests limfòcits han estat relacionats amb la MC ja que la inflamació intestinal observada en els pacients s'ha relacionat amb nivells elevats d'IL-12 a la mucosa¹⁰⁴. Una altra observació que dona suport a això és que les cèl·lules T de la mucosa de pacients amb MC secreten més IFN-γ que les de les persones sanes^{105, 106}. Aquestes citocines proinflamàtores secretades pels limfòcits Th1 promouen l'activació de la funció fagocítica i bactericida dels macròfags així com també la producció d'IgG per part dels limfòcits B. A més, aquestes citocines promouen l'apoptosi de les cèl·lules epitelials.

- **Limfòcits Th2**

La principal citocina inductora d'aquesta població és la IL-4 i el factor de transcripció que promou el seu programa de diferenciació és el GATA3¹⁰⁷. La població Th2 s'activa davant de paràsits extracel·lulars no fagocitables i els destrueix mitjançant la producció d'IL-4, IL-5 i IL-13 que promouran l'activació d'eosinòfils i mastòcits i la producció d'IgE. S'ha descrit que l'activació d'aquests limfòcits es dona sobretot en al·lèrgies. En canvi, l'activació d'aquest llinatge no s'ha associat a la patogènesi de la MC.

- **Limfòcits Th17**

Durant molts anys es va assumir que la MC era mediada pels limfòcits Th1, mentre que la CU era mediada pels limfòcits Th2. Aquest paradigma va canviar dècades més tard, gràcies al descobriment d'una nova població anomenada Th17. Aquesta població ha estat molt relacionada amb la patogènesi de la MC i degut a la seva importància en el nostre estudi, aquestes cèl·lules es descriuran més detalladament en la següent secció.

- **Limfòcits T reguladors**

Per últim, els limfòcits Treg expressen FoxP3¹⁰⁸ i es formen gràcies a la producció de TGF- β (*transforming growth factor-beta*) per part de les APCs. Aquestes cèl·lules són especialment abundants a les mucoses, on ajuden a mantenir la homeòstasi, produint citocines antiinflamatòries com la IL-10 i el TGF- β que són supressores de la resposta immunitària.

Les cèl·lules Treg es classifiquen en cèl·lules Treg naturals si s'originen al timus o en cèl·lules Treg induïdes (iTreg) si s'originen a la perifèria sota condicions específiques per controlar la resposta inflamatòria gràcies a la secreció de citocines antiinflamatòries com la IL-10^{109, 110}.

La secreció d'aquestes citocines a la mucosa intestinal contribueix a la generació d'un ambient de tolerància, prevenint l'activació de les cèl·lules T efectores. En el context de la MC, s'ha intentat relacionar una desregulació de l'activitat antiinflamatòria amb el desenvolupament de la malaltia. S'ha observat que mutacions en la IL10 i en el IL10R donen lloc a funcions aberrants d'aquest tipus cel·lular i causen una MC monogènica³³.

D'altra banda, alguns estudis han demostrat en models animals de MII que les cèl·lules Treg poden suprimir la inflamació intestinal i per aquest motiu se'ls hi ha associat un efecte anti-colitogènic¹⁰⁰. A més, s'ha relacionat l'ablació de les cèl·lules Treg o la senyal defectuosa de TGF- β amb un augment de la progressió de la colitis. De fet, el model murí que fem servir en aquest estudi, es basa en que la transferència de cèl·lules T naïve en un ratolí immunodeficient provoca colitis però, en canvi, si aquestes s'administren conjuntament amb cèl·lules Treg, aquesta inflamació intestinal no es produeix¹⁰⁰.

Tot i aquestes evidències prèvies, existeixen inconsistències pel que fa al nombre d'aquestes cèl·lules a la MC. Un estudi mostra que hi ha menys quantitat de cèl·lules Treg en la sang de pacients amb MC que en donants sans però en canvi, en aquest mateix estudi es troba una expressió de FoxP3 elevada en la mucosa d'aquests mateixos pacients¹¹¹. D'altra banda, també trobem divergències pel que fa als nivells de IL-10 en el sèrum dels pacients amb MC. En alguns estudis s'observen concentracions més elevades d'aquesta citocina en el sèrum dels pacients amb MC^{112, 113}, mentre que un altre reporta que no hi ha diferències¹¹⁴.

Així doncs, la literatura existent fins a l'actualitat que ha intentat establir una relació entre les cèl·lules Treg i la MC es decanta per una pèrdua de resposta de les cèl·lules T efectores front a l'acció de les cèl·lules Treg en lloc d'una alteració en la funció o abundància d'aquestes.

SECCIÓ III: IMPLICACIÓ DELS LIMFÒCITS TH17 A LA MC

Descobriments dels limfòcits Th17

Els primers estudis que van suggerir l'existència de les cèl·lules Th17 es van publicar l'any 1999, i estaven realitzats en pacients amb artritis reumatoide i inflamació cutània¹¹⁵. Un any més tard, es va realitzar un experiment crític per al futur descobriment de les cèl·lules Th17, ja que Oppmann et al. van descobrir que una subunitat de la IL-12 anomenada p40, era també un component de la IL-23. Així, mentre que la IL-12 estava formada per les subunitats p40 i p35, la IL-23 estava constituïda per les subunitats p40 i p19¹¹⁶. Així doncs, es van haver de realitzar nous estudis per determinar si les respostes Th1 (induïdes per p40) que havien estat considerades com el factor patogènic causant de moltes malalties autoimmunitàries, eren realment les culpables.

Així doncs, el grup de Cua et al. va voler determinar si el dèficit d'IL-12 era realment el causant d'un model murí que presentava artritis induïda per col·lagen (CIA), tal com s'havia descrit anteriorment. Per tal d'abordar aquesta pregunta, van generar ratolins deficients per cadascuna de les tres subunitats (IL-12 p35^{-/-}, IL-12/IL-23 p40^{-/-} i IL-23 p19^{-/-}) i van induir un model de CIA. Els resultats obtinguts van demostrar que els ratolins deficients per la subunitat IL-12/IL-23 p40 o per la IL-23 p19 estaven protegits contra la CIA mentre que els ratolins que no tenien la IL-12 p35 mostraven un grau de malaltia molt similar als ratolins wild-type¹¹⁷. Així, es va poder concloure que la IL-23, i no la IL-12, era la citocina que jugava un rol crític en el desenvolupament d'aquesta malaltia autoimmunitària.

Temps més tard, un estudi realitzat per aquest mateix grup, va demostrar que la IL-23 induïa la producció de la IL-17¹¹⁸. Així, Langrish et al. van descriure per primera vegada les cèl·lules Th17 com a un nou subtipus efector de cèl·lules T col·laboradores¹¹⁸. Aquests investigadors van descobrir que els limfòcits Th17 eren capaços de transferir encefalomièlitis autoimmunitària experimental (EAE) amb més efectivitat que els limfòcits Th1. Hi va haver tres línies d'evidència que donaven suport a l'existència d'aquesta

nova població. En primer lloc, es va esbrinar que les cèl·lules T proinflamàtòries que esdevenien patogèniques produïen grans quantitats d'IL-17A, IL-17F i TNF- α i que la seva expansió depenia d'IL-23, enlloc d'IL-12¹¹⁸. En segon lloc, les cèl·lules T CD4⁺ naïve tenien la capacitat de produir IL-17, però no IFN- γ o IL-4 quan eren activades *in vitro* en presència de TGF- β i IL-6 o IL-23¹¹⁹. Per últim, es va demostrar que el programa de diferenciació i manteniment de les cèl·lules Th17 era promogut pel factor de transcripció ROR γ t i no per T-bet o GATA-3.

Diferenciació dels limfòcits Th17

Tal i com s'ha dit, la diferenciació de les cèl·lules T CD4⁺ naïve cap a un llinatge concret ocorre gràcies a les citocines que produeix una APC activada en front a un patogen.

En el cas dels limfòcits Th17, degut als descobriments comentats anteriorment, es va creure que la IL-23 era la citocina que promovia el desenvolupament dels limfòcits Th17. No obstant, el rol d'aquesta citocina en la diferenciació de les cèl·lules Th17 és complicat, ja que tota sola no és capaç d'induir aquesta diferenciació¹¹⁹. El grup de Bettelli et al. i Veldhoen et al. van descobrir simultàniament que en models murins, els factors crítics en la diferenciació dels limfòcits Th17 eren la IL-6 i el TGF β ^{119, 120}. De fet, els ratolins que eren deficients per TGF β presentaven un desenvolupament defectuós dels limfòcits Th17¹²¹. La unió d'aquestes dues citocines al seu receptor origina l'expressió de la IL-21. Aquesta citocina és produïda per les mateixes Th17^{122, 123} i el senyal autocrí de la IL-21 promou l'expressió del receptor de la IL-23 (IL-23R) i del ROR γ t, factor de transcripció principal d'aquestes cèl·lules.

Contràriament a la diferenciació observada en el ratolí, en humans es va demostrar que la IL-6 i el TGF β sols no eren capaços d'induir la diferenciació cap a Th17 *in vitro*¹²⁴. En canvi, es va descriure que la combinació d'IL-1 β i IL-6 era capaç d'induir aquesta diferenciació de T naïve a Th17, indicant que el TGF β no era necessari per la diferenciació humana¹²⁴. Durant molts anys hi va haver discordança en referència al rol d'aquesta citocina. Mentre que diversos estudis mostraven que la presència de TGF- β era indispensable per la inducció de ROR γ t i per tant per la diferenciació de Th17 *in vitro*¹²⁵, altres mostraven que aquest requeriment no era necessari¹²⁴. Posteriorment,

es va veure que el medi en el que s'havien cultivat les cèl·lules contenia TGF- β , tot i no haver-se tingut en compte inicialment, així que aquesta citocina va demostrar ser necessària. No obstant, s'ha observat que el rol del TGF- β en la diferenciació d'aquest llinatge és depenent de la seva concentració, ja que baixes dosis d'aquesta citocina resulten essencials mentre que altes dosis inhibeixen la funció de ROR γ t¹²⁶.

Així doncs, les cèl·lules Th17 en humans s'indueixen gràcies a la coestimulació de TGF β /IL1 β /IL-6, i l'addició de IL-23 pot acabar de diferenciar els limfòcits Th17 i ajudar a la seva supervivència i funció efectora¹²⁰. D'altra banda, la importància de la IL-21 en els limfòcits Th17 humans també va ser demostrada^{127, 125, 128}.

Si ens fixem en la relació d'aquestes citocines amb la MC, trobarem que tant la IL-6 com el receptor soluble d'aquesta es troben incrementats en els pacients amb MC¹²⁹. D'altra banda, s'ha observat que el TNF- α , citocina amb un paper molt rellevant dins de la patogènesi de la MC, pot incrementar l'expressió d'IL-1 β i d'IL-6. De fet, s'ha descrit que la severitat clínica de la MC es correlaciona amb els nivells de TNF- α en sèrum. La IL-23, com ja s'ha comentat anteriorment, ha demostrat ser molt rellevant en la MC i en els anomenats GWAS s'ha demostrat l'associació de polimorfismes en el IL-23R amb el desenvolupament d'aquesta malaltia¹³⁰.

Mentre que la IL-1 β , la IL-6, la IL-23 i el TGF β són importants per la diferenciació de les cèl·lules Th17, cal destacar que diferents citocines produïdes per altres llinatges de cèl·lules Th la inhibeixen. Aquests factors que promouen o inhibeixen aquesta complexa via estan representades a la Figura 10.

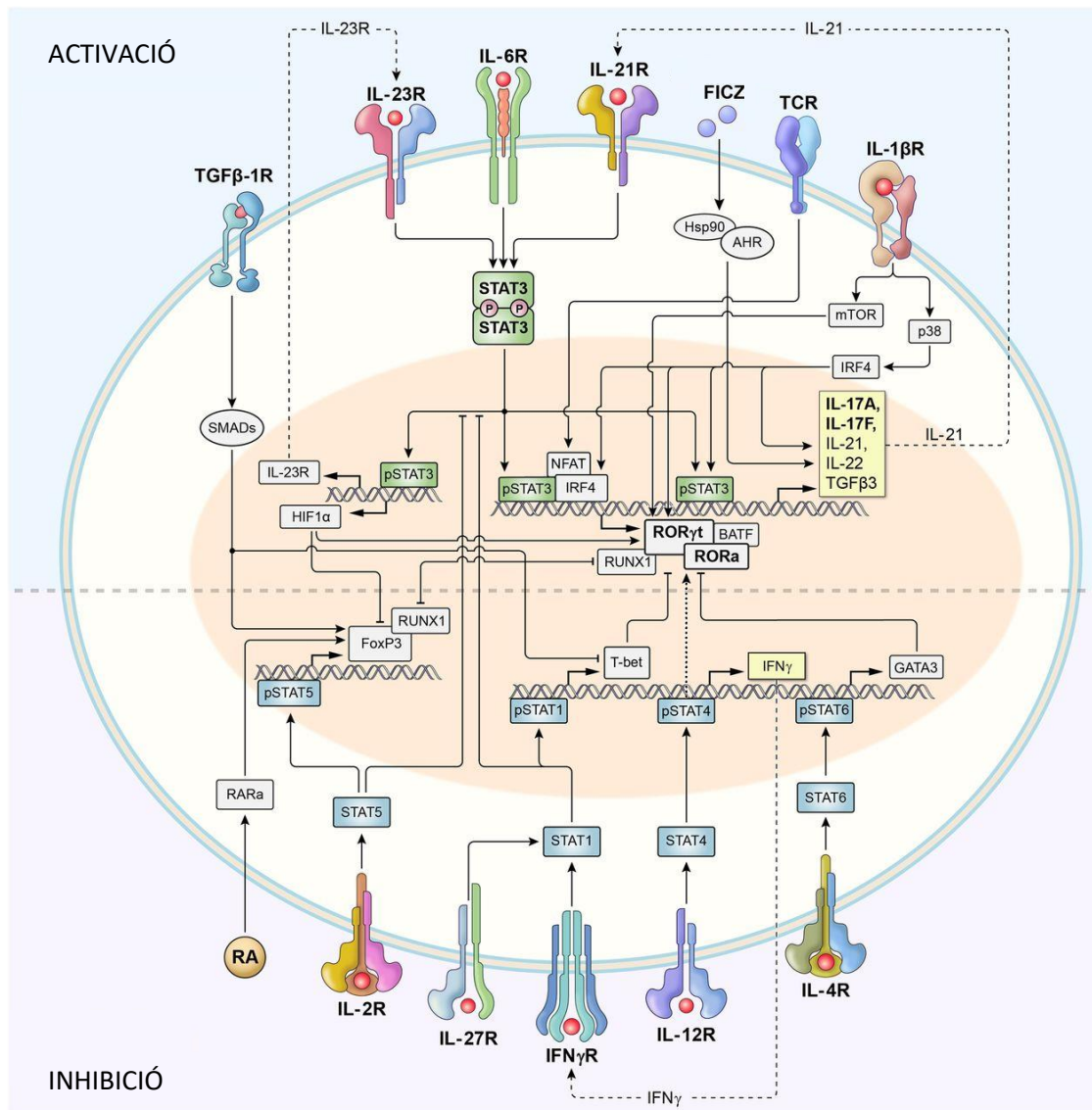


Figura 10: Diferenciació dels limfòcits Th17. L'esquema mostra les citocines i factors de transcripció que promouen o inhibeixen el desenvolupament d'aquesta via. Adaptada de Muranski et al¹³¹.

Regulació transcripcional de les cèl·lules Th17

- **STAT3**

La unió de la IL-23, la IL-6 i la IL-21 als seus receptors origina la fosforilació de STAT3¹³², i la subseqüent dimerització i translocació al nucli. Un cop al nucli, STAT3 induïx l'expressió d'una sèrie de factors de transcripció, entre els que destaca RORγt, factor de transcripció principal d'aquestes cèl·lules. Un estudi va demostrar que la sobreexpressió de STAT3 en un model murí promou la diferenciació i proliferació de les cèl·lules Th17. De manera consistent, es va observar que la pèrdua de STAT3

disminueix l'expressió de ROR γ t i suprimeix la diferenciació de les cèl·lules T naïve cap a cèl·lules Th17^{133, 134}. Aquests ratolins que no tenien STAT3 eren resistents a la EAE i la pneumonitis autoimmune mediada per limfòcits Th17¹³⁴. En humans, com s'ha dit, diversos estudis del GWAS van definir STAT3 com un gen de susceptibilitat de la MC.

- **ROR γ t**

El ROR γ t és el factor de transcripció principal en la regulació de la diferenciació de les cèl·lules Th17¹³⁵. Pertany a la família de receptors ROR, receptors orfes nuclears relacionats amb l'àcid retinoic. Tots aquests membres tenen una estructura comú formada per 4 dominis diferents: un domini N-terminal A/B, un domini d'unió a l'àcid desoxiribonucleic (DNA) anomenat DBD (*DNA-binding domain*), una regió frontissa i un domini d'unió al lligand (LBD) situat a la regió C-terminal.

Dins de la família dels ROR hi trobem tres membres diferents: ROR α (o RORA), ROR β (o RORB) i ROR γ (o RORC), que ahora es subdivideixen en diferents isoformes que estan representades a la Figura 11. Si ens fixem en el ROR γ , trobem dues isoformes diferents: el ROR γ també anomenat RORC1 i el ROR γ t o RORC2. Totes dues isoformes es transcriuen a partir del gen RORC però el ROR γ t presenta 21 aminoàcids menys que el ROR γ en el domini N-terminal que és crític per la seva unió a elements del DNA anomenats ROREs (*ROR binding elements*) per tal de regular l'expressió dels gens¹³⁶. A més, aquestes dues isoformes es troben diferencialment expressades en els teixits.

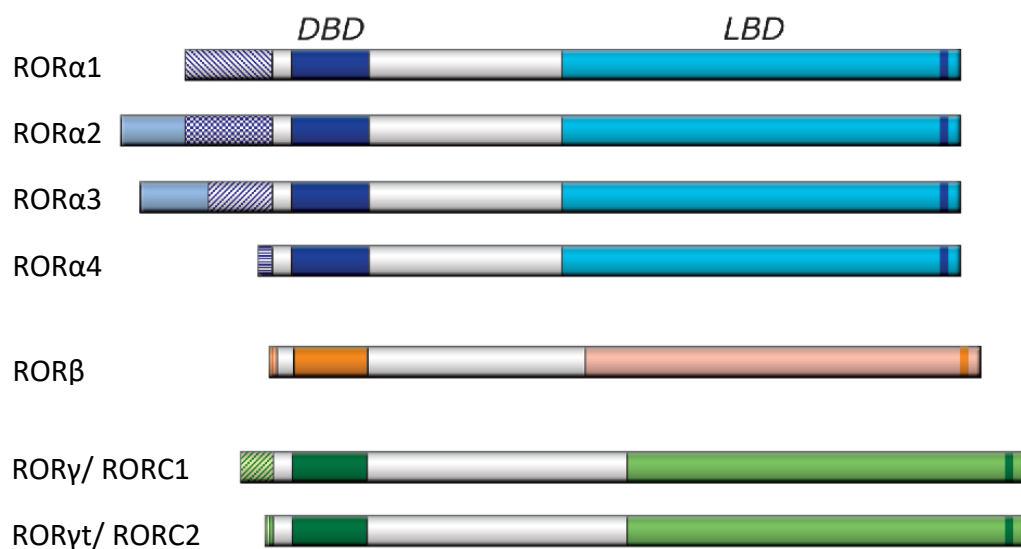


Figura 11: Diferents membres i isoformes de la família del ROR. En aquesta figura es mostren els diferents membres de ROR i els dominis que els conformen. Adaptada de Jetten et al¹³⁶.

A diferència del ROR γ , que s'expressa a molts teixits com el cor, els ronyons, el fetge, els pulmons, el cervell, el teixit adipós i els músculs^{137, 138}, el ROR γ t s'expressa exclusivament en les cèl·lules limfoides¹³⁹, entre les que destaquen els limfòcits Th17, els timòcits, les cèl·lules $\gamma\delta$ i els ILC3¹⁴⁰⁻¹⁴².

El ROR γ t és una molècula important per la regulació de l'expressió gènica durant el desenvolupament de les cèl·lules T i durant la formació dels òrgans limfoides secundaris^{140, 142, 143}. Això es va evidenciar en ratolins RORC^{-/-} que presentaven apoptosi temprana dels timòcits CD4⁺CD8⁺, així com també un defecte en el desenvolupament dels nòduls limfàtics, les plaques de Peyer i les cèl·lules LTi^{142, 143}. *In vitro*, en limfòcits T CD4⁺ que no presentaven RORC no produïen IL-17 tot i ser estimulats amb les citocines que afavorien la polarització cap a aquest llinatge. Inversament, la sobreexpressió de ROR γ t en les cèl·lules T CD4⁺ naïve era suficient per induir l'expressió dels gens característics de Th17 com la IL-17, la IL-17F i la IL-22¹⁴⁴.

Així doncs, el ROR γ t, és necessari per l'expressió de la IL-17, així com també per la diferenciació dels limfòcits Th17 tant en ratolí com en humà^{144, 145}. Per tant, va ser considerat com el factor transcripcional principal per la diferenciació dels limfòcits Th17¹³⁵. Es va demostrar que aquest factor promou l'expressió de la IL17 gràcies a la unió directa a la regió del promotor d'aquest gen en múltiples llocs^{144, 146, 147}. D'altra banda, en un estudi es va veure que l'expressió deteriorada de ROR γ t donava lloc a l'expressió incrementada d'altres factors com T-bet o FoxP3¹³³ i promovia per tant altres llinatges.

Els ratolins RORC^{-/-}, presentaven un nombre molt reduït de cèl·lules Th17, i degut a la pèrdua d'aquestes cèl·lules presentaven una reducció molt severa dels símptomes de la EAE¹⁴⁴. Es va descobrir que la producció residual de IL-17 depenia de l'activitat d'un altre membre de la família de ROR, el ROR α . Aquest factor, està present en molts teixits incloent el fetge, el teixit adipós, els ronyons, els testicles i el cervell^{148, 149}. Pel que fa al sistema immunitari, el ROR α s'expressa tant en cèl·lules limfoides com mieloides i s'indueix durant la diferenciació cap a Th17¹⁵⁰⁻¹⁵². A diferència del ROR γ t, el ROR α tenia un rol mínim en la diferenciació de Th17 en ratolí, ja que la seva delecció resultava en una reducció mínima de l'expressió d'IL17. No obstant, si s'eliminaven

tots dos factors, ROR γ t i ROR α , la producció de IL-17 quedava totalment inhibida i els ratolins estaven totalment protegits contra la malaltia¹⁵³. Així doncs, es va demostrar que el ROR α i el ROR γ t actuen de forma sinèrgica en la regulació de l'expressió gènica de la població de limfòcits Th17. Tot i això, encara no està del tot clar si aquests factors tenen activitats úniques o redundants en la regulació d'aquests gens.

Així doncs, donada la importància de ROR γ t en la generació dels limfòcits Th17 i la relació d'aquestes cèl·lules amb el desenvolupament de malalties autoimmunitàries, s'han dissenyat diferents fàrmacs adreçats a inhibir aquest factor.

En la majoria dels receptors nuclears, quan es produeix la unió del lligand al LBD s'indueix un canvi conformacional que donarà lloc al reclutament de co-activadors, activant així la posterior transcripció. Recentment, s'han identificat alguns esterols com l'oxisterol, que actuen com a lligands naturals de ROR γ t funcionant com a agonistes^{154, 155}. No obstant, recentment s'han dissenyat diferents molècules que actuen com a agonistes inversos ja que en unir-se al LBD provocaran un canvi conformacional que induirà el reclutament de co-repressors i per tant a la inhibició de la transcripció^{147, 156} (Figura 12).

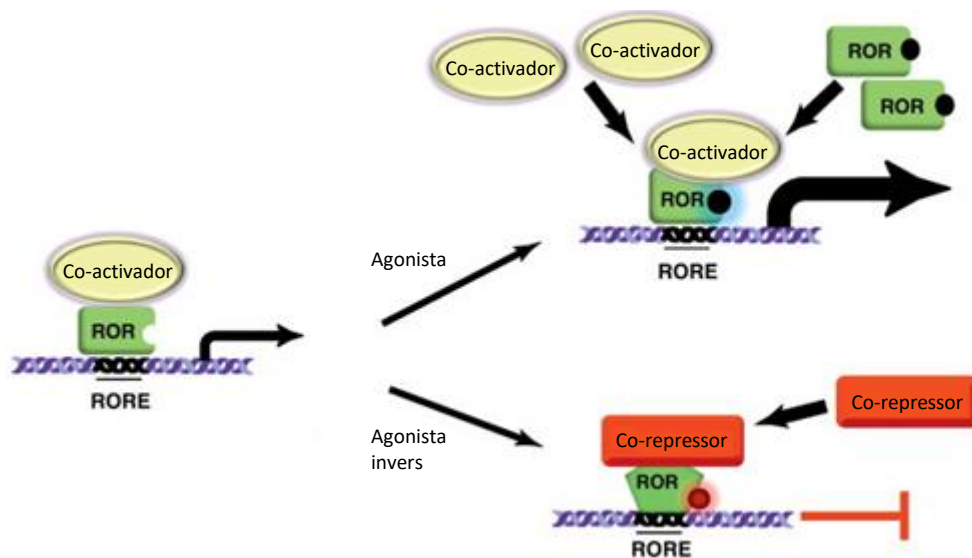


Figura 12: Funcionament dels agonistes i dels agonistes inversos de ROR. Quan un agonista s'uneix al lligand es recluten co-activadors que activen la transcripció del gen. En canvi, després de la unió d'un agonista invers, es produeix un canvi conformacional que provoca el reclutament de co-repressors que inhibiran la transcripció del gen. Adaptada de Solt et al¹⁵⁷.

Altres factors de transcripció

A més del ROR γ t i del ROR α , existeixen altres factors de transcripció que, tot i no ser essencials, també regulen la diferenciació dels limfòcits Th17. Entre aquests trobem BATF (*Basic Leucine Zipper ATF-Like Transcription Factor*)¹⁵⁸, IRF4 (*Interferon regulatory factor 4*)¹⁵⁹ i RUNX1 (*Runt related transcription factor 1*)¹⁶⁰. Els ratolins deficients en algun d'aquests factors mostraven una generació deteriorada de les cèl·lules Th17 que donava lloc a una menor susceptibilitat a patir malalties autoimmunitàries.

Un altre factor important per la diferenciació d'aquests limfòcits Th17 és l'AhR (*aryl hydrocarbon receptor*). Aquest factor s'activa a través de lligands que provenen de la dieta o de la microbiota intestinal i augmenta la diferenciació de Th17¹⁶¹. No obstant, es va demostrar que no és un factor essencial ja que cèl·lules T CD4⁺ provinents de ratolins que no tenien AhR podien diferenciar-se a Th17¹⁶². S'ha descrit que aquest factor és crític per la producció de IL-22 derivada dels ILC3⁸⁰.

Funció de les cèl·lules Th17

Les cèl·lules Th17 són molt importants en la defensa contra bacteris extracel·lulars i fongs. Diferents estudis realitzats en ratolins IL23p19^{-/-} o IL17^{-/-}, principal citocina efectora d'aquestes cèl·lules, demostren la seva importància en l'eliminació de bacteris extracel·lulars com *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Klebsiella pneumonia* (*K. pneumonia*) i *Citrobacter rodentium*^{163, 164} o de fongs com *Candida albicans* (*C. albicans*)^{165, 166}. Tot i aquest rol protector, cal tenir en compte que la desregulació d'aquestes cèl·lules, com ja s'ha comentat, pot contribuir a la patogènesi de moltes malalties autoimmunitàries com l'artritis reumatoide, l'esclerosi múltiple o les MII.

Les cèl·lules Th17 produeixen diferents citocines entre les que destaquen la IL-17A, la IL-17F, la IL-22, la IL-26 i el factor estimulador de macròfags i granulòcits (GM-CSF). La IL-17 és una citocina proinflamatòria que activarà STAT3, estimulando així una resposta inflammatòria potent. La IL-17 té diferents isoformes, incloent la IL-17A (normalment coneguda com IL-17), IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E i IL-17F¹²⁸. Tant la IL-17A com la IL-17F tenen funcions similars i van dirigides a regular cèl·lules immunitàries i no immunitàries¹⁶⁷ que expressen el seu receptor. Aquest està format per l'heterodímer

que conté IL-17RA i IL-17RC¹⁶⁸ i mostra més afinitat per la IL-17A. La IL-17A i la IL-17F poden induir l'expressió de diverses citocines proinflamatòries per part d'una gran varietat de cèl·lules. En les caracteritzacions inicials es va observar que la IL-17A induïa la producció de IL-6 per part de fibroblasts¹⁶⁹. Estudis subsequents van demostrar que tant la IL-17A com la IL-17F poden tenir efectes proinflamatoris sobre una gran varietat de cèl·lules entre les que trobem les cèl·lules epitelials, les cèl·lules endotelials i els macròfags. En funció de la població sobre la que actuen, s'induirà la producció de diferents productes com la IL-6, el GM-CSF o les metal·loproteïnases¹⁷⁰. A més, indueixen a les cèl·lules epitelials a produir diferents quimiocines com el CXCL1 o el CXCL8, promovent així l'activació i la migració dels neutròfils fins al teixit inflammat, o el CCL20, important pel reclutament de limfòcits Th17^{128, 171}. Per últim, s'ha descrit que la IL-17 pot promoure l'expressió de certs pèptids antimicrobians com diferents defensines, les proteïnes S100 com la calprotectina (S100A8/A9) o la lipocalina 2¹⁷⁰. Totes aquestes accions suggereixen que aquesta citocina juga un paper important en la defensa però pot contribuir a sostenir una inflamació crònica.

Una altra de les citocines importants produïda per les cèl·lules Th17 és la IL-22¹⁷². Durant el dany agut, la seva funció es basa en mantenir la integritat de la barrera epitelial, promovent la producció d'agents antimicrobians com les β -defensines^{173, 174}. No obstant, quan la IL-22 es produeix de forma crònica, dona lloc a una hiperproliferació dels miofibroblasts i a la producció de quimiocines i altres senyals inflamatoris que recluten cèl·lules efectores patogèniques cap als teixits inflamats¹⁷⁵.

A més, sabem que les cèl·lules Th17 humanes també secreten IL-26, citocina que no compta amb un homòleg murí¹⁷⁶. La seva funció consisteix en tenir una acció microbicida. S'ha demostrat que inhibeix el creixement de bacteris gram-negatius com *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* i *K. pneumonia* i gram positives com *S. aureus*.

D'altra banda, la producció d'altres citocines com el TNF- α i el GM-CSF per part de les mateixes cèl·lules Th17 contribueix a l'activació i reclutament de neutròfils¹⁷⁷.

Finalment, aquestes cèl·lules expressen diferents receptors de quimiocines que els permetran migrar cap al lloc de l'intestí on hauran de dur a terme la seva funció biològica¹⁷⁸. Així doncs, l'expressió de CCR6 s'ha associat a la diferenciació de les

cèl·lules Th17¹²⁴ i s'ha descrit que ROR γ t és capaç de controlar la seva expressió¹⁷⁹. A més, els limfòcits Th17 expressen CCL20 que s'unirà al CCR6, promovent l'atracció i reclutament de noves cèl·lules Th17 donant lloc a una inflamació sostinguda¹⁸⁰.

Limfòcits Th17 en la inflamació intestinal

A partir del seu descobriment, nombrosos estudis han considerat els limfòcits Th17 com un factor patogènic rellevant en moltes malalties autoimmunitàries, entre les quals trobem la MC. Actualment, la presència de limfòcits Th17 i de les citocines relacionades amb aquesta població a la mucosa inflamada de pacients amb MC està ben establerta¹⁸¹. Inicialment, Fujino et al. van demostrar que la IL-17 era indetectable en el sèrum d'individus sans, però en canvi, en pacients amb MC els nivells d'IL-17 es trobaven molt incrementats⁹⁹. Més endavant, aquest mateix grup va mostrar que hi havia nombres incrementats de cèl·lules productores d'IL-17 en l'intestí de pacients amb MC comparat amb els dels controls⁹⁹. De la mateixa manera, aquestes cèl·lules es trobaven incrementades en pacients amb MC activa comparades amb les presents en pacients inactius. En línia amb aquests resultats, es van trobar nivells incrementats de RNA missatger (mRNA) d'IL17A i IL17F en la mucosa dels pacients amb MC^{99, 182}. Un altre estudi va mostrar que el mRNA d'IL17A era major en les regions de mucosa que presentaven activitat¹⁸³.

A més, diferents estudis han documentat la producció exacerbada en la mucosa dels pacients amb MC d'altres citocines com la IL-22, la IL-21 i la IL-23^{184, 185, 176, 186}. Tanmateix, s'ha observat una sobreexpressió de la IL-26 en pacients amb MC activa¹⁷⁶. És important destacar que la IL-26 indueix l'increment de l'expressió de citocines proinflamatòries com són la IL-8 i el TNF- α per part de les cèl·lules epitelials^{176, 187}.

D'altra banda, com s'ha dit anteriorment, també s'ha relacionat la MC amb l'augment de neutròfils, i sabem que les cèl·lules Th17 induiran el reclutament d'aquestes cèl·lules als llocs on hi ha inflamació. En línia amb això, veiem que s'ha descrit més CXCL8, quimioattractiu de neutròfils, en el teixit de pacients amb MC comparada amb individus sans. També s'han documentat nivells elevats de CCL20 a la mucosa de pacients amb MC, i com s'ha dit aquesta és l'encarregada d'atraure cèl·lules Th17¹⁸⁸.

Tanmateix, el grup d'Annunziato et al. van documentar per primera vegada l'existència d'unes cèl·lules a la mucosa de pacients amb MC que produïen IL-17 i IFN- γ a la vegada¹⁷⁹. Més endavant, Rovedatti et al. van descriure que no només el percentatge de limfòcits Th17 era més elevat en pacients amb MC, sinó que també hi havia un major percentatge de cèl·lules Th1/Th17¹⁸⁹. Utilitzant diferents models d'inflamació van demostrar que aquestes cèl·lules que expressaven ROR γ ⁺T-bet⁺ i produïen IFN- γ i IL-17, eren més patogèniques que les ROR γ ⁺T-bet⁻¹⁹⁰. Més recentment, Ramesh et al. han relacionat la presència d'aquestes cèl·lules Th1/Th17 en l'intestí de pacients amb MC amb el fet de patir MDR1 (*multidrug resistance type 1*). Aquestes cèl·lules han resultat ser molt patogèniques i refractàries als corticosteroides, indicant un possible mecanisme de resistència a aquests medicaments¹⁹¹.

D'altra banda, existeixen diferents estudis que suggereixen que hi ha canvis de la immunoregulació de les cèl·lules T de la mucosa al llarg del curs de la malaltia. S'ha descrit que els pacients que tenen una MC diagnosticada des de fa poc presenten un procés inflamatori agut on hi ha una resposta predominant dels limfòcits Th1 però que, a mesura que la malaltia avança, altres citocines com la IL-17 i la IL-23 tenen un rol més important en la progressió de la MC¹⁹². Un estudi realitzat en el nostre laboratori recolza aquesta evidència, ja que demostra que en pacients que fa anys que tenen MC hi ha una major proporció de limfòcits Th17 comparat amb malalts que presenten una malaltia de menys d'un any d'evolució¹⁹³.

Tot i que la implicació de les cèl·lules Th17 en la patogènesi de la MC és clara, diferents estudis realitzats en models murins de colitis han reportat resultats contradictoris, indicant que algunes de les citocines produïdes pels limfòcits Th17 poden tenir un rol protector a l'intestí.

Per un costat, es va observar que en un model de colitis aguda induïda per l'administració de TNBS (*trinitrobenzene sulfonic acid*) es produïa IL-17 al còlon al cap de 24 hores d'haver rebut el TNBS. A més, es va demostrar que els ratolins que eren IL17R^{-/-} estaven protegits de patir la malaltia¹⁹⁴. En línia amb aquests resultats, el grup de Yen et al. va demostrar que l'eix IL-23/Th17 era essencial pel desenvolupament de la colitis. Els ratolins IL10^{-/-} i els ratolins IL-12p35^{-/-}/IL-10^{-/-} desenvolupaven colitis,

mentre que els ratolins IL-23 p19^{-/-}/IL-10^{-/-} no ho feien. Addicionalment, es va demostrar que mentre que la progressió de la colitis accelerava si s'administrava IL-23 recombinant, els símptomes d'aquesta milloraven si els ratolins es tractaven amb un anticòs anti-IL-17¹⁹⁵.

En canvi, el grup de Flavell et al. va demostrar que la transferència de cèl·lules T naïve provinents de ratolins IL17A^{-/-} en ratolins immunodeficients ocasionava una inflamació colònica molt agressiva, indicant un possible rol protector d'aquesta citocina en la inflamació intestinal¹⁹⁶. Un altre estudi, a més de confirmar aquesta troballa, va demostrar que la transferència de cèl·lules provinents de ratolins IL17F^{-/-} i IL22^{-/-} tampoc protegia contra el desenvolupament de colitis. En canvi, la transferència de cèl·lules T RORγt^{-/-} no induïa colitis. A més, van observar que el tractament posterior d'aquests ratolins amb IL-17 recombinant era capaç d'induir de nou la malaltia, la qual cosa indicava un rol crucial dels limfòcits Th17 en la patogènesi de la colitis¹⁹⁷.

En un altre model murí de colitis induït per DSS (*dextran sulfate sodium*) es va demostrar que la neutralització de la IL-17A originava una inflamació excessiva i un dany exacerbat a l'epiteli intestinal^{198, 199}. En aquest model la IL-17A tenia efectes protectors facilitant la formació d'unions estretes a l'epiteli intestinal i incrementant així la seva funció de barrera²⁰⁰.

De la mateixa manera, els ratolins IL-22^{-/-} tractats amb DSS, mostraven una inflamació intestinal més exacerbada que el grup control, suggerint un rol protector d'aquesta citocina. De fet, la IL-22 ha estat associada amb un increment de la proliferació de les cèl·lules epitelials intestinals i amb la inducció de la funció de les cèl·lules caliciformes i de la producció de mucòs promovent la integritat de la barrera intestinal^{173, 201, 202}. Contràriament, un estudi va demostrar que la pèrdua d'IL-17F en el mateix model experimental de colitis millorava la resposta inflamatòria intestinal¹⁹⁹.

Considerant tot això, veiem que les citocines relacionades amb la població Th17 tenen diferents efectes en el curs de la patogènesi de la MC. D'una banda poden ser protectores ajudant a la defensa contra fongs i bacteris extracel·lulars però, d'altra banda, també poden tenir efectes patogènics, ja que augmenten el reclutament de neutròfils a la làmina pròpia durant la resposta inflamatòria.

Plasticitat de les cèl·lules Th17

Les cèl·lules T col·laboradores presenten la propietat de ser flexibles i plàstiques i això els hi atorga la capacitat de poder-se convertir a un altre llinatge en funció del microambient on es trobin. En comparació amb els llinatges Th1 i Th2, les cèl·lules Th17 han mostrat més plasticitat i inestabilitat, tant *in vitro* com *in vivo*¹⁰⁹. La re-estimulació de les cèl·lules que ja havien estat diferenciades amb certes citocines donava lloc a canvis transcripcionals dinàmics del llinatge Th17²⁰³. S'han descrit dos fenòmens principals, la transició Th1/Th17 i la plasticitat Treg/Th17, que queden representades a la Figura 13.

- **Th1/Th17**

El primer subtipus de cèl·lules doble productores que es va descriure van ser les cèl·lules Th1/Th17, observades pel grup d'Annunziato et al. en pacients amb MC¹⁷⁹. Aquest grup va demostrar la plasticitat d'aquestes cèl·lules *in vitro* ja que al posar en cultiu limfòcits Th17 amb IL-12 s'indueix la producció d'IFN- γ per part de les cèl·lules Th1/Th17¹⁷⁹. D'altra banda, el grup de Hirota et al., va demostrar aquesta transdiferenciació de Th17 a Th1 *in vivo* en un model murí²⁰⁴. Una dada que recolza que aquestes cèl·lules canvien el seu fenotip és que, tant en models murins^{204, 205} com en humans²⁰⁶, les noves cèl·lules productores d'IFN- γ continuaven expressant CD161, que és un marcador del llinatge Th17.

- **Treg/Th17**

Tot i que aquesta plasticitat pot contribuir a la patogènesi de la malaltia, com en el cas de les cèl·lules Th1/Th17, diferents estudis van proposar que aquesta modulació també pot permetre originar una resposta immunitària reguladora. Així, s'ha demostrat que els limfòcits Th17 també són capaços de fer una transdiferenciació cap a cèl·lules Treg/Th17. Com s'ha dit, les cèl·lules Th17 protegeixen a l'hoste de possibles invasions¹¹⁹, mentre que les iTreg es troben limitant les respostes T efectores per impedir que causin dany als teixits²⁰⁷. S'ha observat que totes dues poblacions es troben principalment a la mucosa intestinal i es modulen entre elles per tal de mantenir un balanç.

Diferents estudis van demostrar que l'expressió de FoxP3 reprimeix l'expressió de ROR γ t i viceversa^{119, 208}. Tot i aquesta regulació recíproca, la presència de cèl·lules que expressen tots dos factors alhora ha estat documentada a ili i a còlon^{209, 210}.

Anteriorment ja s'ha comentat que el TGF- β esdevé un factor comú en la diferenciació d'ambdós tipus cel·lulars. Així, s'ha descrit que aquest factor és capaç d'augmentar l'expressió de ROR γ t²¹¹, així com també la de FoxP3^{212, 213}, en funció de la influència que rebí per part de resta de citocines que hi hagi al voltant^{119, 214}. A més, s'ha demostrat que el TGF- β manté l'expressió de certes molècules necessàries per retenir les Treg al còlon²¹⁵.

El factor induïble d'hipòxia 1 (HIF-1), és un gen modulad per l'activació de STAT3¹³⁴ i s'ha vist implicat en la regulació del balanç Treg/Th17²¹⁶. Un dels mecanismes proposats implica que el HIF-1 inhibeix la diferenciació cap a Treg ja que ubiquitina a FoxP3 per tal de degradar-lo, estimulant així la diferenciació a Th17. A més, s'ha descrit que aquesta via induïda per HIF-1, pot activar en si mateixa la IL-17A i la IL-17F, perpetuant la resposta Th17 existent²¹⁷. Així doncs, és important tenir en compte la plasticitat d'aquestes cèl·lules quan ens trobem davant d'una resposta immunitària alterada, com en el cas de la MC.

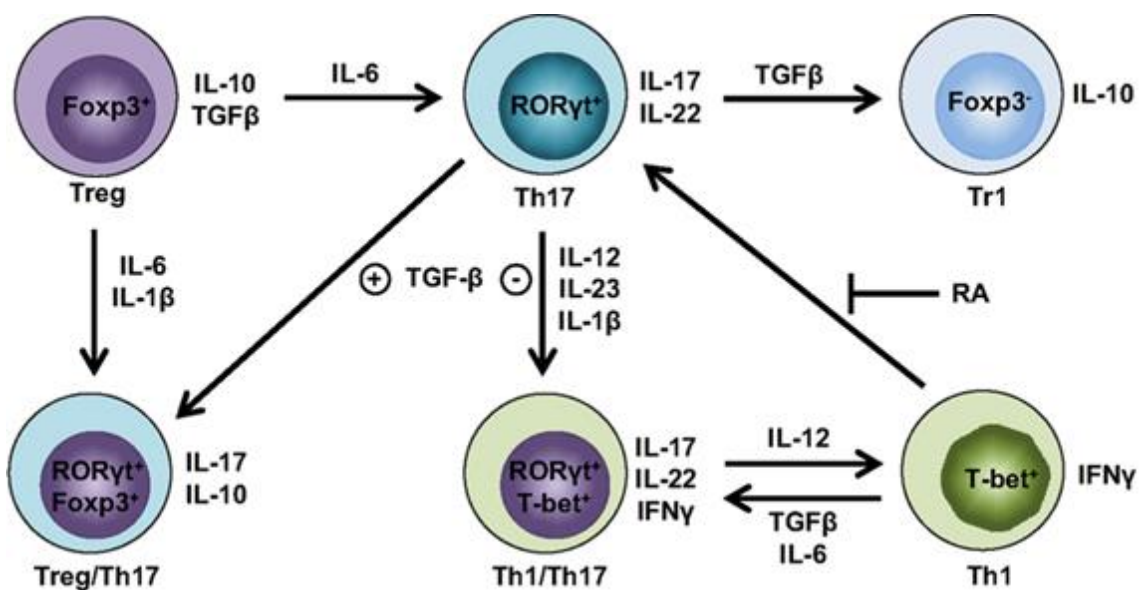


Figura 13: Plasticitat de les cèl·lules Th17. En aquest esquema es mostren les diferents poblacions originades a causa de la gran flexibilitat i plasticitat d'aquestes cèl·lules. Figura d'Omenetti et al²¹⁸.

Interacció entre les cèl·lules Th17 i la microbiota

Tal i com s'ha comentat anteriorment, els limfòcits Th17 són especialment abundants en les superfícies mucoses, on contribueixen, juntament amb altres cèl·lules, a mantenir l'homeòstasi intestinal i la protecció contra microorganismes invasors²¹⁹. És important destacar que la microbiota endògena sembla estar involucrada en la diferenciació de les cèl·lules Th17, ja que el nombre d'aquestes varia en funció de la regió del tracte gastrointestinal, degut al diferent grau de colonització de certs bacteris comensals^{220, 221}. Si ens fixem en ratolins sans veurem que els limfòcits Th17 es troben en major proporció a la làmina pròpia de l'ili i del còlon, però no al duodè, al jejú, als NLM o a la melsa²²².

En línia amb això, diferents estudis mostren que la presència de cèl·lules Th17 es veu reduïda a l'intestí de ratolins lliures de gèrmens o en presència d'antibiòtics^{211, 223}. A més, s'ha documentat que si es realitza un transplantament fecal d'un ratolí control a aquests ratolins, al cap de poc temps s'observa un increment dels limfòcits Th17²¹¹.

En particular, els bacteris segmentats filamentosos (SFB), presents en espècies específiques de *Clostridia*, s'han associat a la generació de cèl·lules Th17^{211, 220, 224}. A més, s'ha establert una correlació directa entre la quantitat dels bacteris Gram-negatius cytophaga-flavobacter-bacteroidetes i la presència de les cèl·lules Th17 a la làmina pròpia de l'ili²¹¹.

Fins ara, els productes bacterians específics involucrats en la diferenciació dels limfòcits Th17 a l'intestí no han estat descrits amb claredat, tot i que molts estudis assenyalen a les flagelines com a un d'ells ja que estan expressades pels SFB, són reconegudes pel TLR5 (expressat en els fagòcits intestinals), promouen la inducció d'IL-23 per part de les APCs i donen lloc a respostes Th17²²⁵⁻²²⁷.

No obstant, cal destacar que el desenvolupament homeostàtic de les cèl·lules Th17 en resposta a bacteris comensals sembla ser diferent al desenvolupament de les respostes Th17 durant condicions inflamatòries ja que es troben grans infiltrats d'aquestes en les àrees inflamades de ratolins que pateixen colitis^{227, 228}.

Així, diferents estudis han confirmat la contribució de la microbiota comensal intestinal a l'expansió de les cèl·lules Th17 en la MII. S'ha observat que les cèl·lules epitelials, després de ser infectades per bacteris, expressen lligands del TLR i promouen la producció d'IL-6 i TGF- β per part de les cèl·lules dendrítiques, facilitant la diferenciació cap a Th17²²⁹. Un estudi realitzat per Elson et al. demostra que la transferència de cèl·lules T CD4⁺ específiques per un antígen bacterià anomenat CBir1 a ratolins immunodeprimits, induïx una colitis associada a la producció de citocines relacionades amb la població Th17²³⁰.

Tots aquests estudis indiquen que la població Th17 es forma gràcies al microambient que hi ha *in vivo*, i que en un estat d'inflamació sostinguda aquest serà diferent. A més, l'habilitat de la microbiota intestinal de modular la inducció de les respostes Th17 pot influenciar a la susceptibilitat de patir inflamació intestinal^{231, 232}.

Cèl·lules del sistema immunitari innat productores d'IL-17

Tot i que la major font d'IL-17 és la població Th17, cal destacar que hi ha altres cèl·lules que pertanyen al sistema immunitari innat que també són capaces de produir aquesta citocina. Aquestes es troben representades a la Figura 14 i s'expliquen a continuació.

- **Cèl·lules T $\gamma\delta$**

Aquestes cèl·lules formen part de la immunitat innata. A diferència dels limfòcits convencionals, el seu TCR compta amb les cadenes γ i δ . La seva diferenciació té lloc en el timus, a partir de les cèl·lules CD4⁻CD8⁻. De la mateixa manera que les cèl·lules Th17, aquestes compten amb marcadors de superfície com el CCR6. També expressen ROR γ t i un altre factor anomenat AhR, marcador de les cèl·lules Th17 no patogèniques²³³.

A més, s'ha descrit que produeixen el mateix ventall de citocines, així com també el IL-23R²³⁴. Aquestes cèl·lules secreten simultàniament IL-17 i IFN- γ per tal de defensar l'hoste de possibles patògens²³⁵. Finalment, aquestes cèl·lules també han estat implicades en desordres autoimmunitaris com l'artritis o la EAE^{236, 237}.

▪ **Cèl·lules NK invariants**

Les cèl·lules NK invariants (iNKTs) es troben fonamentalment en les barreres del cos ja que la seva funció consisteix en muntar una defensa eficient contra els patògens. Les iNKTs expressen un TCR invariant que reconeix glicolípidis propis o aliens. Aquestes cèl·lules que expressen ROR γ t i AhR produeixen IL-17 però no secreten IL-22. La seva activació també depèn de IL-1 β , IL-6, IL-23 i TGF- β ^{238, 239}.

▪ **ILC3**

Els ILCs es troben en diversos teixits entre els quals destaquen les superfícies mucoses de l'intestí. És interessant destacar que cadascun dels subtipus d'ILCs s'associa, en funció dels patrons de citocines secretades, a un llinatge de les cèl·lules T CD4⁺. Així, trobem les següents associacions: ILC1/Th1, ILC2/Th2 i ILC3/Th17. Tal i com s'ha comentat a la secció II, els ILC3 han estat implicats amb la MC. Cal recordar que es dividien en tres subpoblacions, dues de les quals són capaces de produir IL-17. Una d'elles es coneix amb el nom de cèl·lules inductores de teixit limfoide (LTi) ja que són essencials pel desenvolupament dels òrgans limfoides durant l'embriogènesi⁷⁸.

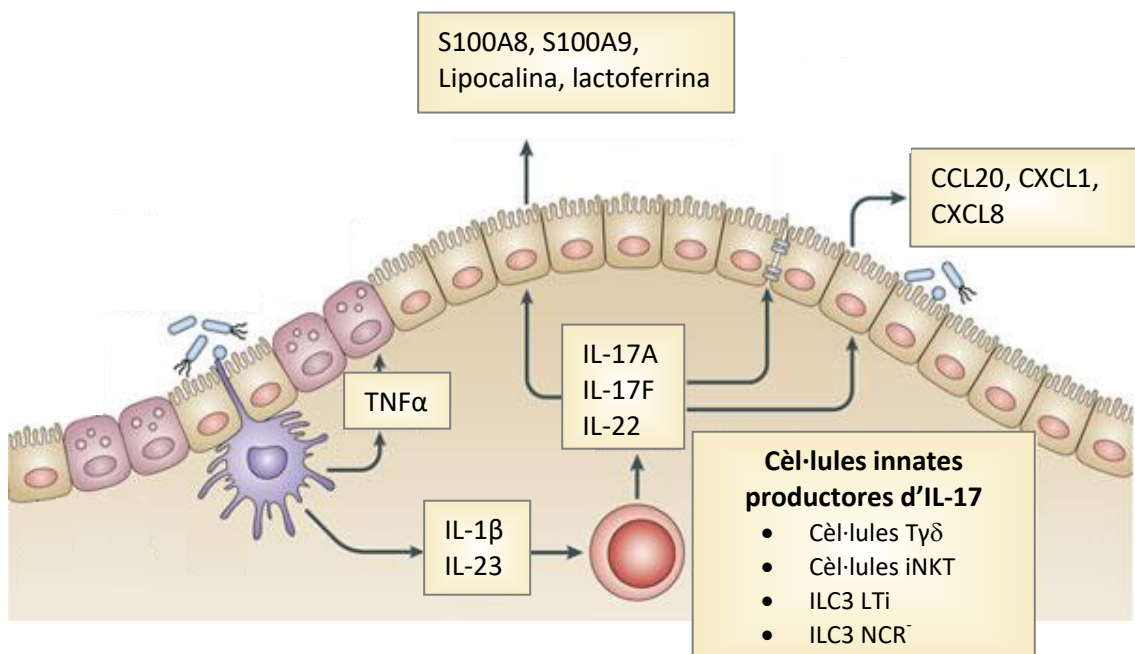


Figura 14: Principals cèl·lules productores de IL-17 que pertanyen al sistema immunitari innat. Adaptada de Cua et al²⁴⁰.

SECCIÓ IV: TRACTAMENT DE LA MC I DIANES TERAPÈUTIQUES EMERGENTS

La qualitat de vida d'un percentatge significatiu dels pacients que pateixen MC es veu disminuïda com a resultat de l'activitat inflamatòria persistent, de cirurgies repetides, dels efectes secundaris dels medicaments i de les complicacions extraintestinals. Els tractaments que existeixen actualment, en moltes ocasions, no són capaços de prevenir o millorar aquests efectes en una part significativa dels pacients amb MC i, per tant, la cerca de noves estratègies terapèutiques és un objectiu evident. Els fàrmacs que s'han usat fins ara es poden dividir en tres grans grups que inclouen els corticosteroides, els immunosupressors i els biològics.

Tractaments actuals

- **Corticosteroides**

Normalment són el tractament d'elecció quan ens trobem davant d'un brot d'activitat moderada o severa. Actuen inhibint les ciclooxigenases i regulant les cèl·lules del sistema immunitari a diferents nivells reduint la seva capacitat proinflamatòria.

Aquests fàrmacs no s'utilitzen en el manteniment de la remissió degut a la gran quantitat d'efectes secundaris associats si s'usen en teràpia perllongada. En alguns malalts que s'anomenen corticodependents, la retirada dels corticosteroides provoca la reactivació de la malaltia. En aquests casos caldrà introduir altres tractaments com els immunosupressors o fins i tot, en els casos més greus, caldrà recórrer a la cirurgia.

- **Immunosupressors**

Alguns dels més coneguts són l'azatioprina, la mercaptopurina o el metotrexat. El mecanisme d'acció consisteix en suprimir la proliferació i supervivència dels limfòcits T. Es donen a pacients que no responen a corticosteroides, així com també s'usen per mantenir la remissió.

▪ **Biològics**

Aquests fàrmacs s'usen en la inducció i manteniment de la remissió en pacients que no responen als fàrmacs anteriors o que presenten una malaltia més severa. Dins d'aquest grup trobem diversos fàrmacs que van dirigits a bloquejar diferents parts del sistema immunitari, en especial als limfòcits T, ja sigui prevenint l'activació, la migració o la secreció de citocines efectores d'aquestes cèl·lules.

▪ **Anti-TNF- α**

Els fàrmacs més usats dins dels biològics són els anticossos monoclonals (mAbs) anti-TNF- α (infliximab, adalimumab, certolizumab) encarregats de bloquejar i neutralitzar els efectes d'aquesta citocina proinflamatòria. No obstant, fàrmacs com l'etanercept, que inclouen només la fracció constant de la IgG1 unida al receptor del TNF- α , no són efectius ja que aquests anticossos incomplets tenen una vida curta i mostren una eficàcia baixa.

A l'última dècada, diversos assajos clínics han demostrat que entre el 30% i el 50% de pacients no responen a la teràpia basada en els anti-TNF- α . Així doncs, han sorgit noves estratègies destinades a bloquejar mecanismes alternatius²⁴¹.

▪ **Vedolizumab**

Un dels nous fàrmacs que actualment s'usa a la pràctica clínica va dirigit a inhibir certes integrines per tal de bloquejar la migració dels limfòcits T. Inicialment es va testar el Natalizumab, un anticòs que bloqueja la integrina $\alpha 4$, inhibint així el reclutament de limfòcits T a les lesions via les integrines $\alpha 4\beta 1$ i $\alpha 4\beta 7$. No obstant, es va descriure un risc de patir leucoencefalopatia multifocal relacionat amb aquest tractament degut a la importància de les interaccions $\alpha 4\beta 1$ -VCAM1 en el reclutament dels leucòcits al sistema nerviós central.

Així doncs, s'ha desenvolupat un fàrmac anomenat Vedolizumab que s'encarrega de bloquejar específicament la integrina $\alpha 4\beta 7$. El lligand d'aquesta és MadCAM-1 (*mucosal addressin cellular adhesion molecule 1*) i aquest s'expressa específicament a l'endoteli gastrointestinal. Aquest fàrmac ha demostrat ser eficaç en el tractament de la MC, podent ser usat també en pacients que no responen als fàrmacs anti-TNF- α ²⁴².

- **Ustekinumab**

D'altra banda, recentment s'ha aprovat l'ús d'un fàrmac dirigit a inhibir l'activació dels limfòcits. Es tracta de l'Ustekinumab, un mAb que va adreçat a inhibir la p40, subunitat comuna de la IL-12 i la IL-23. Tal i com s'ha dit, la IL-12 és important pel desenvolupament de limfòcits Th1, mentre que la IL-23 promou l'activació dels limfòcits Th17, de manera que aquest fàrmac bloquejarà totes dues vies.

- **Altres tractaments**

No obstant, tot i haver-hi nombrosos fàrmacs, cal destacar que hi ha pacients que són refractaris a qualsevol tractament i es veuen obligats a sotmetre's a cirurgia. Una altra estratègia que es duu a terme quan els pacients són refractaris a tots els tractaments consisteix en realitzar un transplantament de progenitors hematopoètics per tal de fer un *reset* del sistema immunitari. Un inconvenient d'aquest tractament és que està associat a riscos pels pacients, entre els que destaquen les possibles infeccions greus que en alguns casos podrien arribar a associar-se a mortalitat. Per això, recentment s'han descrit protocols que milloren la seguretat d'un tractament que indueix resposta endoscòpica a un 50% dels pacients després d'un any de tractament^{243, 244}.

Teràpies en desenvolupament

Degut a aquesta refractarietat als tractaments actuals, s'estan investigant noves estratègies terapèutiques per fer front a la MC. A la Figura 15 es representa el mecanisme d'acció d'aquestes estratègies en desenvolupament, així com també els fàrmacs biològics que ja s'estan usant en l'actualitat.

- **Inhibidors de les Janus kinasa**

Un grup de fàrmacs a destacar són els inhibidors d'unes proteïnes de senyalització que pertanyen a la família de les Janus kinasa (JAK). Dins d'aquesta família trobem quatre membres: les JAK1-3 i la tirosin quinasa 2 (TYK2). Aquestes quinases activen una cascada intracel·lular que acabarà induint una sèrie de citocines proinflamatòries que han estat implicades en el desenvolupament de les MII²⁴⁵.

En un assaig clínic fase II, s'ha testat el Tofacitinib, un inhibidor no selectiu de totes les JAKs (tot i que presenta preferència per JAK1 i 3)^{246, 247}. Aquest fàrmac va resultar prometedor en CU però no en MC^{248, 249}.

S'han examinat altres compostos anomenats Filgotinib i Upadacitinib que presenten més selectivitat per JAK1. El Filgotinib ha demostrat ser capaç d'induir l'estat de remissió en els pacients amb una MC moderada o severa²⁵⁰. D'altra banda, un assaig clínic fase II on s'ha testat el Upadacitinib també mostra resultats favorables en pacients amb MC²⁵¹.

No obstant, l'ús d'inhibidors de JAK s'ha associat amb un increment d'infeccions per herpes zòster i potencialment amb altres infeccions sistèmiques i amb anèmia²⁵². En l'actualitat existeixen diversos assajos clínics de fase III avaluant aquests inhibidors orals que ajudaran a elucidar si el seu perfil de seguretat ve determinat per la selectivitat dels compostos a les diferents JAK.

▪ **Inhibidors de la migració leucocitària**

Donada l'efectivitat provada amb la teràpia amb Vedolizumab, inhibidor de $\alpha 4\beta 7$, s'estan realitzant altres assajos clínics dirigits a inhibir aquest reclutament de les cèl·lules T a l'intestí. Actualment s'estan reclutant pacients amb MC i CU per dur a terme un assaig clínic fase III avaluant l'eficàcia de l'Etrolizumab, inhibidor de la integrina $\beta 7$ que de moment ha demostrat eficàcia en la CU²⁵³.

D'altra banda, s'està testant el PF-00547659, un inhibidor de MadCAM-1, que com s'ha dit anteriorment, és el lligand de $\alpha 4\beta 7$. Aquest fàrmac s'està testant tant en pacients amb MC com en pacients amb CU, però de moment no s'ha observat una millora clínica significativa respecte al grup placebo²⁵⁴.

▪ **Oligonucleòtids**

Es va desenvolupar un fàrmac anomenat Mongersen que s'administrava per via oral i consistia en un oligonucleòtid que anava dirigit a inhibir la traducció de SMAD7²⁵⁵. En els pacients amb MC s'havia trobat un increment de l'expressió d'aquesta proteïna en

les cèl·lules de la mucosa²⁵⁶. La funció d'aquesta proteïna consisteix en inhibir el TGF- β , de manera que si SMAD7 es troba sobreexpressada actuarà inhibint les funcions antiinflamatòries del TGF- β a la mucosa.

El primer assaig clínic que va avaluar aquesta molècula va concloure que era eficaç en la inducció de la remissió clínica en els pacients amb MC²⁵⁷. No obstant, posteriorment es van descriure certes limitacions referents a aquest estudi ja que els criteris d'inclusió no tenien en compte mesures objectives com l'endoscòpia. A més, gran part dels pacients tenien una PCR normal a l'inici de l'assaig, la qual cosa no reflectia aquells pacients amb una malaltia moderada o severa. Tenint en compte aquests factors es va concloure que aquest fàrmac no demostrava eficàcia, així que la farmacèutica va decidir aturar dos assaigs clínics de fase III (NCT02596893, NCT02641392) i va cancel·lar l'inici d'un tercer estudi (NCT02974322).

▪ Fàrmacs que bloquegen les citocines

Una altra de les estratègies terapèutiques que s'ha abordat consisteix en el bloqueig de diferents citocines que han estat relacionades amb la patogènesi de la MC. La IL-6, per exemple, és una de les citocines proinflamatòries associades a aquesta malaltia. Es va desenvolupar un anticòs contra aquesta citocina anomenat Tocilizumab que va ser capaç d'induir remissió en pacients amb MC^{258, 259}. Més endavant, es va dissenyar el fàrmac anti-gp130, que anava adreçat a inhibir el receptor de la IL-6²²⁴. Tot i que tots dos van resultar eficaços, van aparèixer diferents perforacions intestinals entre els pacients de l'estudi, així que van ser descartats.

Un altre dels fàrmacs que es va testar era un mAb anti-IFN- γ anomenat Fontolizumab que no només no va funcionar, sinó que a més, va ocasionar diverses complicacions en els pacients que van rebre aquest tractament²⁶⁰.

Com s'ha dit anteriorment, entre els fàrmacs que s'usen actualment per tractar la MC trobem l'Ustekinumab, mAb que inhibeix la p40 present a la IL-12 i a la IL-23. Aquest tractament s'ha aprovat recentment, després de demostrar remissió clínica en la MC en diferents assajos clínics de fase II/III²⁶¹⁻²⁶³. Tot i que l'eficàcia i la seguretat de bloquejar p40 està ben establerta, no està del tot clar si la modulació de la IL-12

contribueix a l'eficàcia observada. Així doncs, el bloqueig selectiu de la p19, present únicament a la IL-23, podria ser una alternativa. S'han desenvolupat dos mAbs anti-p19 anomenats MEDI2070 i Risankizumab (BI-655066). Tots dos han demostrat eficàcia clínica en dos assaigs clínics fase II realitzats en pacients amb MC moderada o severa que prèviament havien estat refractaris a la teràpia amb anti-TNF α ^{264, 265}. En l'actualitat s'estan portant a terme estudis en fase III.

Degut a la importància de l'eix IL-23/Th17 a la MC, una altra estratègia que es va considerar va ser inhibir la IL-17. Així doncs, es va testar un mAb anomenat Brodalumab que anava dirigit a bloquejar el seu receptor (IL17RA). L'assaig clínic de fase II es va haver d'aturar prematurament ja que es va documentar un empitjorament de la malaltia en els grups que rebien el tractament²⁶⁶. D'altra banda, es va desenvolupar el Secukinumab, un mAb que bloquejava la IL-17A. Assajos clínics de fase I i II van demostrar rellevància clínica en psoriasi i artiritis reumatoide, demostrant una efectivitat major d'aquest fàrmac en comparació amb l'Ustekinumab²⁶⁷. No obstant, un assaig clínic realitzat en pacients amb MC va demostrar que el bloqueig de la IL-17A no era efectiu i que l'ús del Secukinumab empitjorava la malaltia en alguns pacients. A més, es van observar més efectes adversos comparat amb el grup placebo, entre els que destacava sobretot la candidiasi mucocutània²⁶⁸. L'empitjorament de la malaltia amb l'ús d'aquests mAbs no era del tot inesperada, ja que alguns estudis pre-clínic desenvolupats en animals havien demostrat resultats contradictoris pel que fa a la funció d'aquesta citocina²⁶⁹.

Així, el bloqueig complet de la IL-17 mitjançant mAbs es va excloure en pacients amb MC, però la rellevància d'aquestes respostes en la seva patogènesi és clara. Així doncs, seria interessant dissenyar i explorar noves estratègies capaces de modular aquestes respostes patogèniques intentant preservar la capacitat de defensa d'aquestes cèl·lules contra fongs i bacteris.

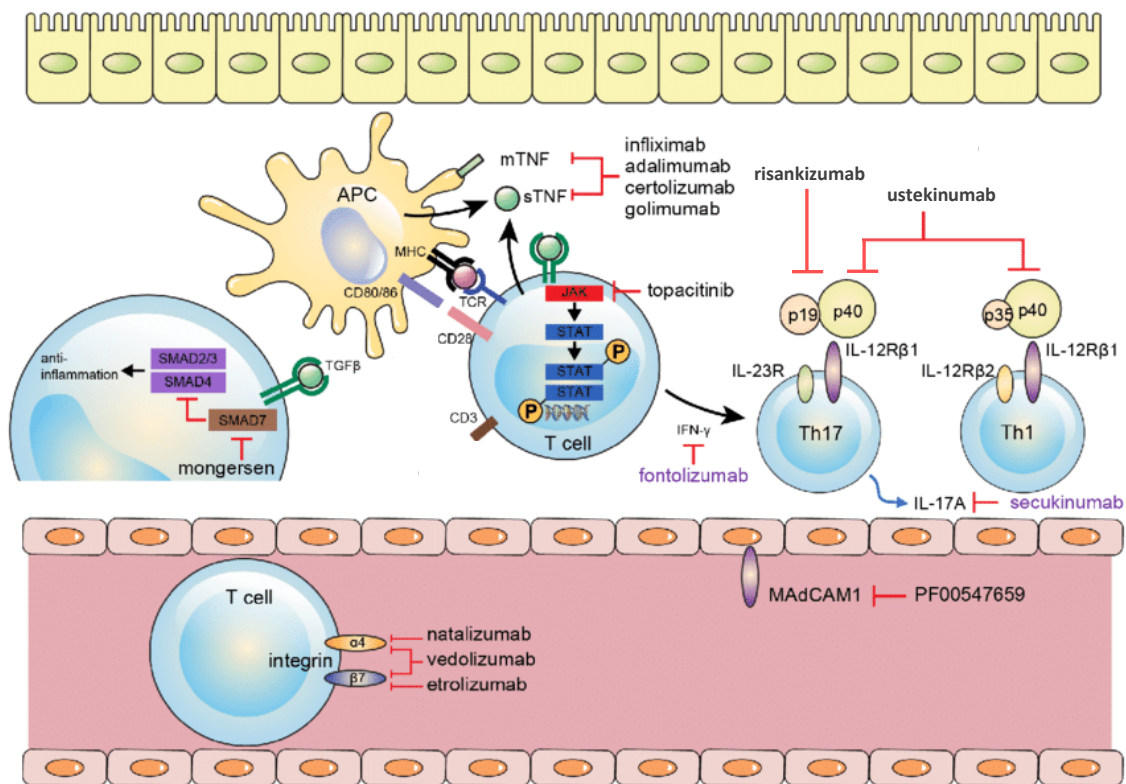


Figura 15: Fàrmacs biològics usats en el tractament actual de la MC i teràpies en desenvolupament. En aquest esquema es mostra el mecanisme d'actuació de diferents fàrmacs. Alguns d'ells s'utilitzen actualment per tractar la MC (infliximab, adalimumab, ustekinumab, vedolizumab), altres han fracassat (mongersen, fontolizumab, secukinumab) i altres estan en procés de desenvolupament (risankizumab). Adaptada de Kim et al.²⁷⁰.

▪ Inhibidors de RORγt

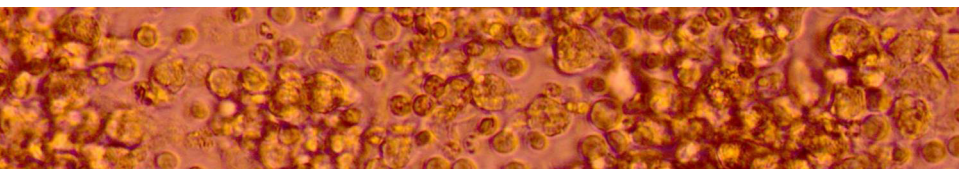
Tot i que el bloqueig de la IL-17 va tenir efectes negatius en la MC, la contribució de l'eix IL-23/Th17 en la patogènesi d'aquesta malaltia estava clarament demostrat, de manera que resultava interessant explorar estratègies alternatives dirigides a inhibir aquesta via. En aquest sentit, una teràpia potencial per tractar la MC podria consistir en inhibir RORγt, factor de transcripció d'aquesta via.

L'activitat d'aquest factor de transcripció es pot modular gràcies a uns agonistes inversos de baix pes molecular que s'uneixen al seu domini LBD. Aquesta unió induirà un canvi conformacional que activarà el reclutament de corepressors i inhibirà la transcripció d'aquest gen.

De fet, aquests agonistes inversos de ROR γ t s'està testant com a possible teràpia de diverses malalties autoimmunitàries com la EAE o l'artritis en diferents models murins. Aquests compostos no només van demostrar la supressió de la diferenciació cap a Th17, sinó que a més, van ser capaços de reduir la severitat d'aquestes malalties autoimmunitàries experimentals²⁷¹⁻²⁷⁴. Fins i tot, recentment, s'ha demostrat la seva eficàcia clínica en un model de colitis que utilitza ratolins IL-10^{-/-}²⁷⁵.

A més d'haver estat testada en models murins, la inhibició de ROR γ t a través de fàrmacs d'administració oral ha demostrat seguretat i tolerància en humans en un estudi de fase II realitzat en pacients amb psoriasi on ha demostrat eficàcia clínica (NCT02555709).

Així doncs, el fet de generar inhibidors de ROR γ t més potents i més selectius podria oferir una estratègia terapèutica interessant per tractar malalties autoimmunitàries com la MC.



OBJECTIUS

La patogènesi de la MC ha estat associada a una resposta immunitària exacerbada enfront de la microbiota comensal, basada fonamentalment en un increment de la seroreactivitat contra diferents proteïnes microbianes present en els pacients amb MC. Tot i que les cèl·lules T CD4⁺ han estat considerades com un dels elements principals en el desenvolupament d'aquesta malaltia, existeix molt poca informació sobre els antígens contra els quals reaccionen aquestes cèl·lules.

El fet de definir una resposta T específica contra certs antígens en el context de la MC podria tenir diverses implicacions importants. Des del punt de vista fisiopatològic reforçaria el concepte de pèrdua de tolerància del sistema immunitari contra la microbiota comensal. A més, aquest fet ens permetria explorar la naturalesa i funció d'aquestes cèl·lules immunitàries que reaccionen contra la microbiota. D'altra banda, des d'un punt de vista més clínic, es podria intentar relacionar la presència d'aquestes respostes amb la progressió o amb les recaigudes de la malaltia.

Davant d'aquest context, les hipòtesis del primer estudi són:

- Les cèl·lules T dels pacients amb MC presenten una resposta exacerbada contra diferents antígens de la microbiota comensal.
- Aquestes cèl·lules presenten un fenotip proinflamatori i són capaces d'induir canvis en l'epiteli intestinal sa.

Els objectius que s'han definit per poder testar les nostres hipòtesis són:

- Observar si existeixen diferències en la reactivitat de les cèl·lules T de la sang perifèrica provinents d'individus sans i de pacients amb MC contra diferents antígens de la microbiota comensal i identificar els antígens més rellevants.
- Correlacionar la proliferació de les cèl·lules T enfront dels diferents antígens analitzats amb la presència d'anticossos sèrics generats contra aquests.
- Definir el fenotip de les cèl·lules T que reaccionen contra aquests antígens.
- Estudiar, a nivell funcional, si les citocines produïdes en resposta als antígens de la microbiota comensal són capaces d'induir inflamació en criptes intestinals humanes provinents d'individus sans.

Els resultats obtinguts en aquest estudi ens han permès concloure que les cèl·lules T CD4⁺ dels pacients amb MC que reaccionen contra diferents antígens de la microbiota comensal presenten un perfil Th17. Basant-nos en aquestes observacions i en la importància prèviament descrita de les cèl·lules Th17 en el desenvolupament de la MC, s'ha realitzat un segon estudi a partir de les següents hipòtesis:

- La inhibició de ROR γ t permet reduir les citocines proinflamatòries produïdes en resposta a antígens microbians *in vitro*.
- La inhibició de ROR γ t pot representar un potencial tractament per la MII.

Els objectius d'aquest estudi són els següents:

- Testar l'efecte de l'inhibidor de ROR γ t en cèl·lules de sang perifèrica provinents de pacients amb MC estimulades amb diferents antígens de la microbiota comensal.
- Analitzar l'expressió dels factors de transcripció i de les principals citocines dels diferents llinatges de limfòcits T CD4⁺ per determinar si l'inhibidor de ROR γ t afecta a la resta de llinatges.
- Comprovar si la inhibició de ROR γ t és capaç de reduir el potencial inflamatori de les cèl·lules T CD4⁺ sobre l'epiteli intestinal.
- Investigar l'efecte de la inhibició de ROR γ t en biòpsies endoscòpiques obtingudes de pacients amb MC activa.
- Demostrar l'eficàcia d'aquest fàrmac *in vivo* en un model murí de colitis basat en la transferència de cèl·lules T CD4⁺CD45RB^{high}.



METODOLOGIA

Subjectes d'estudi

Per tal de dur a terme el primer estudi, on es volia analitzar la resposta específica dels limfòcits T CD4⁺ contra diferents antígens comensals, es va obtenir sang de 65 pacients diagnosticats amb MC seguint diferents criteris endoscòpics, histològics i radiològics. De la mateixa manera, es van recollir mostres de sang d'un total de 45 voluntaris sans que no tenien cap malaltia aguda o crònica coneguda i que van ser usats com a controls. Les característiques demogràfiques i clíniques d'aquests individus es resumeixen a la Taula 2.

	N	Edat (anys) Mitjana (rang)	Gènere M/F	Localització	Fenotip	Tractament	Edat diagnòstic	Durada (anys) Mitjana (rang)
Individus sans	45	33.6 (20-53)	21/24	-	-	-	-	-
Pacients amb MC	65	39.9 (25-73)	28/37	26/18/19/2	38/12/15	27/0/1/37	5/45/15	10.87 (1-33)

Taula 2. Descripció dels controls i dels pacients amb MC utilitzats en el primer estudi. Les característiques clíniques dels pacients amb MC s'expressen en base a la classificació de Montreal (definida a la Taula 1).

Gènere: Masculí (M) i Femení (F)

Localització de la malaltia: L1 (ileal)/ L2 (colònica)/ L3 (ileocolònica)/ L2+L4 (colònica+esòfag)

Fenotip: B1 (inflamatori)/ B2 (estenosat)/ B3 (fistulitzant)

Tractament: Cap/ Mesalazina/ Corticosteroides/anti-TNF- α . *Cal tenir en compte que es van excloure els pacients que prenen immunosupressors ja que aquests fàrmacs inhibeixen la proliferació dels limfòcits.

Edat al diagnòstic: A1(<16 anys)/ A2 (17-40 anys)/ A3 (>40 anys)

Per tal de realitzar el segon estudi, on es volia analitzar l'eficàcia d'un inhibidor de ROR γ t, es van obtenir mostres de sang d'un total de 33 pacients amb MC i de 6 persones sanes. Les característiques demogràfiques i clíniques d'aquests individus es resumeixen a la Taula 3, separades en funció de l'experiment en el que es van incloure.

D'altra banda, en tots dos estudis es van aïllar criptes epitelials a partir de peces obtingudes en reseccions quirúrgiques de malalts que no tenien MII i que es sotmetien a una operació per altres motius, generalment per un càncer de còlon. Els patòlegs ens van proporcionar una secció de mucosa considerada sana, ja que s'obtenia d'una part situada com a mínim a 10 cm de la lesió. En el primer estudi les criptes epitelials es van obtenir a partir de mostres de 7 individus, mentre que en el segon estudi les criptes epitelials provenien de mostres de 6 individus diferents dels usats en l'estudi anterior.

	N	Edat (anys) Mitjana (rang)	Gènere M/F	Localització	Fenotip	Tractament	Edat diagnòstic	Durada (anys) Mitjana (rang)
Grup 1 (PBMCs + antigens)								
Individus sans	6	37.3 (27-49)	3/3	-	-	-	-	-
Pacients amb MC	6	47.8 (29-73)	3/3	1/4/1/0	3/2/1	2/1/0/3	0/5/1	11.2 (1-24)
Grup 2 (PBMCs + antigens + BI119)								
Pacients amb MC	12	48.6 (28-74)	7/5	4/3/5/0	8/2/2	3/2/0/7	1/6/5	11.7 (1-31)
Grup 3 (Limfòcits T CD4⁺ expandits)								
Pacients amb MC (estimulat amb FrvX)	8	46.9 (28-70)	4/4	2/1/5/0	6/1/1	5/0/0/3	0/5/3	14.4 (6-42)
Pacients amb MC (estimulat amb YidX)	7	39.4 (33-50)	3/4	4/0/3/0	4/2/1	3/0/0/4	0/7/0	13.1 (8-18)

Taula 3. Descripció dels controls i dels pacients amb MC dels quals es van fer servir les PBMCs per dur a terme el segon estudi. Les característiques clíniques dels pacients amb MC s'expressen en base a la classificació de Montreal (definida a la Taula 1).

Gènere: Masculí (M) i Femení (F)

Localització de la malaltia: L1 (ileal)/ L2 (colònica)/ L3 (ileocolònica)/ L2+L4 (colònica+esòfag)

Fenotip: B1 (inflamatori)/ B2 (estenosat)/ B3 (fistulitzant)

Tractament: Cap/ Mesalazina/ Corticosteroides/anti-TNF- α . *Cal tenir en compte que es van excloure els pacients que prenen immunosupressors ja que aquests fàrmacs inhibeixen la proliferació dels limfòcits.

Edat al diagnòstic: A1(<16 anys)/ A2 (17-40 anys)/ A3 (>40 anys)

Per últim, en aquest segon estudi, també es van incloure biòpsies intestinals obtingudes de pacients amb MC que eren sotmesos a colonoscòpia. Les mostres es van agafar de les parts inflamades de còlon i d'ili que eren considerades actives si ens basàvem en l'índex de severitat endoscòpica de la MC (CDEIS). Les biòpsies es van obtenir de pacients de l'Hospital Clínic de Barcelona, de l'Hospital de Bellvitge i de la Mútua de Terrassa. Les característiques demogràfiques i clíniques d'aquests individus es resumeixen a la Taula 4.

El primer estudi va ser aprovat pel Comitè Ètic de l'Hospital Clínic de Barcelona, i el segon va ser aprovat pels Comitès Ètics de l'Hospital Clínic de Barcelona, de l'Hospital de Bellvitge i de la Mútua de Terrassa. Tots dos estudis es van realitzar seguint els principis exposats en la declaració de Helsinki. Tots els participants van signar un consentiment d'inclusió a l'estudi.

	N	Edat (anys) Mitjana (rang)	Gènere M/F	Localització malaltia	Localització mostra	Tractament	Durada(anys) Mitjana (rang)	CDEIS Global Mitjana (rang)	CDEIS Parcial Mitjana (rang)	Cirurgia Sí/No	PCR (mg/dl) Mitjana (rang)
Grup 4 (Biòpsies obtingudes de pacients amb MC activa)											
Mostres de còlon	10	38.1 (25-51)	6/4	0/2/7/1	0/2/2/6/0	3/0/4/2/1	11.2 (0-28)	20.81 (7.25-49.4)	21.99 (11.5-36)	2/8	1.96 (0.06-7.60)
Mostres d'ili	8	51 (25-73)	5/3	3/0/5/0	8/0/0/0/0	3/1/1/3/0	8.29 (0-29)	8.38 (3.4-19)	17.33 (3.4-38)	6/2	1.26 (0.04-4.63)

Taula 4. Descripció dels pacients amb MC dels quals es van fer servir les biòpsies per dur a terme el segon estudi. Les característiques clíniques dels pacients amb MC s'expressen en base a la classificació de Montreal (definida a la Taula 1).

Gènere: Masculí (M) i Femení (F)

Localització de la malaltia: L1 (ileal)/ L2 (colònica)/ L3 (ileocolònica)/ L2+L4 (colònica+esòfag)

Localització de la mostra: Ili/ Còlon ascendent/ Còlon transvers/ Còlon descendent/ Recte

Tractament: Cap/Mesalazina/Corticosteroides/Immunosupresors/anti-TNF- α

Edat al diagnòstic: A1(<16 anys)/ A2 (17-40 anys)/ A3 (>40 anys)

CDEIS parcial: es va calcular el CDEIS de l'àrea d'on s'havia extret la mostra

Aïllament de les cèl·lules mononuclears de sang perifèrica

Es van agafar 40 ml de sang de cadascun dels donants en tubs heparinitzats, tant si es tractava d'individus sans com de pacients amb MC. La sang es va diluir afegint 40 ml de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) (Gibco, Life technologies). Aquesta suspensió es va dipositar curosament sobre 10 ml de la solució Ficoll-Hypaque (Sigma) en un tub cònic. Després de centrifugar es va formar un gradient de densitat (Figura 16) i es van recollir les cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMCs) que quedaven dipositades en una fina capa. Les PBMCs es van rentar amb PBS i posteriorment es van comptar. La viabilitat cel·lular es va determinar utilitzant blau de tripà (Lonza, Trypan Blue Stain 0.4%). Un cop comptades, aquestes PBMCs es van resuspendre a una concentració de 1×10^6 cèl·lules/ml en medi X-Vivo (Lonza, X-Vivo 15 amb L-glutamina, gentamicina i vermell de fenol) suplementat amb un 2% de sèrum humà inactivat (Sigma, Human serum type AB Male).

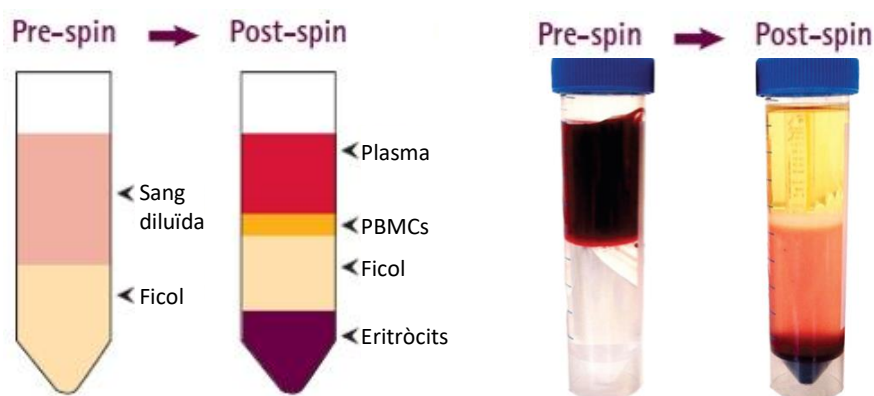


Figura 16. Aïllament de les PBMCs. Gradient de densitat format abans i després de la centrifugació.

Descripció de l'inhibidor de ROR γ t

L'agonista invers de ROR γ t que hem volgut testar en el segon estudi s'anomena BI119 i va ser sintetitzat per Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals Inc. (Ridgefield, CT, USA). Aquest compost va ser descobert a través d'un *screening* d'una llibreria d'unes molècules de mida petita. Es va comprovar que el BI119 s'unia fortament al domini LBD i va demostrar la seva activitat en un assaig d'unió al receptor nuclear (constant de dissociació del LBD de ROR γ = 65 nM, IC₅₀= 260 nM). El compost va mostrar una alta selectivitat contra ROR γ t i una pèrdua significant d'activitat contra ROR α (IC₅₀ > 10 μ M) i ROR β (IC₅₀ > 6 μ M).

Estimulació de les PBMCs amb antígens de la microbiota intestinal

Pel tal de poder realitzar el primer estudi, les PBMCs aïllades de controls i pacients (Taula 2) es van cultivar amb diferents antígens comensals: ASCA-Ag, CBir1, FlaX, A4-fla2, i YidX (Prometheus Laboratories, Inc, San Diego, CA) a 1 µg/ml. A més, es va incloure el toxoide tetànic (TT) (Sigma-Aldrich) també usat a una concentració d' 1 µg/ml com a control de la proliferació.

Per dur a terme el segon estudi, les PBMCs d'una cohort diferent de controls i de pacients (Taula 3, Grup 1) es van cultivar novament amb el YidX, degut als resultats positius obtinguts en el primer estudi i es va afegir el FrvX (Prometheus Laboratories Inc.) que també provenia d'*E. coli*. Aquests antígens van ser usats a 2 µg/ml. D'altra banda, vam fer servir *C. albicans* (Departament de Microbiologia, Hospital Clínic-IDIBAPS, Barcelona, Espanya) com a control positiu de la producció d'IL-17 degut a que aquesta citocina és clau en la defensa contra fongs. Tot els antígens provinents de la microbiota que es van utilitzar es resumeixen a la Taula 5. Posteriorment, les PBMCs d'un grup de pacients amb MC (Taula 3, Grup 2) es van cultivar amb els mateixos estímuls en presència del compost B1119 a una concentració d'1µM o de DMSO (*dimethyl sulfoxide*) usat en una dilució de 1:10000 com a control.

En tots els casos, el cultiu va tenir una durada de 7 dies, tenint en compte que a dia 3 s'afegeix IL-2 a 20 unitats internacionals/ml (IU). Al setè dia de cultiu els sobrenedants es van centrifugar i es van mantenir a -20°C fins al seu ús posterior. Tot seguit es va procedir a la mesura de la proliferació, al marcatge intracel·lular o a l'extracció de l'àcid ribonucleic (RNA) de les PBMCs, en funció de cada cas.

ANTIGEN	DESCRIPCIÓ	SOCA	ESTUDI
ASCA-Ag	Oligomanosa	<i>S. cerevisiae</i>	1r estudi
CBir1	Flagelina	Diversos bacteris	1r estudi
FlaX	Flagelina	<i>E. coli K12</i>	1r estudi
A4-fla2	Flagelina	<i>E. coli K12</i>	1r estudi
YidX	Lipoproteïna	<i>E. coli K12</i>	1r i 2n estudi
FrvX	Membre del sistema de fosfotransferasa del sucre	<i>E. coli K12</i>	2n estudi

Taula 5. Antígens usats per estimular les PBMCs del primer i segon estudi.

Mesura de la proliferació amb timidina tritiada

Pel primer screening de proliferació, les PBMCs es van cultivar amb ASCA-Ag, CBir1, FlaX, A4-fla2, i YidX. En aquest primer assaig, es va mesurar la proliferació utilitzant una tècnica radioactiva que es basa en la incorporació timidina tritiada. A dia 6 de cultiu es va afegir triti (1 μ Ci/pou; Amersham, Cambridge, United Kingdom) i es va incubar durant 16 hores a 37⁰C. Durant aquesta incubació, la timidina tritiada s'incorporava al DNA que s'anava sintetitzant a mesura que les cèl·lules proliferaven enfront de l'antigen. Aquesta incorporació es va mesurar mitjançant un comptador de centelleig capaç de quantificar les cèl·lules marcades (Betaplate Liquid Scintillation Counter). Pel bloqueig dels MHC II, es va afegir al cultiu un anticòs anti-HLA-DR, -DP, i -DQ (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) a una concentració de 20 μ g/ml.

Mesura de la proliferació per dilució de CFSE

Un altre mètode que permet mesurar la proliferació cel·lular es basa en la utilització de CFSE (*carboxy fluorescein succinimidyl ester*) (Cell Trace CFSE cell proliferation kit; ThermoFisher Scientific, Waltham, MA). El CFSE és un colorant fluorescent que tenyeix els limfòcits i permet mesurar la seva proliferació, degut a la pèrdua progressiva de fluorescència posterior a cada divisió. Per realitzar aquests experiments les PBMCs es van incubar amb CFSE a una concentració de 5 mmol/l i es van incubar amb els antígens comensals i el TT.

Mesura d'anticossos antimicrobians en sèrum

Els anticossos contra FlaX, A4-fla2 i YidX es van mesurar mitjançant la tècnica d'ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Les plaques es van incubar a 4⁰C tota la nit amb 4 μ g de FlaX, A4-fla2 i YidX per pou. També es va utilitzar una proteïna irrellevant que corresponia al Fab (*antigen-binding fragment*) (CrohmPure Rat IgG, Jackson Immuno Research Labs) com a control per restar el soroll de fons que no fos específic. Les plaques es van bloquejar amb PBS amb un 3% d'albumina sèrica bovina (BSA) durant 1.5 hores a temperatura ambient. Després es van afegir les mostres de sèrum diluïdes 1:100 en PBS amb un 0.1% de BSA durant dues hores a temperatura ambient. Tot

seguit es va fer una incubació amb un anticòs específic per la cadena γ de la IgG humana (Jackson) conjugat amb peroxidasa a una concentració de 1:50000. A continuació, es va afegir un substrat anomenat TMB (*tetramethyl benzidine substrate*) (eBioscience).

L'absorbància es va llegir a 620 nanòmetres en un lector de microplats (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). La densitat òptica (O.D.) es va calcular de manera específica per cada mostra restant-li el valor de soroll de fons obtingut de la mateixa mostra incubada amb el Fab. La seroreactivitat a cada antigen es va establir quan el valor de O.D. era major que la mitjana de la O.D. obtinguda en el grup dels controls \pm la desviació estàndard.

Anàlisi de les citocines en els sobrenedants de les PBMCs

Per tal de mesurar les citocines secretades per les PBMCs estimulades, es va utilitzar la tècnica d'ELISA. En el cas de la IL-17 els anticossos de captura i de detecció eren d'eBioscience. Per l'IFN- γ , la IL-5 i la IL-10 es van fer servir kits d'ELISA comercials (R&D Systems, Minneapolis, MN) i es van dur a terme seguint les instruccions del fabricant.

A més d'això, en el primer estudi també es va utilitzar la tècnica del multiplex anomenada cytokine assay Milliplex Human Th17 magnetic bead (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA) que permetia mesurar moltes citocines a la vegada com per exemple IL-17A, IL-17F, IL-22, CCL20, IFN- γ i TNF- α .

Marcatge intracel·lular de citocines

Per tal de realitzar el marcatge intracel·lular d'IL-17 i d'IFN- γ , a dia 7 de cultiu les PBMCs es van reestimar amb PMA (*phorbol myristate acetate*) a 25 ng/ml, ionomicina a 0.5 mg/ml i brefeldina A a 10 mg/ml (totes de Sigma-Aldrich) durant 4 hores. Els dos primers components serveixen per estimular les cèl·lules i forçar la producció de citocines, mentre que la brefeldina A n'impedeix la secreció (Figura 17).

Després de 4 hores les cèl·lules es van fixar i permeabilitzar amb el kit Fix and PERM (Thermo Fisher Scientific). La viabilitat de les cèl·lules es va determinar amb un kit anomenat *Live/Dead fixable violet dead cell stain kit* (Thermo Fisher Scientific).

També es van utilitzar diferents anticossos fluorescents per marcar les cèl·lules T CD4⁺ així com també per marcar les diferents citocines. En concret es van fer servir els diferents clons: anti-CD4 (RPA-T4; BD Biosciences), anti-IL-17 (64DE17; eBioscience), i anti-IFN- γ (4S.B3; eBioscience). Després del marcatge, les cèl·lules es van separar utilitzant la tècnica del *Fluorescence-Activated Cell Sorting* (FACS) en un citòmetre anomenat FACS Canto II (BD Biosciences) i es van analitzar amb el software BD FACS Diva Software v6.1.1.

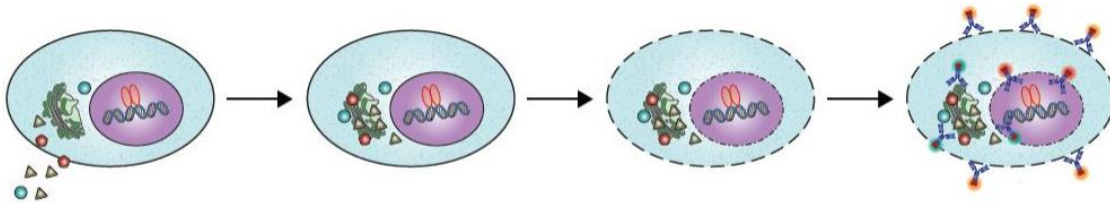


Figura 17. Marcatge intracel·lular de citocines. La figura mostra les diferents fases que tenen lloc en un marcatge intracel·lular de citocines. En primer lloc la cèl·lula secreta les citocines, després s'inhibeix el transport de proteïnes, es fixen i permeabilitzen les cèl·lules i per últim té lloc el marcatge de les citocines que desitgem amb anticossos monoclonals conjugats a fluorocroms.

Separació dels limfòcits T CD4⁺ específics d'antigen per FACS

Les PBMCs marcades amb CFSE es van cultivar amb diferents antígens. En el primer estudi es van cultivar amb TT, FlaX, A4-fla2 o YidX durant 14 dies, mentre que en el segon (Taula 3, Grup 3) es van fer servir el FrvX i el YidX. A dia 7 de cultiu es va afegir IL-2 a 20 UI/ml. A dia 14 es van separar les cèl·lules vives que eren CFSE⁻CD4⁺. Aquestes cèl·lules eren les que havien proliferat enfront de l'antigen i per això havien perdut la fluorescència del CFSE en activar-se i dividir-se. Aquests limfòcits es van separar utilitzant el FACS Aria II (BD Biosciences) (Figura 18).

Un cop aïllades, les cèl·lules CFSE⁻CD4⁺ es van reestimular amb 2 μ g/ml del mateix antigen contra el que havien estat activades i van ser cultivades conjuntament amb PBMCs autòlogues irradiades que facilitarien de nou la presentació antigènica. En el segon estudi, aquesta estimulació es va fer en presència del compost BI119 o del vehicle (DMSO).

Després d'una setmana més en cultiu es van recollir els sobrenedants i es va extreure el RNA. En canvi, les cèl·lules CFSE⁻CD4⁺ d'un subconjunt de pacients del primer estudi que posteriorment es va usar per estimular les criptes, van ser re-estimulades amb anti-CD3 (BD Biosciences) i anti-CD28 (BD Biosciences) a 1 µg/ml durant 5 dies.

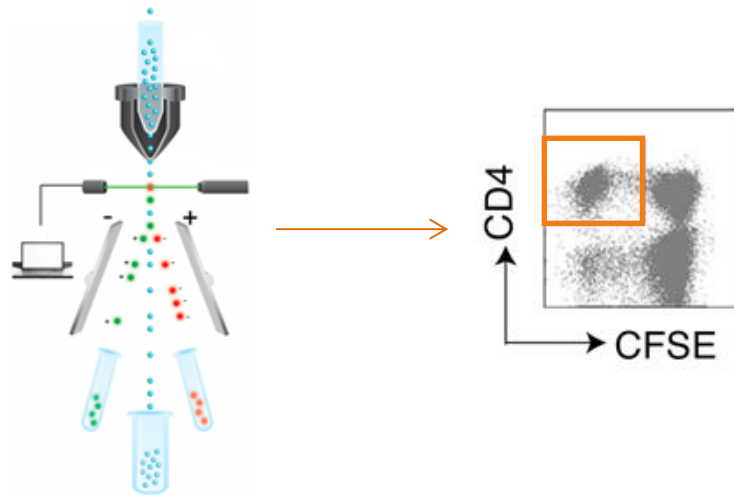


Figura 18. Separació cel·lular per FACS. Esquema que representa l'estratègia usada per separar les cèl·lules gràcies al marcatge d'anticossos monoclonals conjugats amb fluorocroms.

Aïllament del RNA

El RNA total es va aïllar utilitzant el kit RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) i es va realitzar seguint les instruccions del fabricant. La puresa i integritat del RNA es va mesurar utilitzant el Bioanalyzer 2100 (Agilent, Germany) i es va quantificar amb un espectrofotòmetre anomenat NanoDrop (Nanodrop Technologies, DE, USA). Només es van utilitzar les mostres que tenien un valor d'integritat del RNA (RIN) major de 7.0.

Anàlisi de les dades transcriptòmiques

El RNA obtingut de les cèl·lules T CD4⁺ específiques d'antigen provinents del primer estudi, es va hibridar a una micromatriu d'oligonucleòtids (microarray) d'alta densitat anomenat Affymetrix Human Genome U219 ArrayPlate (Affymetrix Santa Clara, CA). Les dades crues es van analitzar utilitzant l'eina Bioconductor (versió 2.132) en R (versió 3.1.03) usant un algoritme ajustat del contingut de guanina-citosina per tal de normalitzar-ho i models lineals de dades de microarray per l'anàlisi d'expressió diferencial.

Les dades crues (.cel files) i les dades processades es poden consultar a través del número d'accés GSE70469 a la plataforma del GEO (*Gene Expression Omnibus*). La signatura transcripcional de Th17 o Th17/Th1 es va obtenir de dades públiques que es troben al GEO (GSE49703).

Reacció en cadena de la polimerasa a temps real (RT-PCR)

El RNA total (250 ng) es va transcriure a DNA complementari utilitzant la transcriptasa reversa (High Capacity cDNA Archive RT kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). La RT-PCR es va realitzar en un sistema ABI PRISM 7500 Fast RT-PCR System (Applied Biosystems) utilitzant sondes Taqman pre-dissenyades (Applied Biosystems).

El gen ACTB (β -actina) es va utilitzar com a gen de referència. Les unitats arbitràries (AU) es van calcular tenint en compte els cicles (C_t) als quals s'expressava l'ACTB i el gen que volíem analitzar en cada cas seguint aquesta fórmula: $2^{-(C_t \text{ ACTB} - C_t \text{ gen})} * 10000$ en els experiments fet amb cèl·lules i $2^{-(C_t \text{ ACTB} - C_t \text{ gen})} * 100000$ en el cas de les biòpsies.

Marcatge de superfície de $\beta 7$

Per determinar l'expressió de la integrina $\beta 7$ en les cèl·lules CFSE⁻ CD4⁺ es va fer servir l'anticòs anti-integrina $\beta 7$ (clon FIB504; BD Biosciences). Després de cultivar les cèl·lules durant una setmana amb TT, FlaX, A4-fla2 i YidX, aquestes es rentaven i marcaven amb aquest anticòs monoclonal i s'analitzaven utilitzant el FACS.

Aïllament i cultiu de criptes intestinals humanes

Les criptes epitelials es van aïllar tal i com s'havia descrit anteriorment²⁷⁶ a partir d'una peça de teixit procedent de mostres de quiròfan de pacients sense MII. Les criptes (30/25 μ l de Matrigel (BD Biosciences)) es van cultivar en medi complet o en el medi que contenia els sobrenedants de les cèl·lules específiques aïllades anteriorment.

El medi complet conté els següents components: medi Dulbecco's Eagle/F12, GlutaMax, N-2 i B-27 sense àcid retinoic (tot de Thermo Fisher Scientific), 10 mmol/L HEPES, 1 mmol/L N-acetyl-Lcysteine, 1mmol/L d'àcid valproic i normocina 100 mg/mL (tot de Sigma-Aldrich), 500 ng/mL RSP01 (Sino Biologicals, China), 100 ng/ml de Noggin humà (Peprotech, RockyHill, NJ) i 500 nmol/L LY2157299 (Axon Med Chem, The Netherlands).

En el primer estudi, les criptes es cultivaven amb els sobrenedants obtinguts de re-estimar les cèl·lules CFSE⁻CD4⁺ específiques pels diferents antígens amb anti-CD3 i anti-CD28 a 1 µg/ml durant 5 dies. La IL-17 es va neutralitzar gràcies a la pre-incubació d'aquests sobrenedants amb un anticòs monoclonal anti-IL17A (R&D Systems).

En canvi, en el segon estudi les criptes s'estimulaven amb els sobrenedants obtinguts de reestimar les cèl·lules CFSE⁻CD4⁺ específiques novament amb YidX o FrvX en presència del BI119 i de cèl·lules autòlogues (Figura 19). Després de 18 hores en cultiu, el RNA de les criptes va ser extret i analitzat transcripcionalment mitjançant la RT-PCR.

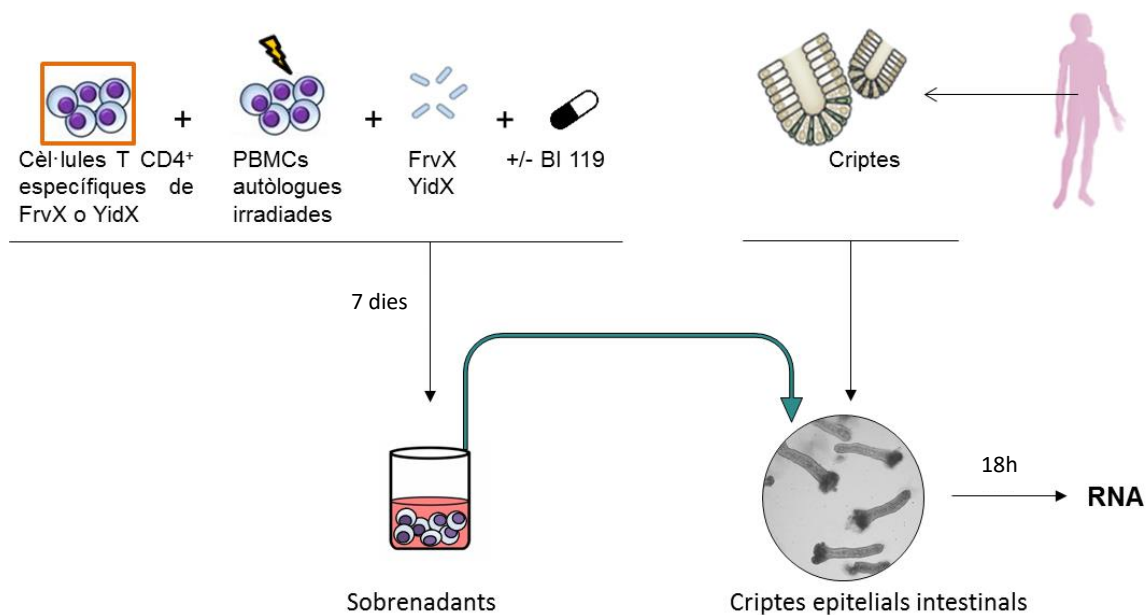


Figura 19. Cultiu de les criptes intestinals amb els sobrenedants. Esquema que mostra el procediment usat per cultivar les criptes epitelials humanes amb els sobrenedants procedents de cèl·lules T CD4⁺ específiques d'antigen que s'havien re-estimulat en presència de BI119 o de DMSO.

Obtenció i cultiu de biòpsies intestinals de pacients amb MC

Les biòpsies intestinals (4-6 biòpsies per pacient) es van obtenir de les àrees inflamades (definides per la presència d'úlceres) del còlon i de l'ili dels pacients amb MC activa (Taula 4) que eren sotmesos a una colonoscòpia.

Inicialment es va fer un rentat en medi RPMI 1640 (Lonza, MD, USA) suplementat amb un 10% de sèrum boví fetal (FBS) inactivat (Biosera, France) i amb 100 U/ml de penicil·lina, 100 U/ml d'estreptomicina, 250ng/ml d'amfotericina B, 10µg/ml de sulfat de gentamicina i HEPES a 1,5mM (tot de Lonza). Posteriorment, les biòpsies es van dividir en dues condicions i es van cultivar en presència del compost BI119 a 1µM o del vehicle (DMSO, 1:10000) a 37°C durant 18 hores. El RNA total es va aïllar i posteriorment es va realitzar l'anàlisi transcripcional mitjançant la RT-PCR.

Model murí de colitis a partir de la transferència de les cèl·lules CD4⁺CD45RB^{high}

Per tal de realitzar els experiments *in vivo*, es van fer servir femelles de la soca CB6F1 com a donants de cèl·lules i femelles de la soca CB.17 amb immunodeficiència severa combinada (SCID) com a receptors (Jackson Labs, Sacramento, CA). Durant dues setmanes els ratolins es van aclimatar en un estabulari lliure de patògens amb cicles de 12 hores de llum i 12 hores de foscor. Tots els ratolins usats tenien 8-10 setmanes d'edat i estaven proveïts de menjar i aigua ad libitum.

Els ratolins CB6F1 es van sacrificar i se'ls hi van extreure les melses. Després d'homogeneïtzar-les i de fer una lisi dels eritròcits, es va fer un enriquiment de les cèl·lules T CD4⁺ utilitzant un kit comercial que ens permetia fer una selecció negativa (Stemcell Technologies, Vancouver, BC). Les cèl·lules enriquides per CD4⁺ es van marcar amb anticossos monoclonals anti-CD4 (clon RM4-5), anti-CD45RB (clon C363-16A) i anti-CD25 (clon PC61) (Thermo Fisher Scientific). Gràcies a l'aparell FACS Aria II (BD Bioscience) es van poder aïllar per separat les cèl·lules CD4⁺CD45RB^{high} i les cèl·lules CD4⁺CD45RB^{low}. Posteriorment, es va realitzar una injecció intraperitoneal de 5x10⁵ cèl·lules CD4⁺CD45RB^{high} a un grup de ratolins CB.17 SCID.

Un grup separat de ratolins va rebre la mateixa quantitat de cèl·lules $CD4^+CD45RB^{low}$ que no són colitogèniques i s'usen com a control (Figura 20). També es va fer servir un grup de ratolins CB.17 SCID com a control

Tots els ratolins es van pesar setmanalment i es van comprovar tots els signes clínics de malaltia com l'erecció del pèl, la presència d'una postura corbada, la disminució de la turgència de la pell i l'aparició de crostes als ulls. Els animals es van sacrificar quatre setmanes després de la transferència de les cèl·lules o quan el pes corporal havia disminuït en un 20% respecte el pes inicial.

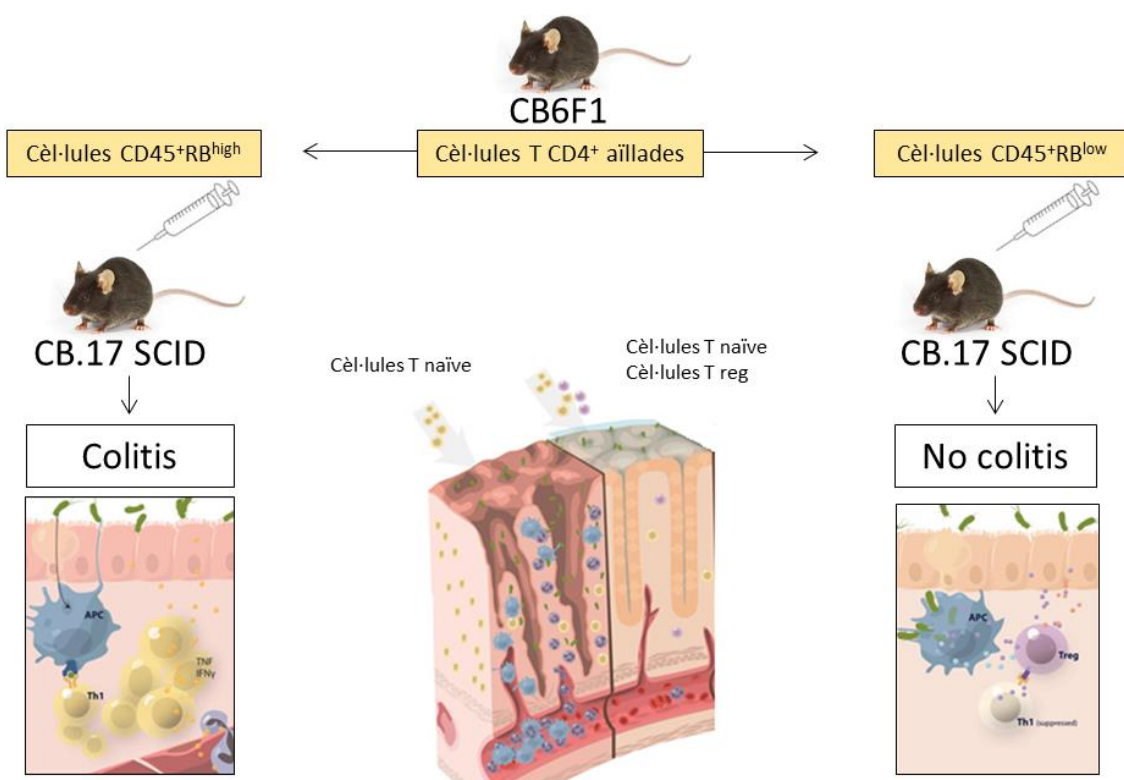


Figura 20. Generació del model murí de colitis. Esquema que mostra com es genera el model murí de colitis basat en la transferència de cèl·lules $T CD4^+CD45RB^{high}$.

Dosificació del compost BI119 en els ratolins

El compost BI119 es va dissoldre amb l'ajuda d'un homogeneïtzador dounce en una solució anomenada MC/tween que contenia un 0.5% de metilcel·lulosa i un 0.015% de polisorbato 80. Es van administrar 100 mg/kg del BI119 dissolt en aquesta solució a un grup de ratolins $CD4^+CD45RB^{high}$ mitjançant la tècnica de gavage oral. La dosificació d'aquest compost es va fer immediatament abans de fer la transferència d'aquestes

cèl·lules i després es va realitzar dos cops al dia durant 4 setmanes. A més, es va afegir un grup control que també havia rebut aquestes cèl·lules CD4⁺CD45RB^{high} però que era tractat només amb vehicle.

Anàlisi del teixit intestinal dels ratolins

Els còlons extrets es van rentar i posteriorment es van mesurar i pesar. Es va aïllar una peça de 2cm i es va fixar amb formalina 10%. Aquestes peces es van incloure en parafina i es van tenyir amb Hematoxilina-eosina (H&E) seguint el procediment estàndard. Les mostres van ser avaluades per un patòleg que no sabia quin tractament havien rebut aquests ratolins. Es van avaluar entre 3 i 5 seccions de teixit per cada ratolí. A cada mostra se li va atorgar un valor del 0 al 5 per cadascun dels següents paràmetres: canvis epitelials, inflamació de la mucosa i pèrdua de criptes. Els valors de cada paràmetre es sumaven de manera que s'obtenia un valor total per a cada ratolí. A més, es va mesurar el gruix de la mucosa mesurant la longitud de la cripta del còlon com a indicador de la hiperplàsia epitelial.

Mesurament de la lipocalina en les mostres fecals dels ratolins

Les mostres fecals es van resuspendre en 1ml de Tris buffer que contenia inhibidor de les proteases i es van disgregar gràcies a l'ús d'un homogeneïtzador (Bead Ruptor 4 Homogenizer). Posteriorment es van recollir els sobrenedants després de centrifugar per tal d'eliminar la matèria insoluble. Els sobrenedants es van normalitzar per pes fecal a 10 mg/ml i a continuació es van mesurar els nivells de lipocalina utilitzant un ELISA comercial (R&D Systems) que es va realitzar seguint el protocol del fabricant. Els resultats es van convertir a pg de lipocalina per mg de femta.

Mesurament de CD14 soluble en el plasma dels ratolins

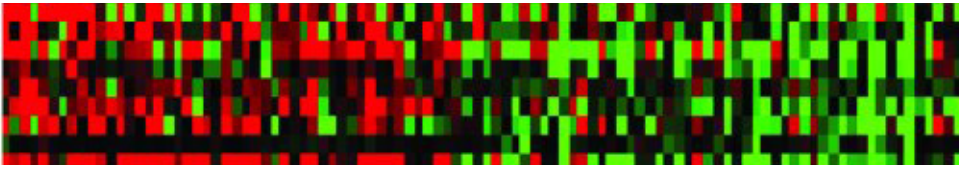
El dia del sacrifici, es va recollir sang dels ratolins realitzant una punció intracardíaca en tubs heparinitzats i després d'una centrifugació es va obtenir el plasma. Per mesurar el CD14 plasmàtic es va utilitzar un ELISA comercial (R&D Systems) que es va realitzar seguint el protocol del fabricant.

Anàlisi estadístic

L'anàlisi estadístic es va dur a terme utilitzant l'eina Bioconductor en R (V. 3.4.2). En els experiments realitzats amb mostres humanes, les diferències entre variables contínues van ser analitzades utilitzant un test no paramètric (test Mann-Whitney-Wilcoxon no aparellat o aparellat, en funció de cada cas). L'anàlisi unidireccional de la variància es va fer amb els tests Kruskal-Wallis o Friedman, seguits d'una correcció Dunn post-test. Les associacions es van analitzar utilitzant la correlació de Spearman.

Pel que fa als experiments amb ratolins, el test de significança es va fer utilitzant l'ANOVA i corregint les comparacions múltiples amb el test de Sidak's. Per a la puntuació usada per mesurar la histopatologia es va utilitzar el test de Kruskal-Wallis amb la correcció de comparacions múltiples.

Les barres d'error representen la mitjana i el SEM (*standard error of the mean*). Els P valors es van ajustar utilitzant el *fdr (false discovery rate)* i es van considerar estadísticament significatius quan eren iguals o més petits que 0.05.



RESULTATS

ESTUDI I: Els limfòcits T CD4⁺ específics contra antígens de la microbiota comensal exhibeixen un fenotip Th17 proinflamatori en pacients amb MC

Els limfòcits T CD4⁺ dels pacients amb MC presenten una proliferació augmentada enfront d'antígens de la microbiota comensal

Per tal de dur a terme aquest primer estudi es van utilitzar PBMCs procedents d'individus sans i de pacients amb MC, les dades demogràfiques i clíniques dels quals s'inclouen en la Taula 2.

El primer pas va consistir en mesurar la proliferació de les PBMCs de controls i de pacients amb MC contra ASCA-Ag, CBir1, FlaX, A4-Fla2 i YidX. La informació sobre aquests antígens de la microbiota comensal està inclosa en la Taula 5. Aquests antígens van ser seleccionats perquè en estudis previs s'havien detectat anticossos contra aquests en el sèrum de pacients amb MC^{15, 54, 57}.

Així doncs, per tal de mesurar la proliferació de les PBMCs vam utilitzar una tècnica radioactiva que es basa en el recompte de la incorporació de timidina tritiada. Els pacients amb MC (n=16) van presentar un índex d'estimulació (SI) significativament més elevat en resposta a FlaX, A4-fla2 i YidX comparat amb el dels controls sans (n=11) (Figura 21A). Aquest SI es va definir com un factor de canvi obtingut de comparar la proliferació assolida en cada condició vers la proliferació de les PBMCs que no havien estat estimulades.

D'altra banda, la proliferació detectada es va poder associar majoritàriament a les cèl·lules T CD4⁺ ja que vam demostrar que en bloquejar amb un anticòs monoclonal el MHC II, aquesta proliferació s'inhibia de manera específica (Figura 21B).

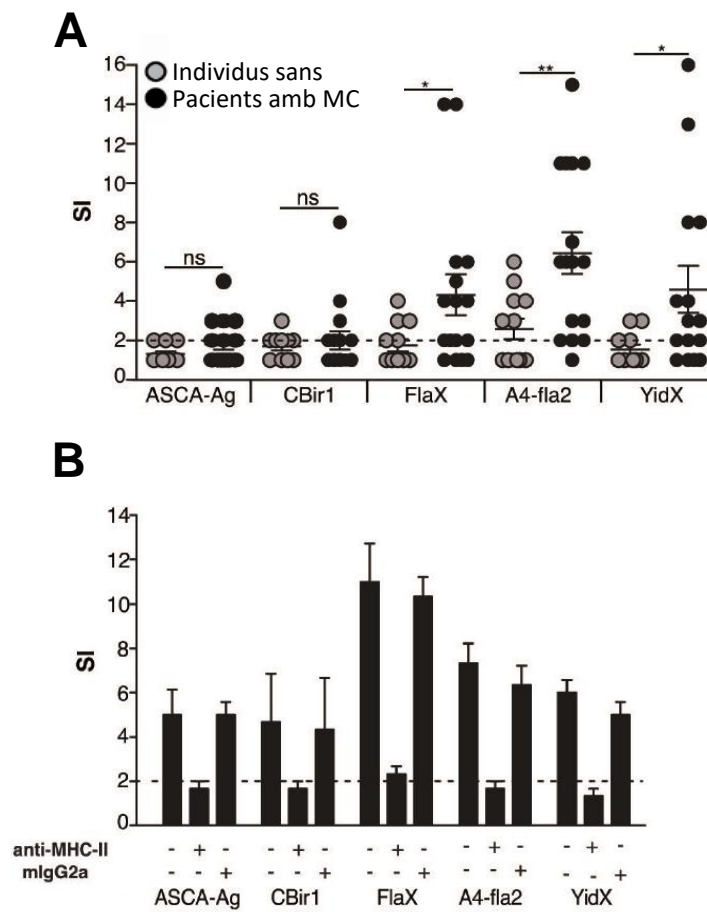


Figura 21: Resposta exacerbada de les PBMCs dels pacients amb MC contra diferents antígens de la microbiota comensal. (A) La proliferació de les PBMCs es va mesurar utilitzant la incorporació de timidina tritiada en donants sans (n=11) i en pacients amb MC (n=16) cultivades en presència de diferents antígens durant 7 dies. SI: recomptes per milió de cèl·lules estimulades/cèl·lules sense estimular. La línia discontinua es va establir en un SI de 2 i indica el llindar a partir del qual es considera que hi ha hagut proliferació. (B) Es va mesurar la proliferació de les PBMCs de pacients diferents (n=3) durant 7 dies utilitzant la mateixa tècnica però aquest cop afegint un anticòs monoclonal anti-MHC II (anti-HLA-DP-DR-DQ) o un control d'isotip (mlgG2). Mitjana \pm SEM. ns>.05, *P \leq .05, **P \leq .01.

Per tal d'identificar i caracteritzar amb més detall aquestes cèl·lules T CD4⁺ que responien enfront dels antígens, vam usar l'assaig del CFSE per poder quantificar el percentatge de cèl·lules T CD4⁺ que proliferaven després de l'estimulació antigènica (Figura 22A).

En aquest assaig es va incloure el TT com a control de la proliferació, ja que era un antigen bacterià que no estava relacionat amb la microbiota comensal i contra el qual esperàvem obtenir resposta, ja que la major part de la població està vacunada contra aquest.

Per aquest experiment es va fer servir una cohort diferent de donants sans (n=18) i de pacients amb MC (n=21). En consonància amb els resultats obtinguts anteriorment, el percentatge de les cèl·lules T CD4⁺ que van proliferar (les cèl·lules CFSE⁻) va ser significativament superior en pacients que en controls en les condicions on s'estimulava amb FlaX, A4-fla2 i YidX (Figura 22B).

En canvi, resulta molt interessant observar que el percentatge de cèl·lules T CD4⁺ que van proliferar contra TT és comparable entre controls i pacients, recolzant que aquest increment de la reactivitat de les cèl·lules a components de la microbiota comensal és una característica pròpia dels pacients amb MC.

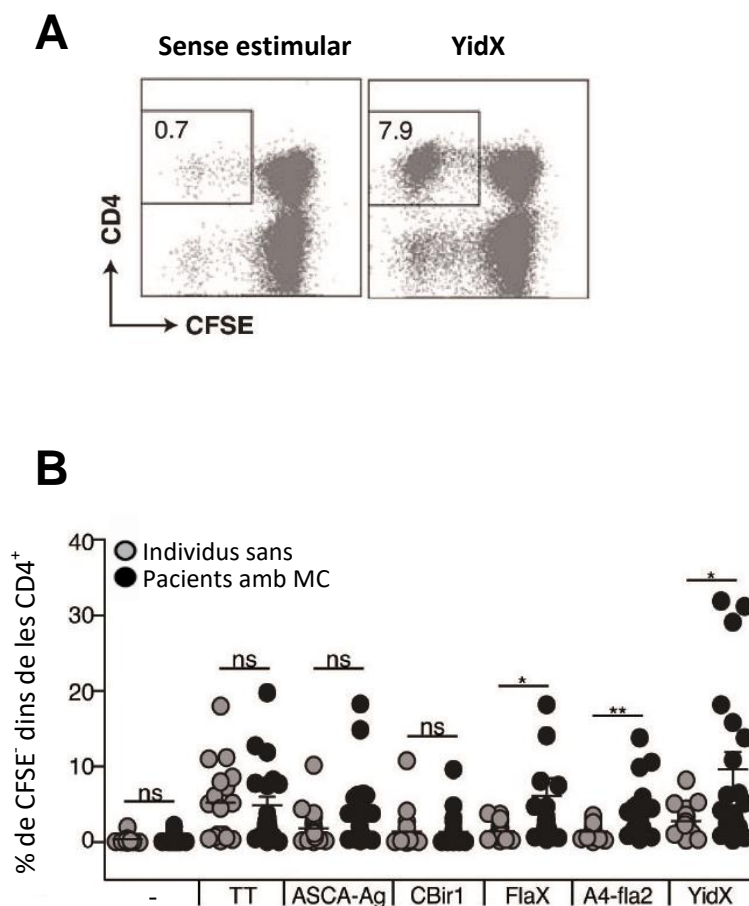


Figura 22: Major proliferació de les cèl·lules T CD4⁺ dels pacients amb MC contra diferents antígens de la microbiota comensal comparada amb la resposta en donants sans. (A) Gràfic de punts representatiu que mostra el marcatge de CFSE i de CD4 en cèl·lules sense estimular i en cèl·lules que han estat estimulades durant 7 dies amb YidX. (B) Percentatge de cèl·lules T CD4⁺ que han proliferat (CFSE⁻) del total de les PBMCs de donants sans (n=18) i de pacients amb MC (n=21). Mitjana ± SEM. ns>.05, *P≤.05, **P≤.01.

A partir d'aquí ens vam centrar en els antigens FlaX, A4-fla2 i YidX degut a que eren els antigens que donaven lloc a una proliferació major en pacients amb MC (Figura 21A i Figura 22B).

A més, vam voler analitzar la co-ocurrència de la reactivitat de les cèl·lules T CD4⁺ específiques pels diferents antigens. En la Figura 23A es mostra l'anàlisi de les dades que apareixen a la Figura 21A. S'observa que el 75% dels pacients (12 de 16) reaccionaven com a mínim a un d'aquests tres antigens rellevants (determinant la presència de proliferació quan el SI era superior a 2). D'aquests pacients, el 83% (10 de 12) reaccionaven a més d'un antigen.

Si ens fixem en l'altra cohort de pacients, els inclosos en la Figura 22B, veurem que més del 60% (14 de 21) mostraven reactivitat de les cèl·lules T CD4⁺ com a mínim a un dels tres antigens rellevants. D'aquests, el 78% (11 de 14) responien a més d'un antigen alhora (Figura 23B).

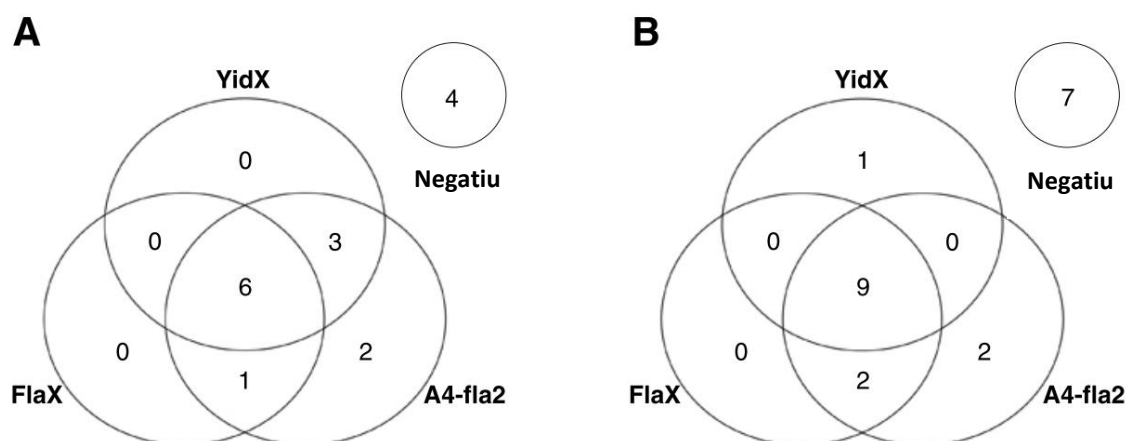


Figura 23: Co-ocurrència de la reactivitat de les cèl·lules T CD4⁺ enfront dels diferents antigens comensals. Diagrama de Venn que representa el nombre de pacients amb MC que responen a FlaX, A4-fla2 i/o YidX. (A) Resultats referents als pacients inclosos en la Figura 21A. La reactivitat a un antigen donat es considera positiva quan el SI és superior a 2. (B) Resultats referents als pacients inclosos en la Figura 22B. La reactivitat a un antigen es defineix com un percentatge absolut de cèl·lules CFSE⁻ CD4⁺ (% CFSE⁻ contra antigen - % CFSE⁻ sense estimular) de la mitjana més la desviació estàndard de les cèl·lules CFSE⁻ CD4⁺ (% CFSE⁻ contra antigen - % CFSE⁻ sense estimular) d'un grup de donants sans (n=18) per cadascun dels tres antigens.

El següent que vam voler determinar van ser les respostes serològiques contra FlaX, A4-fla2 i YidX en els donants sans (n=18) i en els pacients amb MC (n=19) dels que haguéssim mesurat prèviament la resposta específica d'antigen (els analitzats a la Figura 22B) i dels quals disposéssim sèrum.

La Figura 24A mostra en un gràfic de dispersió la quantitat d'IgG sèrica contra FlaX, A4-fla2 i YidX present en pacients. Més del 70% de pacients (14 de 19) presentaven una resposta T CD4⁺ i/o una resposta d'anticossos. El 85% d'aquests (12 de 14) tenien una resposta combinada d'anticossos i limfòcits T CD4⁺ com a mínim a un dels tres antígens rellevants (Figura 24B).

Tanmateix, si ens fixem en cada antigen per separat, trobarem que el 54% (6 de 11), 58% (7 de 12) i 58% (7 de 12) dels pacients presentaven respostes combinades d'anticossos i limfòcits T CD4⁺ contra FlaX, A4-fla2 i YidX, respectivament (Figura 24C).

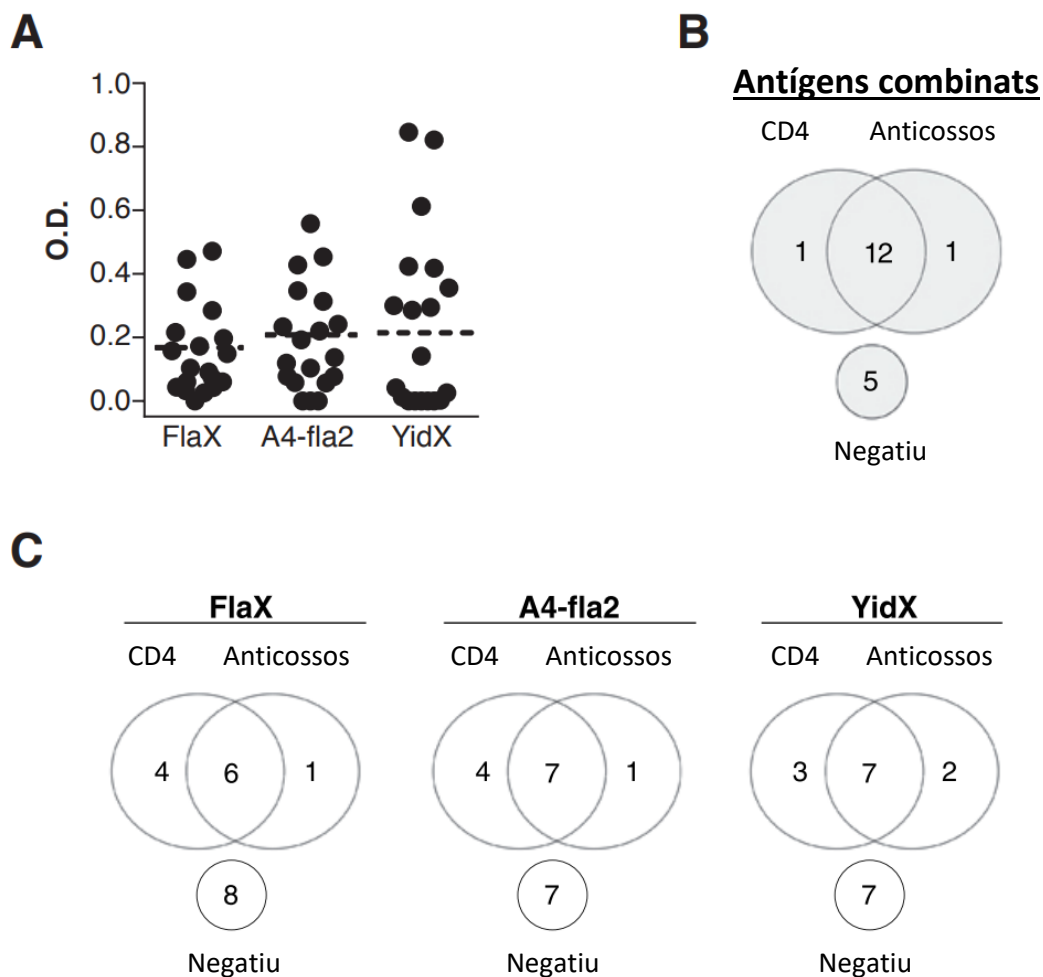


Figura 24: Resposta combinada d'anticossos i limfòcits T CD4⁺ a antígens de la microbiota comensal en pacients amb MC. (A) Gràfic de dispersió mostrant els valors d'IgG contra FlaX, A4-fla2 i YidX. La positivitat serològica a cada antigen independent es va determinar quan el valor d'O.D. era major al de la mitjana més la desviació estàndard en un grup de donants sans (n=18). La línia horitzontal discrimina els valor positius (aquells que queden per damunt de la línia) dels negatius (els que queden per sota). (B) Diagrama de Venn representant el nombre de pacients amb MC que responen a un o més antígens microbians o (C) a cada antigen per separat. La reactivitat dels limfòcits T CD4⁺ a un antigen donat es defineix com un percentatge absolut de cèl·lules CFSE⁻CD4⁺ (% CFSE⁻ contra antigen - % CFSE⁻ sense estimular) de la mitjana més la desviació estàndard de les cèl·lules CFSE⁻CD4⁺ (% CFSE⁻ contra antigen - % CFSE⁻ sense estimular) d'un grup de donants sans (n=18).

En conjunt, en aquesta primera part de l'estudi vam poder demostrar que els pacients amb MC presenten una resposta T CD4⁺ incrementada en resposta a FlaX, A4-fla2 i YidX, i que aquesta es correlaciona en la major part dels casos amb la presència d'IgG en sèrum.

Relació entre les respostes de la immunitat adaptativa i les característiques de la MC

A més d'això, vam voler analitzar l'associació de la presència d'anticossos i de cèl·lules T CD4⁺ específiques d'antigen amb les característiques dels pacients (incloses en la Taula 2) i amb el tractament que rebien en el moment de l'estudi.

Tot i que no vam trobar cap associació entre la resposta de limfòcits T CD4⁺ i cap de les variables dels pacients, vam observar una associació positiva entre la presència d'anticossos contra YidX i una localització de la malaltia ileocolònica (L3) (Figura 25A).

A més, també vam observar una associació de la presència d'anticossos contra YidX amb la durada de la malaltia (Figura 25B).

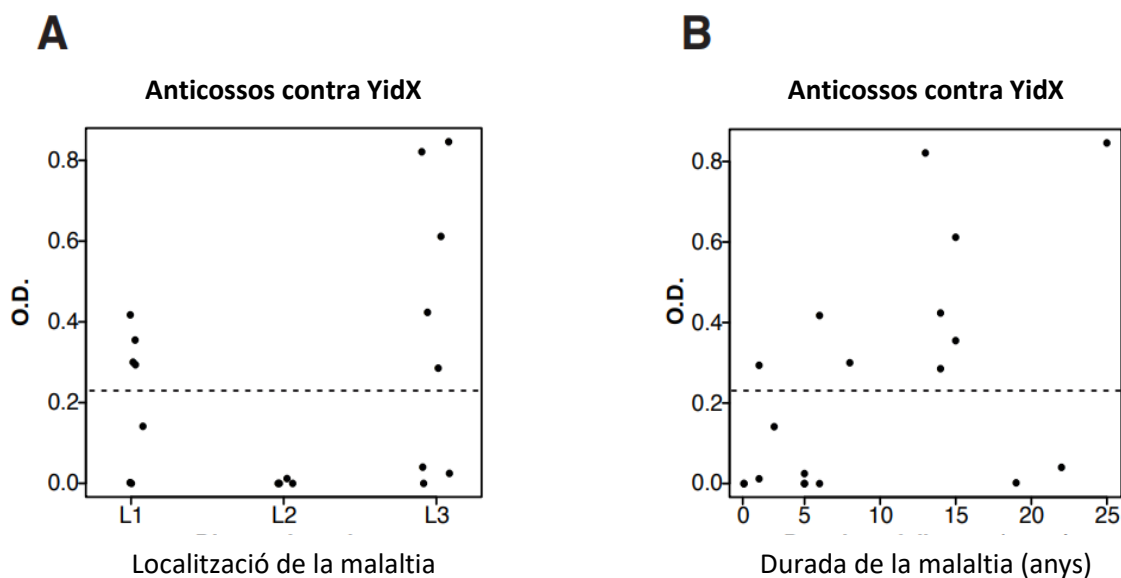


Figura 25: Associació d'anticossos específics contra YidX amb les característiques dels pacients. Aquesta associació es va determinar en el sèrum dels pacients amb MC (n=19) amb (A) la localització de la malaltia (test de Kruskal-Wallis P=.04) i amb (B) la durada de la malaltia mesurada en anys (test de correlació de Spearman P=.01, r=.5). La línia discontinua es va establir a una O.D.=.216. i indica el llindar per la resposta serològica positiva.

El limfòcits T CD4⁺ de pacients amb MC que reaccionen específicament contra FlaX, A4-fla2 i YidX presenten un fenotip proinflamatori Th1 i Th17

El següent pas va consistir en determinar el perfil de citocines que tenien els limfòcits T CD4⁺ en resposta als diferents antígens microbians. Per fer-ho, vam mesurar l'IFN- γ i la IL-17 en els sobrenedants dels cultius de les PBMCs que havíem estimulat durant 7 dies amb TT, FlaX, A4-fla2 i YidX mitjançant la tècnica d'ELISA. Vam voler analitzar l'IFN- γ i la IL-17 perquè són les citocines característiques de les poblacions Th1 i Th17, respectivament, i han estat associades amb la inflamació intestinal present a la MC.

Les dues citocines es trobaven significativament incrementades en els sobrenedants de les cèl·lules dels pacients que s'havien cultivat amb FlaX, A4-fla2 i YidX comparades amb les dels controls (Figura 26A i 26B). És interessant observar que en la condició sense estimular i en la condició que havia estat estimulada amb TT no hi havia diferències en la secreció d'IFN- γ ni en la d'IL-17 entre controls i pacients.

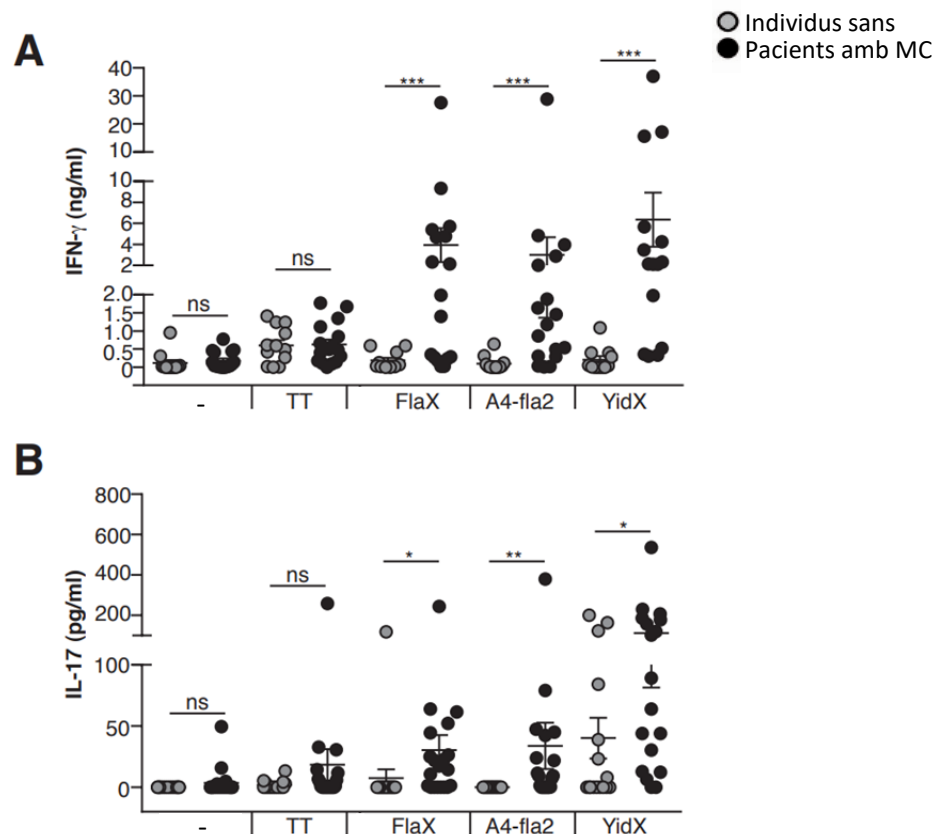


Figura 26: Les PBMCs dels pacients amb MC estimulades amb els antígens de la microbiota comensal mostren més secreció d'IFN- γ i d'IL-17. (A) IFN- γ i (B) IL-17 mesurada per ELISA en els sobrenedants obtinguts després de cultivar les PBMCs de donants sans (n=16) i de pacients amb MC (n=20) durant 7 dies amb antígens microbians. Mitjana \pm SEM. ns>.05, *P \leq .05, **P \leq .01.

Per mesurar de manera específica les citocines produïdes per les cèl·lules T CD4⁺ que havien proliferat enfront de cada antigen, vam fer un marcatge intracel·lular de l'IFN-γ i de la IL-17 en PBMCs marcades amb CFSE i cultivades amb TT, FlaX, A4-fla2 i YidX (Figura 27A) en una cohort independent de pacients amb MC (n=9) i de controls (n=8).

Vam poder observar que les cèl·lules T CD4⁺ que proliferaven enfront de TT produïen principalment IFN-γ (Figura 27B) tant en controls com en pacients. En canvi, els limfòcits T CD4⁺ que havien proliferat específicament contra FlaX, A4-fla2 i YidX presentaven un perfil mixt que contenia les dues citocines. El percentatge de les cèl·lules que únicament produïen IFN-γ (limfòcits Th1) era similar en pacients i controls. En canvi, vam observar freqüències significativament majors de cèl·lules T CD4⁺ que únicament produïen IL-17 (limfòcits Th17) o totes dues citocines (limfòcits Th17/Th1) enfront de FlaX, A4-fla2 i YidX en pacients (Figura 27C i D).

Aquests resultats indiquen que els limfòcits T CD4⁺ específics per aquests antígens de la microbiota comensal presenten un fenotip Th17 i Th17/Th1 en pacients amb MC.

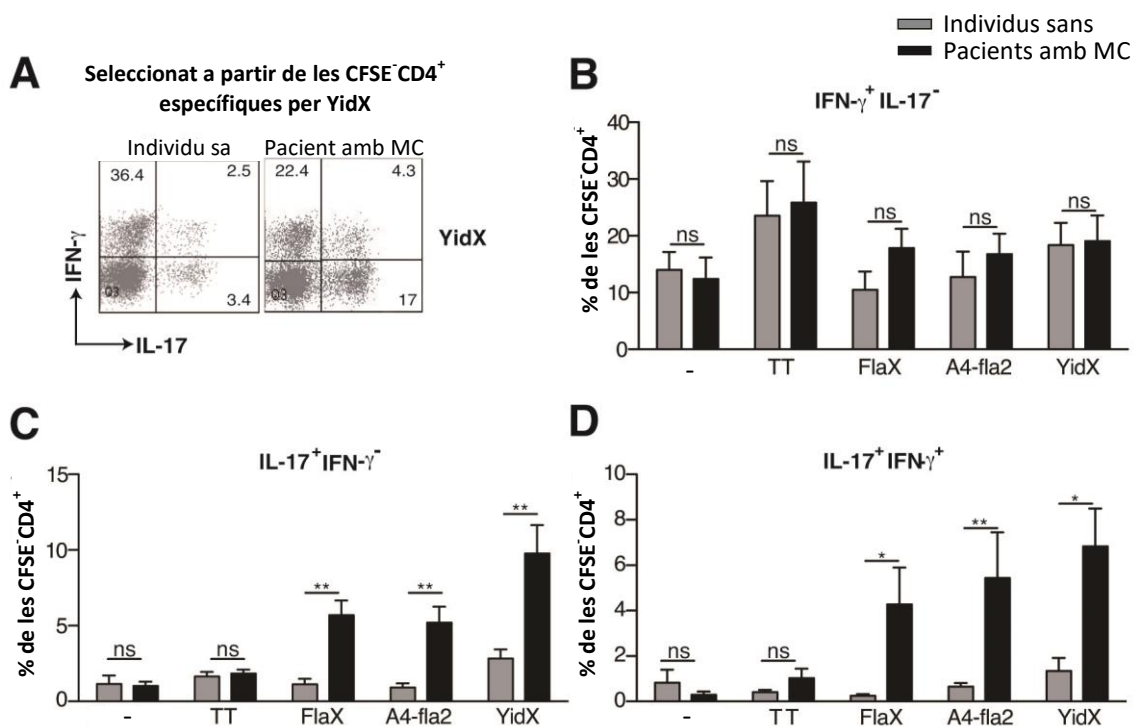


Figura 27: Les cèl·lules T CD4⁺ específiques per FlaX, A4-fla2 i YidX dels pacients amb MC presenten un fenotip proinflamatori Th17/Th1. Les PBMCs marcades amb CFSE de donants sans (n=8) i de pacients amb MC (n=9) es van cultivar soles o en presència de TT, FlaX, A4-fla2 o YidX durant 7 dies. (A) Gràfic representatiu del marcatge intracel·lular d'IFN-γ i d'IL-17 seleccionat a partir de les cèl·lules vives que havien proliferat contra YidX (CFSE⁺). Freqüència de cèl·lules (B) IFN-γ⁺IL17⁻, (C) IL17⁺IFN-γ⁻ i (D) IL17⁺IFN-γ⁺ del total de cèl·lules vives CFSE⁺CD4⁺. Mitjana ± SEM. ns>.05, *P≤.05, **P≤.01.

Els limfòcits T CD4⁺ específics pels antígens de la microbiota comensal dels pacients amb MC presenten una signatura transcripcional relacionada amb la població Th17

El següent pas va consistir en estimular PBMCs amb FlaX, A4-fla2 i YidX que prèviament havien estat marcades amb CFSE i separar les cèl·lules T CD4⁺ que havien proliferat i que per tant havien perdut la fluorescència del CFSE mitjançant la tècnica del FACS.

Per fer aquest experiment es van fer servir mostres de controls (n=8) i de pacients amb MC (n=10). Les cèl·lules aïllades (CFSE⁻CD4⁺) es van reestimar amb el mateix antígen contra el qual havien reaccionat anteriorment i es van cultivar amb PBMCs autòlogues que havien estat irradiades i que es van fer servir com a APCs. El RNA total de les cèl·lules T CD4⁺ específiques d'antigen que havien estat expandides es va aïllar i es va procedir a fer un anàlisi transcripcional utilitzant la tècnica del microarray.

L'anàlisi de l'expressió diferencial ens va permetre identificar 299 gens que s'expressaven de manera significativament diferent en pacients i controls (considerant un factor de canvi igual o superior a 1.5). De tots aquests gens, un total de 37 pertanyen a les signatures transcripcionals de les cèl·lules Th17 i Th17/Th1 i apareixen marcats de color lila a la Figura 28. Entre aquests gens trobem una sobreexpressió de CCR6, IL17F, RORC, CCL20 i IL26 en els pacients amb MC, mentre que veiem menor expressió de PTGER2.

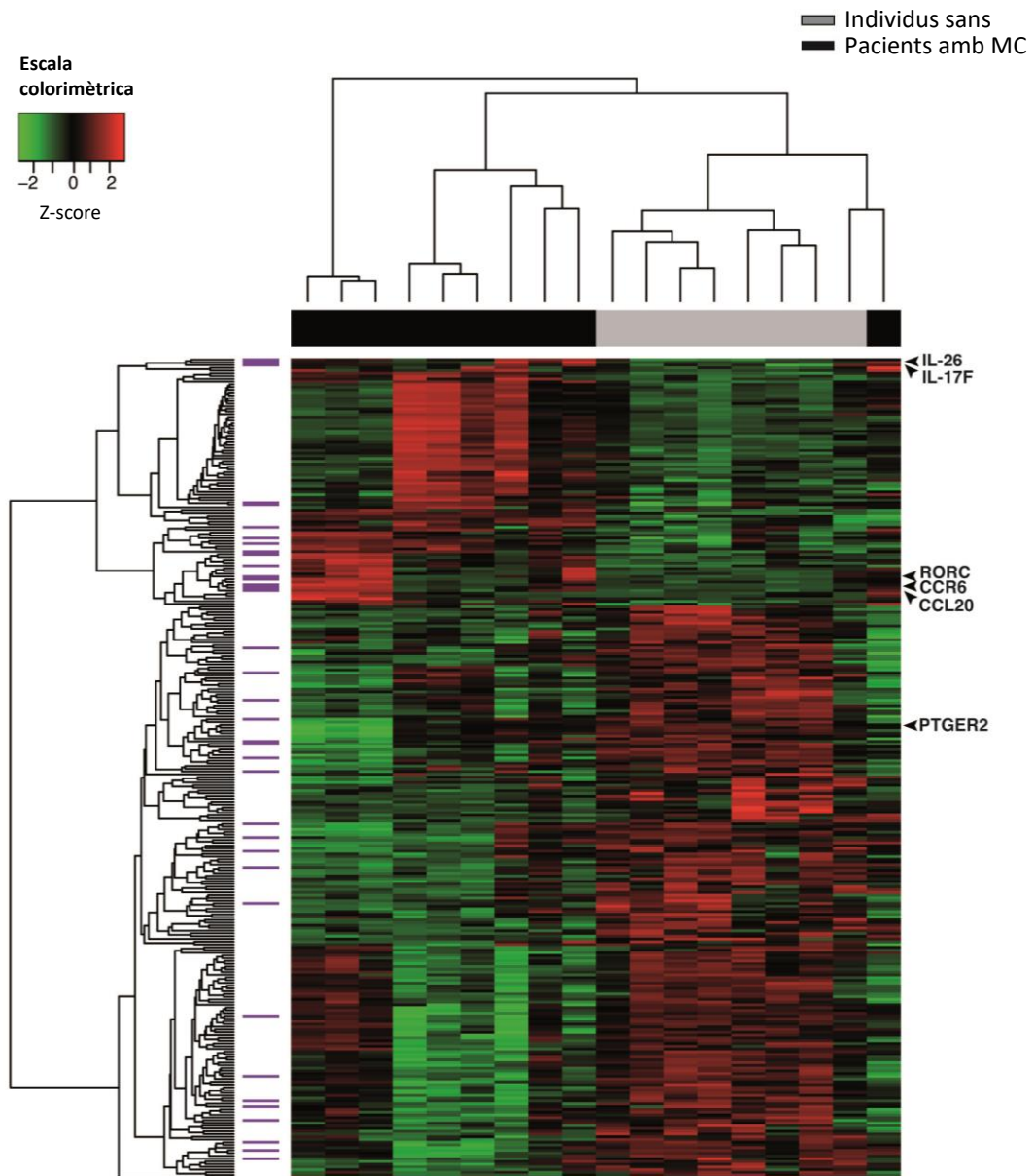


Figura 28: Les cèl·lules T CD4⁺ de pacients amb MC específics contra FlaX, A4-fla2 i YidX presenten un perfil transcripcional Th17. Els gens diferencialment expressats en les cèl·lules T CD4⁺ de controls (n=8) i de pacients amb MC (n=10) que reaccionen contra els diferents antigens de la microbiota basats en l'anàlisi de microarray (P<.05 i factor de canvi ≥ 1.5). Cada fila representa un gen i cada columna una mostra diferent. Els gens relacionats amb la signatura transcripcional Th17 i Th17/Th1 estan marcats de color lila.

Per tal de validar els resultats obtinguts d'aquest microarray, es va analitzar l'expressió de diferents gens de la família Th1 i Th17 per RT-PCR en cèl·lules T CD4⁺ aïllades d'una cohort on s'inclouïen nous donants sans (n=5) i nous pacients amb MC (n=6).

Gràcies a la tècnica de RT-PCR vam poder confirmar que les cèl·lules específiques per FlaX, A4-fla2 i YidX dels pacients amb MC presentaven una major expressió de RORC, IL17A i IL17F (Figura 29A-C).

A més, en les cèl·lules dels pacients que havien reaccionat contra A4-fla2 i YidX també trobàvem una major expressió de CCR6 i de CCL20 però una menor expressió de PTGER2, en concordança amb els resultats obtinguts en el microarray (Figura 29D-F).

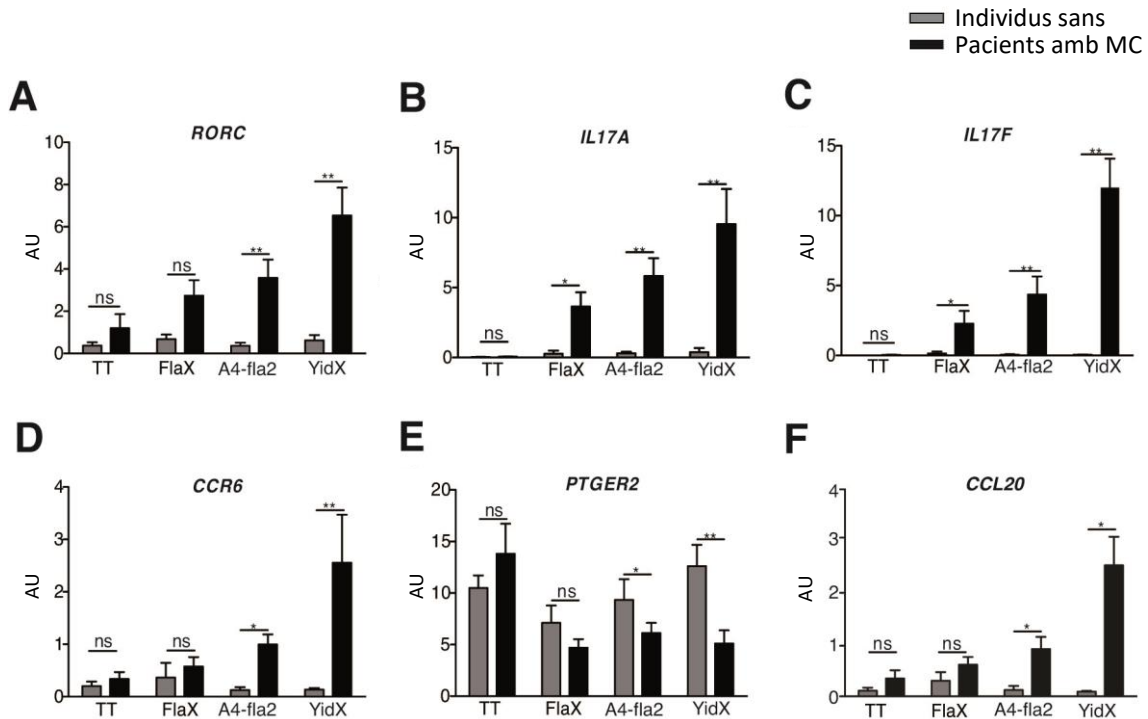


Figura 29. Expressió diferencial dels gens relacionats amb la població Th17 en les cèl·lules T CD4⁺ de pacients amb MC específiques pels antígens de la microbiota comensal. Expressió del mRNA de (A) RORC, (B) IL17A, (C) IL17F, (D) CCR6, (E) PTGER2 i (F) CCL20 mesurats mitjançant la tècnica de RT-PCR en les cèl·lules T CD4⁺ aïllades i expandides de diferents controls (n=5) i pacients amb MC (n=6). Mitjana ± SEM. ns> .05, *P ≤ .05, **P < .01.

D'altra banda, cal destacar que gens que pertanyen al llinatge Th1 com TBX21 o IFNG, així com també altres gens com el TNFA, s'expressaven d'una manera similar en les cèl·lules procedents de controls i de pacients (Figura 30).

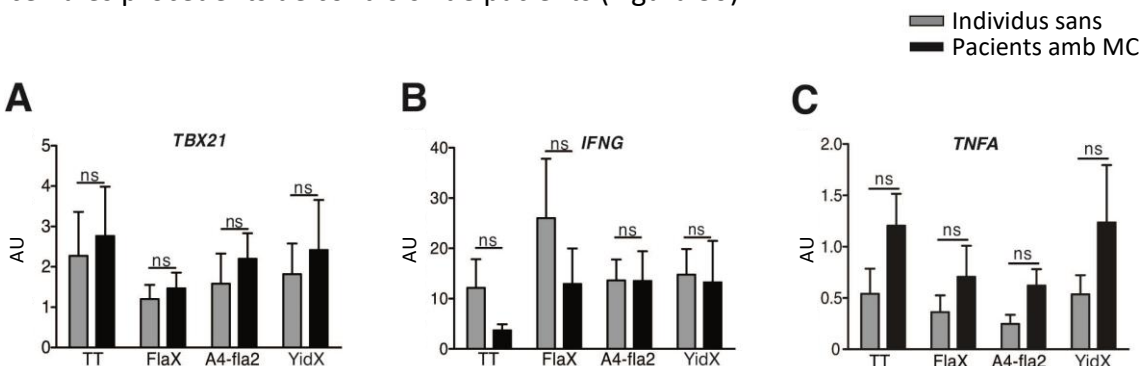


Figura 30. Els gens relacionats amb la població Th1 i el TNFA s'expressen de forma similar en les cèl·lules T CD4⁺ de controls i de pacients. Expressió de mRNA de (A) TBX21, (B) IFNG i (C) TNFA mesurats mitjançant la RT-PCR en les cèl·lules T CD4⁺ aïllades i expandides de diferents controls (n=5) i pacients (n=6). Mitjana ± SEM. ns> .05.

Després d'això, vam voler determinar quines citocines estaven presents en els sobredants d'aquests cultius que contenien les cèl·lules T CD4⁺ que s'havien separat i expandit enfront dels diferents antígens. Per tal de dur a terme aquest anàlisi vam fer servir la tècnica del multiplex que ens permetia mesurar la concentració de diferents citocines a la vegada.

Tal i com podíem predir gràcies a les signatures transcripcionals analitzades anteriorment, els sobredants obtinguts de les cèl·lules específiques contra FlaX, A4-fla2 i YidX contenien grans quantitats d'IL-17A, IL-17F, IL-22 i CCL20 (Figura 31A-D). En canvi, els sobredants que provenien de les cèl·lules que havien proliferat enfront de TT presentaven concentracions molt menors d'aquestes citocines relacionades amb la població de limfòcits Th17.

Pel que fa a la quantitat d'IFN- γ i de TNF- α (Figura 31E i F) vam veure que en tots els sobredants hi havia unes concentracions similars d'aquestes, independentment de l'antigen amb el que haguessin estat estimulades.

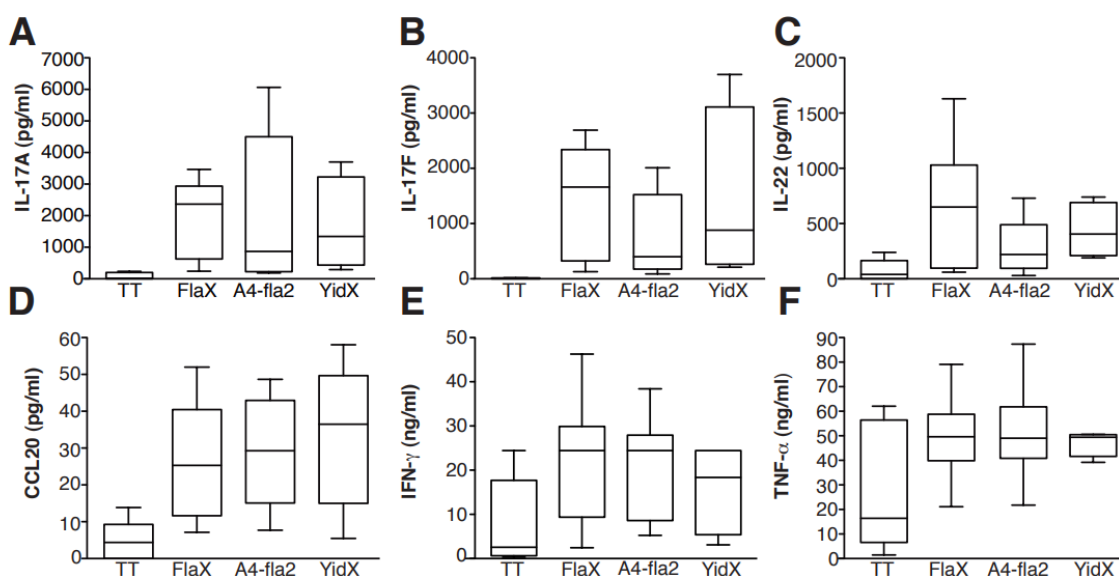


Figura 31. Citocines produïdes per les cèl·lules T CD4⁺ de pacients amb MC que són específiques pels diferents antígens. Mesurament simultani de (A) IL-17A, (B) IL-17F, (C) IL-22, (D) CCL20, (E) IFN- γ i (F) TNF- α gràcies a l'assaig multiplex realitzat en els sobredants de les cèl·lules T CD4⁺ de pacients amb MC (n=5) que eren específiques pels diferents antígens. Mitjana \pm SEM.

Els limfòcits T CD4⁺ que són activats en resposta als diferents antígens de la microbiota comensal expressen més β7 que els limfòcits T CD4⁺ que són activats enfront de TT

Per tal de caracteritzar amb més detall aquestes cèl·lules T CD4⁺ vam analitzar l'expressió de la integrina β7 en un total de 10 pacients amb MC. Ens vam fixar en l'expressió d'aquesta integrina perquè promou el reclutament específic de limfòcits cap a l'intestí.

Vam poder observar una expressió significativament més gran de β7 en les cèl·lules específiques per FlaX, A4-fla2 i YidX comparades amb les que havien proliferat davant de TT (Figura 32A i B).

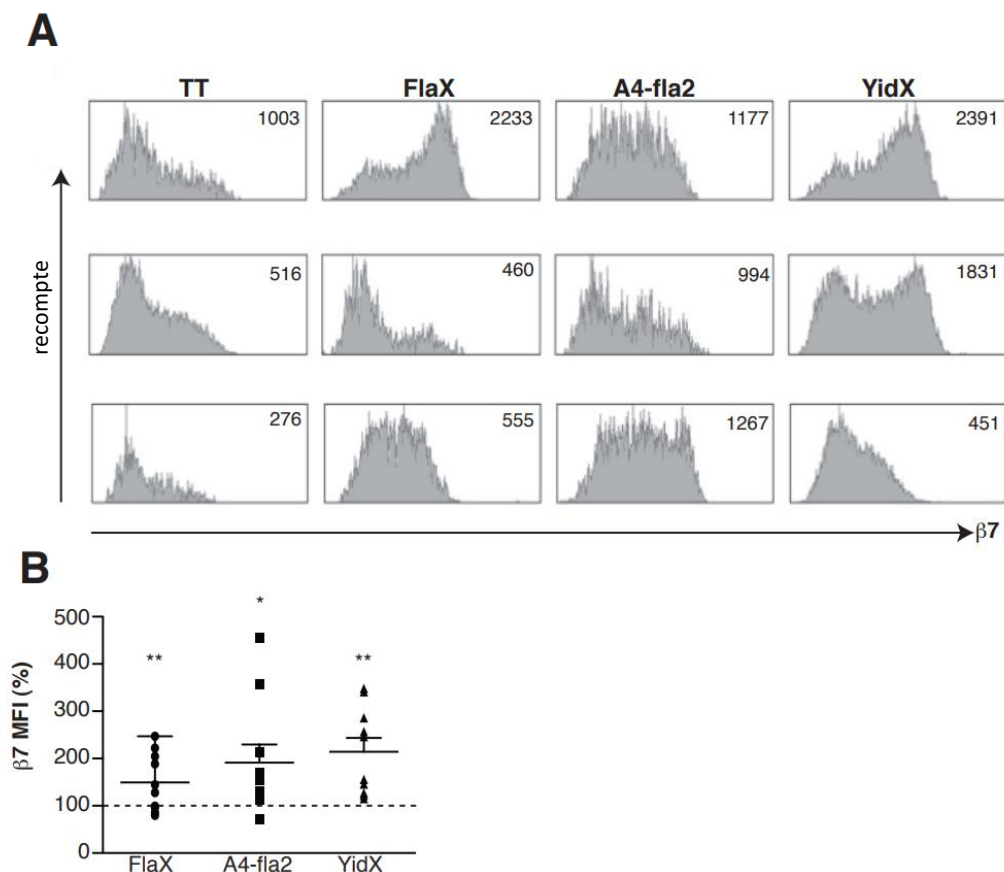


Figura 32. L'expressió de β7 és major en les cèl·lules T CD4⁺ específiques pels antígens de la microbiota comensal que en les cèl·lules específiques per TT. (A) Histogrames que mostren l'expressió de β7 en 3 pacients representatius. Els números representen la intensitat de fluorescència mitjana (MFI) de les cèl·lules CFSE⁺CD4⁺. (B) Percentatge de l'expressió de β7 de les cèl·lules estimulades amb FlaX, A4-fla2 i YidX relatives a les estimulades amb TT. La MFI de β7 de les cèl·lules estimulades amb TT es representa amb la línia discontinua i la MFI de β7 de les cèl·lules estimulades amb la resta d'antígens es representa com al percentatge relatiu a aquest (n=10). Mitjana±SEM. *P<.05, **P<.01.

La IL-17 i el TNF- α indueixen una sobreexpressió de les quimiocines proinflamatòries en criptes intestinals humanes

Degut a que els limfòcits T CD4⁺ que havien proliferat enfront dels diferents antígens presentaven un fenotip Th17 i una major expressió de β 7 a la seva superfície, ens vam preguntar si podien estar participant en la inflamació de la mucosa intestinal.

En un estudi s'havia descrit que les cèl·lules epitelials provinents de diferents línies cel·lulars produïen quimiocines com el CXCL1, el CXCL8 i el CCL20 sota l'efecte de la IL-17 i del TNF- α , tant si actuaven per separat com si ho feien conjuntament en sinèrgia²⁷⁷. Com s'ha dit a l'apartat de la introducció, el CXCL1 i el CXCL8 són importants pel reclutament de neutròfils així que la sobreexpressió d'aquestes quimiocines estarà relacionada directament amb un augment de la inflamació. D'altra banda, el CCL20 és un quimioattractiu de les cèl·lules Th17, ja que és el lligand de CCR6, que està expressat en aquests limfòcits.

Contràriament, en aquest mateix estudi s'havia demostrat que la IL-17 reprímia l'expressió de CXCL10 (quimioattractiu de Th1) per part de les cèl·lules epitelials inclús en presència de TNF- α ²⁷⁷.

En el nostre estudi, vam voler realitzar experiments similars però usant un cultiu que contenia criptes intestinals humanes (Figura 33A). Aquestes es van aïllar a partir de peces de quiròfan que provenien d'individus que no presentaven MII. El primer objectiu va consistir en determinar si aquestes criptes també eren capaces de respondre a diferents citocines i si, per tant, posteriorment podrien esdevenir un bon model per analitzar els efectes que tenien els sobrenedants procedents dels cultius de les cèl·lules T CD4⁺ que havíem aïllat i expandit enfront dels diferents antígens.

Així doncs, el primer que vam fer va ser aïllar les criptes intestinals i estimular-les amb IL-17 recombinant (r-IL17) i amb TNF- α recombinant (r-TNF- α). Igual que s'havia demostrat en línies cel·lulars epitelials²⁷⁷, vam poder demostrar que en les cèl·lules epitelials de les criptes intestinals humanes es produïa un increment de l'expressió de CXCL1, CXCL8 i CCL20 quan s'estimulaven amb r-IL17 o amb r-TNF α (Figura 33B-D). És interessant observar que en aquest cas també s'observava una sinèrgia quan

cultivàvem les criptes amb les dues citocines alhora. En canvi, l'expressió de CXCL10 es reduïa quan s'afegia r-IL17 al cultiu, tot i estar en presència del r- TNF α (Figura 33E).

També resulta interessant observar que si neutralitzàvem la IL-17 hi havia una disminució de l'efecte sinèrgic en la inducció de CXCL1, CXCL8 i CCL20 però, per contra, l'expressió de CXCL10 es restablia (Figura 33B-E).

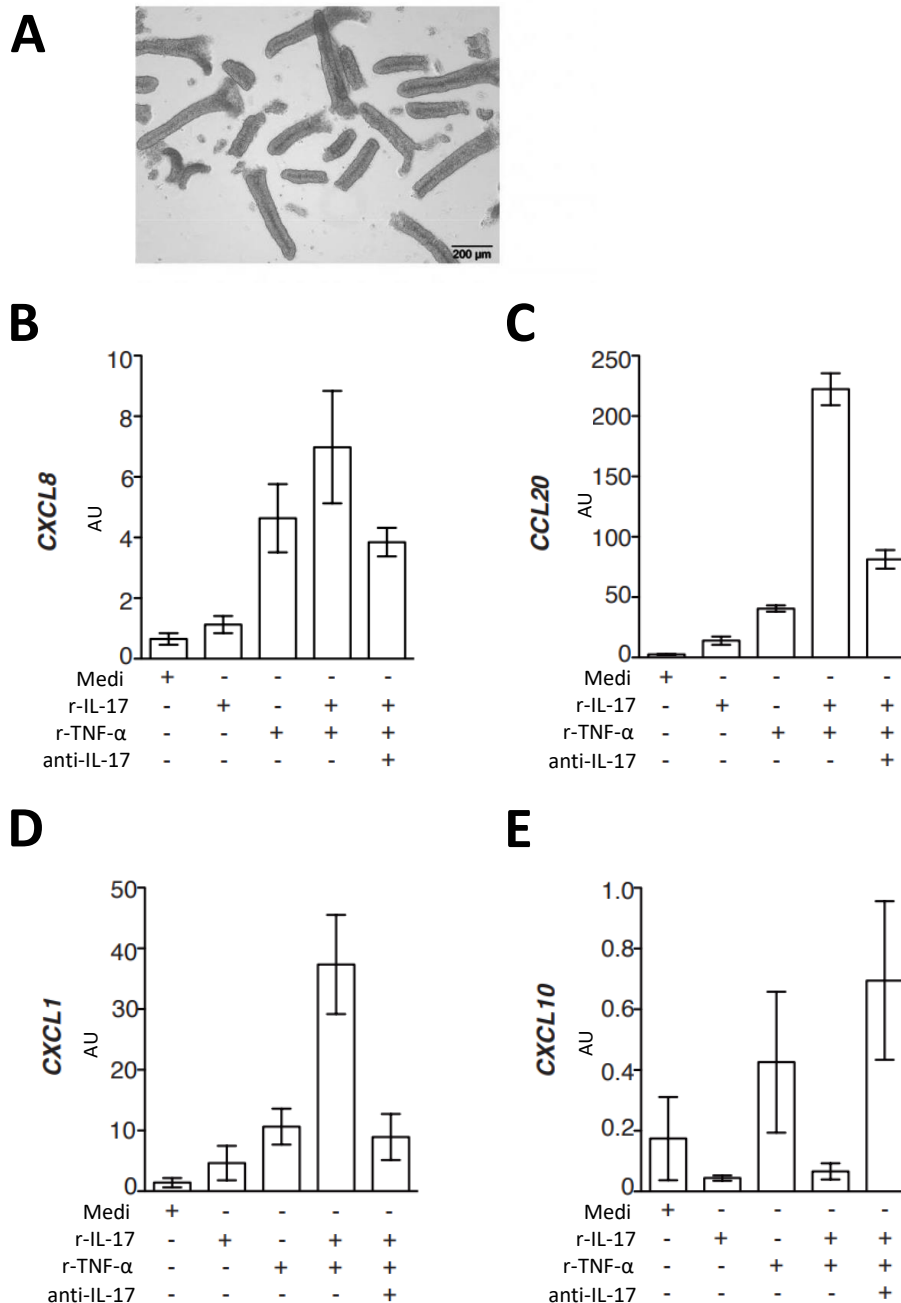


Figura 33. Efecte de la r-IL-17 i del r-TNF- α en l'expressió de quimiocines per part de criptes epitelials provinents d'individus que no tenen MII. (A) Fotografia representativa de les criptes aïllades d'un individu sense MII després de 18 hores de cultiu en presència de r-IL-17 o r-TNF- α soles o combinades i també amb un mAb anti-IL17 (n=3). Després de 18 hores de cultiu es va aïllar el mRNA de les criptes i es va mesurar l'expressió de (B) CXCL8, (C) CCL20, (D) CXCL1 i (E) CXCL10 per RT-PCR. Mitjana \pm SEM.

Els limfòcits T CD4⁺ provinents de pacients amb MC que són activats contra els diferents antígens de la microbiota comensal promouen respostes inflamatòries per part de l'epiteli

El següent pas va consistir en testar l'efecte que tenien les cèl·lules T CD4⁺ que s'havien expandit enfront dels diferents antígens en un epiteli sa, utilitzant aquest sistema. Així doncs, novament es van aïllar criptes intestinals i es van posar en cultiu juntament amb els sobrenedants que provenien de les cèl·lules que s'havien estimulat amb TT, FlaX, A4-fla2 i YidX i que, després de ser separades mitjançant la tècnica del sorter, s'havien reestimulat amb anti-CD3 i anti-CD28 durant 5 dies (n=5).

Aquests sobrenedants provinents de les cèl·lules activades van provocar una sobreexpressió de les quimiocines CXCL1 i CXCL8 per part de les criptes epitelials si ho comparàvem amb l'expressió que apareixia en les criptes que havien estat cultivades en absència d'estimulació (Figura 34A i C). En línia amb això, vam observar que l'expressió de CCL20 era significativament més gran quan les criptes s'havien cultivat amb els sobrenedants provinents dels cultius de FlaX, A4-fla2 i YidX si es comparava amb les que s'havien cultivat amb els sobrenedants que provenien de TT (Figura 34B).

En canvi, vam observar que els sobrenedants provinents de TT induïen en les criptes una major expressió de la quimiocina CXCL10 si les comparàvem amb les que no havien estat estimulades (Figura 34D).

Aquests resultats suggereixen que les cèl·lules T CD4⁺ provinents dels pacients amb MC que reaccionen de manera específica contra els antígens de la microbiota comensal promouen el reclutament de neutròfils i de limfòcits Th17 a través de la seva acció sobre l'epiteli intestinal.

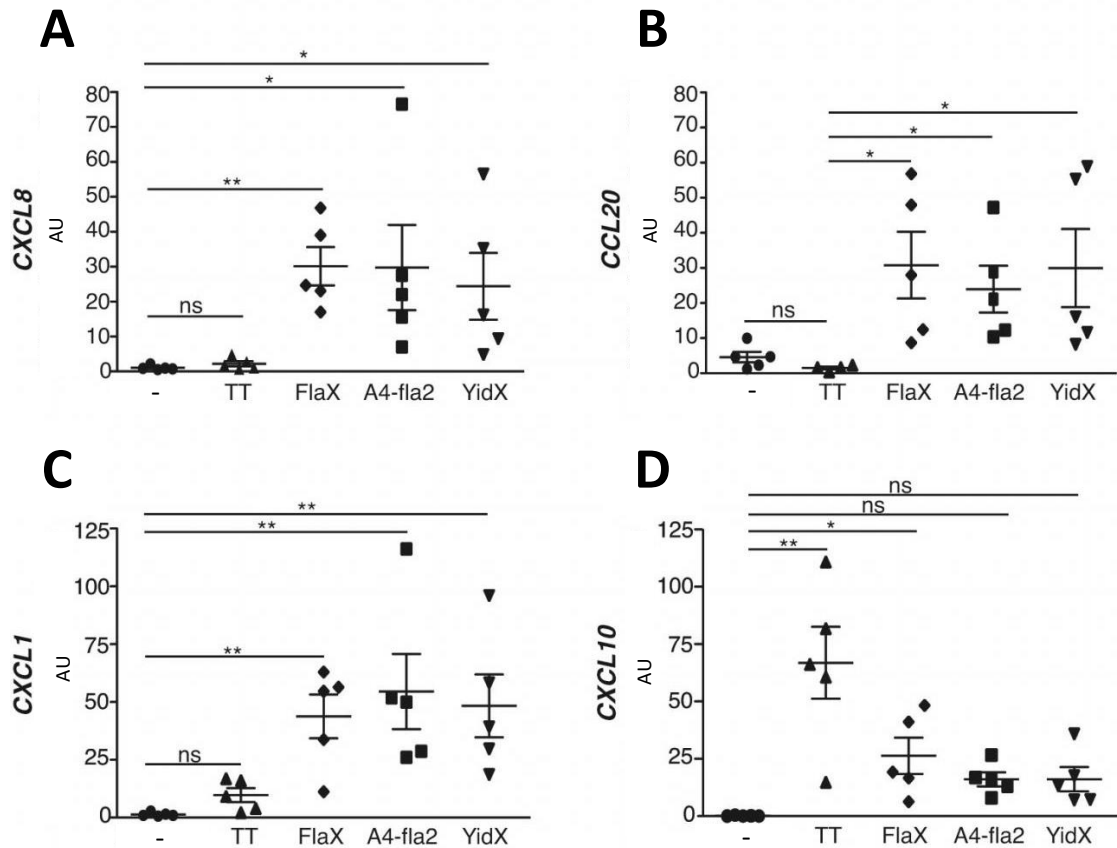


Figura 34. Les cèl·lules T CD4⁺ específiques per FlaX, A4-fla2 i YidX de pacients amb MC promouen inflamació intestinal. Després de 18 hores de cultiu es va aïllar el mRNA de les criptes i es va mesurar l'expressió de (A) CXCL8, (B) CCL20, (C) CXCL1 i (D) CXCL10 en les criptes intestinals cultivades amb els sobredants de les cèl·lules T CD4⁺ de pacients amb MC específiques pels diferents antigens (n=5). Mitjana ± SEM. ns> .05, *P ≤ .05, **P < .01.

Per últim, vam voler realitzar un experiment en el que es neutralitzava la IL-17 present als sobredants amb l'ús d'un mAb anti-IL-17. En línia amb el que s'havia observat, quan es neutralitzava la IL-17 l'efecte que causaven els sobredants obtinguts de les cèl·lules específiques per FlaX, A4-fla2 i YidX sobre l'expressió de CXCL1, CXCL8 i CCL20 per part de les criptes es reduïa (Figura 35A-C).

Contràriament, el fet de neutralitzar la IL-17 en aquests sobredants feia augmentar l'expressió de CXCL10 (Figura 35D).

És interessant observar que els sobredants provinents de les cèl·lules que havien estat estimulades amb TT no presentaven canvis en l'expressió d'aquestes quimiocines respecte la condició basal.

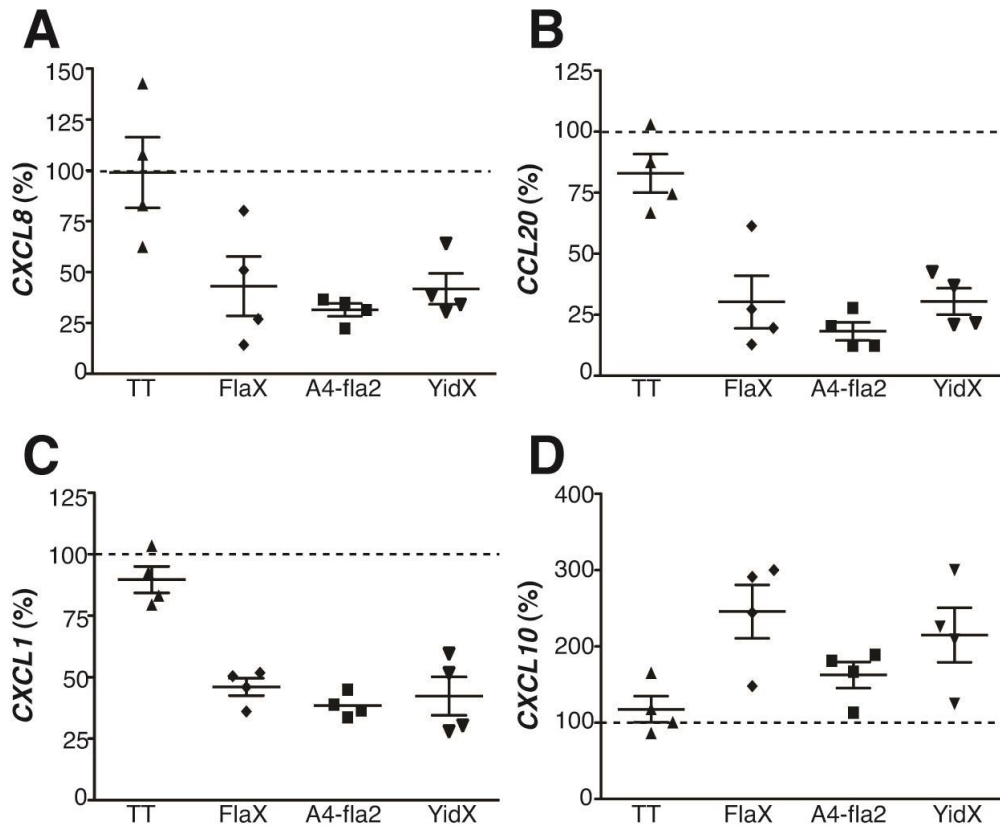


Figura 35. La neutralització de la IL-17 redueix l'expressió de les quimiocines que atrauen a neutròfils i a cèl·lules Th17 en les criptes intestinals. Nivells de (A) CXCL8, (B) CCL20, (C) CXCL1 i (D) CXCL10 en les criptes intestinals després d'estar en cultiu durant 18 hores amb els sobredants de les cèl·lules T CD4⁺ específiques d'antigen provinents de pacients que han estat pretractades amb un anticòs monoclonal anti-IL-17 (n = 4). Els nivells de quimiocines obtinguts en les condicions cultivades amb els sobredants sense tractar representen el 100% per cada donant (línia discontinua) i l'expressió de les criptes estimulades amb els sobredants tractats amb l'anticòs anti-IL-17 es representa com al percentatge resultant de la diferència. Mitjana ± SEM.

ESTUDI II: Un inhibidor oral del ROR γ t modula les respostes Th17 en sang i en biòpsies intestinals de pacients amb MC i prevé la malaltia en un model murí de colitis

L'expressió dels gens relacionats amb la població Th17 es redueix amb l'ús del BI119

Per tal d'avaluar l'eficàcia d'un compost que inhibeix ROR γ t, vam estimular PBMCs humanes amb diferents antígens microbians per tal de forçar-les a produir IL-17.

En aquest estudi vam utilitzar el fong *C. albicans* com a potent inductor de les respostes Th17, així com també vam utilitzar dues proteïnes derivades d'*E. coli*: FrvX, que va ser seleccionat en base a que s'havia reportat una reactivitat en sèrum associada a la MC, i YidX, degut a que en el primer estudi havíem demostrat que era capaç d'induir respostes Th17 incrementades en pacients amb MC.

En la Figura 36 veiem la producció d'IL-17, IFN- γ i IL-5 per part de les PBMCs estimulades tant de donants sans (n=6) com de pacients (n=6) (Taula 3, Grup 1). Tant el YidX com el FrvX van induir una producció major d'IL-17 en pacients (Figura 36A), però en canvi, no vam observar diferències en la secreció d'IFN- γ , citocina pròpia de la població Th1 (Figura 36B) ni de la IL-5, pròpia del llinatge Th2 (Figura 36C). En contraposició, vam poder observar que la *C. albicans* induïa increments similars d'IL-17 en controls i pacients comparat amb les condicions sense estimular.

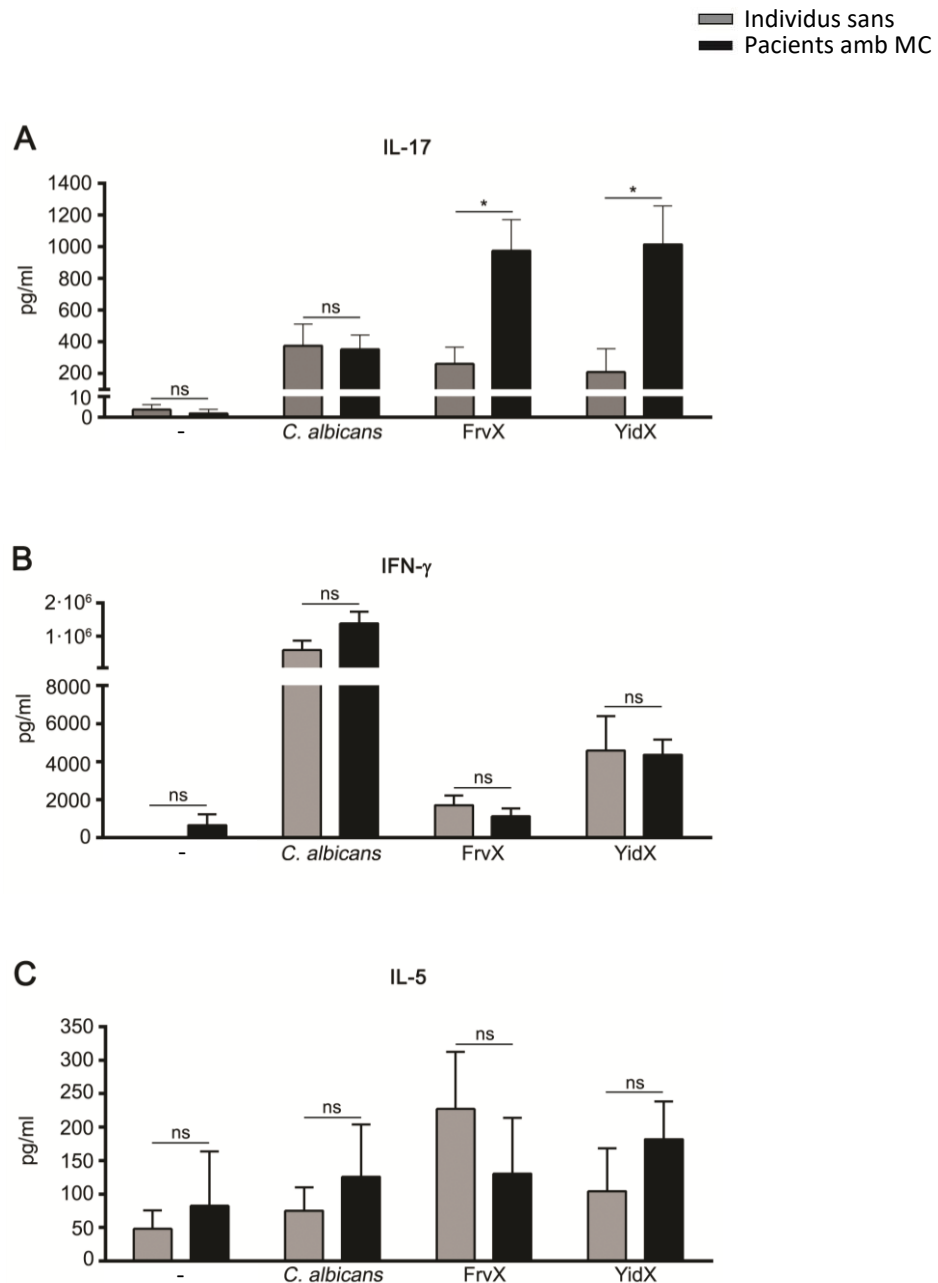


Figura 36. Major secreció d'IL-17 de les PBMCs de pacients amb MC estimulades amb els antígens de la microbiota comensal. (A) IL-17, (B) IFN- γ i (C) IL-5 mesurades mitjançant la tècnica d'ELISA en els sobrenedants de les PBMCs de donants sans (n=6) i de pacients amb MC (n=6) després de 7 dies de cultiu en presència dels diferents antígens microbians. Mitjana \pm SEM. ns> .05, * $P \leq$.05.

El següent pas va consistir en testar un inhibidor específic de ROR γ t (BI119) utilitzant aquest sistema. Per dur a terme aquest experiment es van aïllar PBMCs d'una nova cohort de pacients amb MC (n=12) (Taula 3, Grup 2) i es van cultivar sense estímul o amb *C. albicans*, FrvX i YidX en presència de BI119 (1 μ M) o del vehicle (DMSO).

Vam poder observar que el BI119 és capaç de reduir significativament diferents gens relacionats amb la població Th17, com per exemple IL17A, IL17F, IL22, IL26 i IL23R sota totes les condicions estudiades després d'una setmana de cultiu (Figura 37).

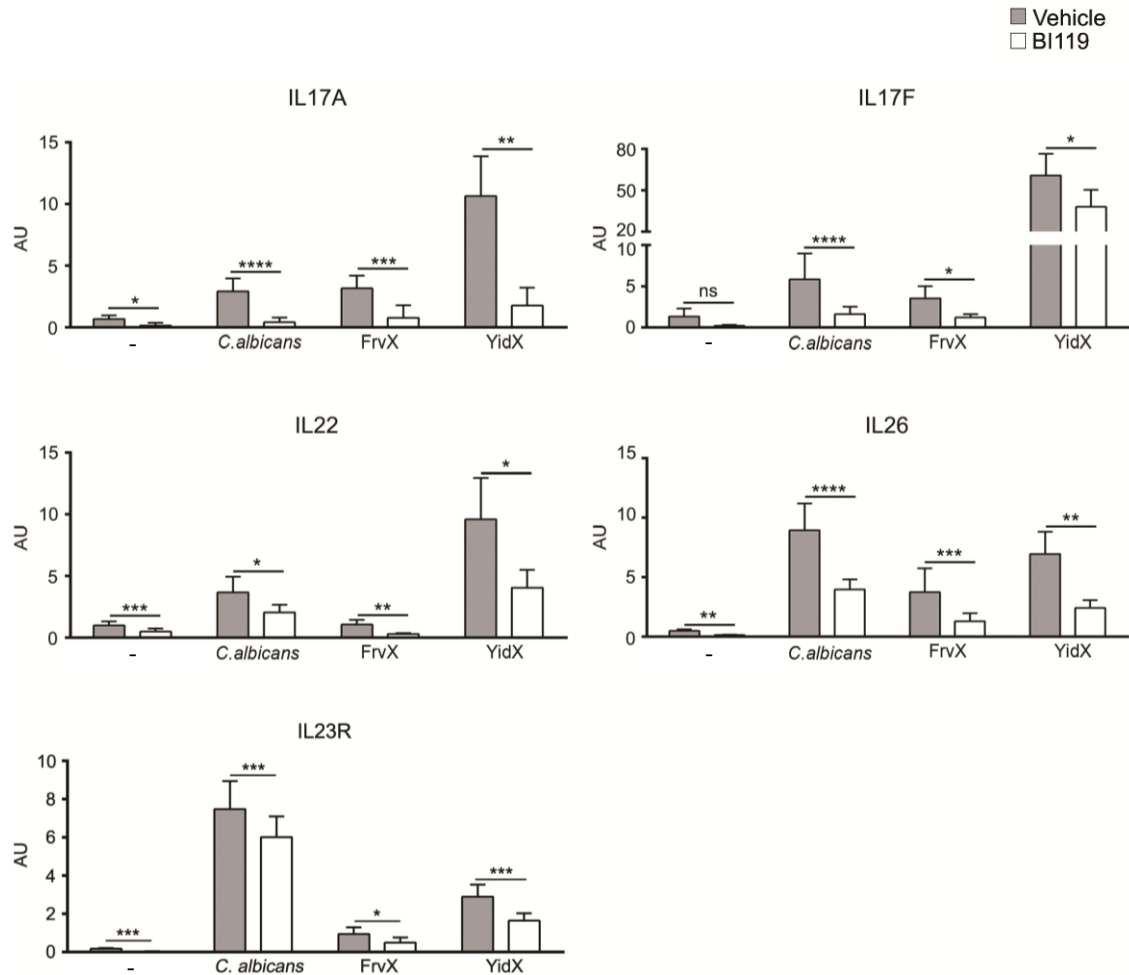


Figura 37. El BI119 és capaç d'inhibir els gens relacionats amb la població Th17 en les PBMCs dels pacients amb MC estimulades amb diferents antígens. L'expressió dels diferents gens de la població Th17 es va determinar en les PBMCs de diferents pacients amb MC (n=12) després de 7 dies de cultiu en presència d'antígens microbians. L'expressió de mRNA es va determinada utilitzant la tècnica de RT-PCR. Mitjana±SEM. ns>.05, *P<.05, **P<.005, ***P<.0005, ****P<.0001.

A més d'això, vam voler analitzar l'expressió dels factors de transcripció i de les principals citocines dels diferents llinatges de limfòcits T col·laboradors amb l'objectiu d'analitzar si l'inhibidor de ROR γ t afectava d'alguna manera a la resta de llinatges.

Tant l'expressió de RORC com la concentració d'IL-17A de les PBMCs tractades amb el BI119 es van veure significativament reduïdes si les comparàvem amb les condicions que havien estat tractades amb el vehicle (Figura 38A).

Cal destacar que no vam veure canvis en les poblacions Th1 i Th2, ni en els factors de transcripció (TBX21 i GATA3) ni en les principals citocines (IFN- γ i IL-5) (Figura 38B i C). En canvi, vam observar un increment dels limfòcits Treg en les PBMCs que s'havien estimulat amb els antígens comensals i tractades amb el BI119 (Figura 38D).

Aquests resultats mostren que el BI119 bloqueja eficaçment la població Th17 sense interferir en les respostes Th1 ni Th2, induint un lleuger però significatiu augment de la població T reguladora.

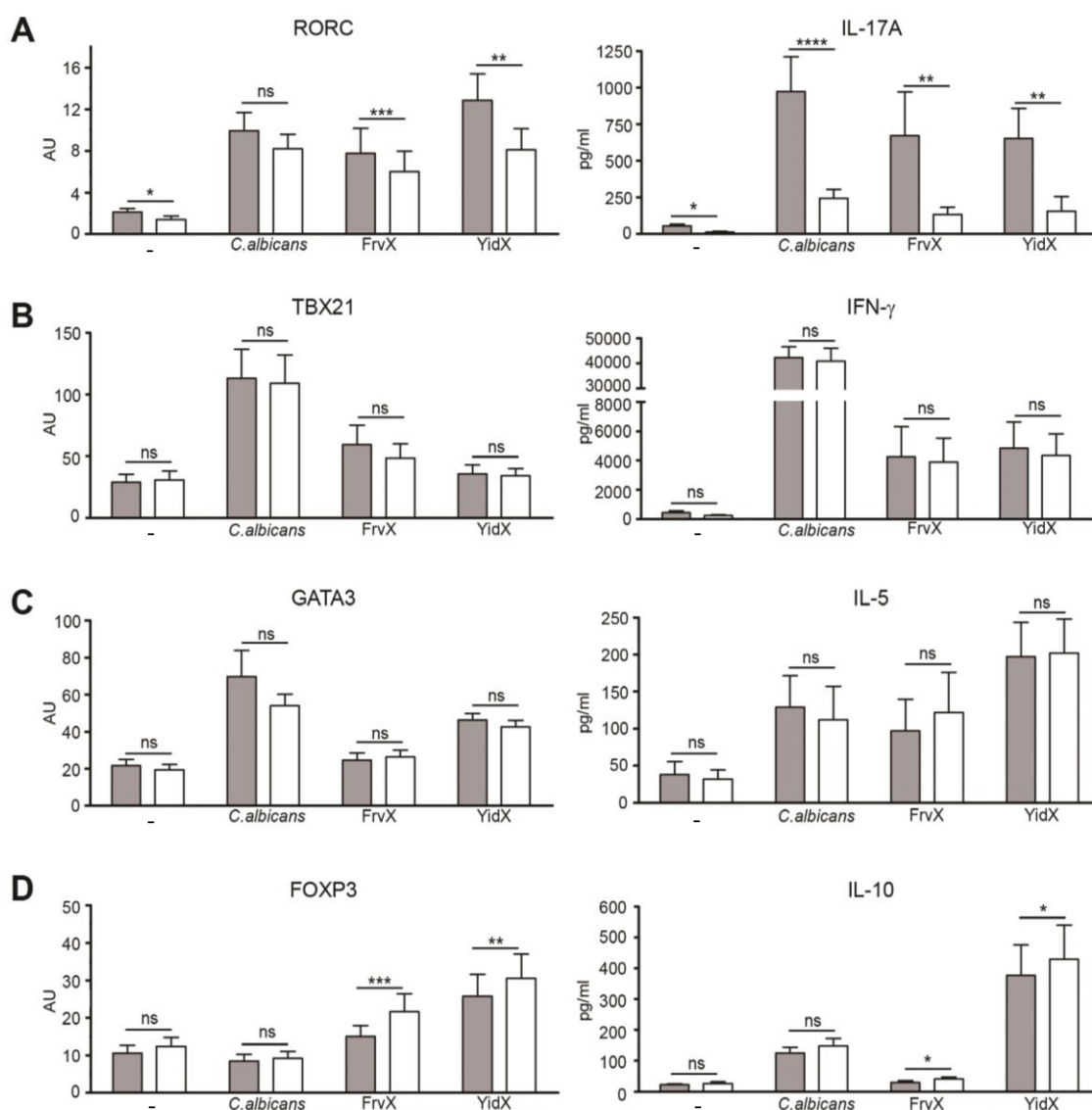


Figura 38. El BI119 inhibeix la població Th17 en les PBMCs dels pacients amb MC. L'expressió dels factors de transcripció i la secreció de les citocines de les poblacions (A) Th17, (B) Th1, (C) Th2 i (D) Treg es va determinar en les PBMCs de pacients amb MC (n=12) després de 7 dies de cultiu amb antígens microbians. L'expressió de mRNA es va determinar utilitzant la tècnica de RT-PCR i les citocines es van mesurar per ELISA. Mitjana \pm SEM. ns>.05, *P \leq .05, **P<.005, ***P<.0005, ****P<.0001.

El BI119 redueix els efectes proinflamatoris de les cèl·lules T CD4⁺ específiques d'antígens comensals en criptes intestinals sanes

Posteriorment vam voler analitzar si el fet de tractar les cèl·lules T CD4⁺ amb el BI119 podia reduir el potencial inflamatori d'aquestes sobre la barrera epitelial. Tal i com s'havia descrit en línies cel·lulars i posteriorment s'havia confirmat en el nostre primer estudi, sabem que la IL-17 actua sobre les cèl·lules epitelials fomentant un augment de l'expressió de certes quimiocines com la CXCL1 i CXCL8 que recluten neutròfils o altres com la CCL20 que recluten cèl·lules Th17. Contràriament, sabem que la presència d'IL-17 reprimeix la CXCL10, quimiocina que atrau a les cèl·lules Th1^{277, 278}.

Per tal de dur a terme aquest estudi, vam aïllar criptes procedents de peces quirúrgiques obtingudes d'un segment de còlon que s'havia extret d'individus sense MII (n=5). Aquestes es cultivaven amb sobrenedants procedents de limfòcits T CD4⁺ aïllats de pacients amb MC que havien estat expandits, separats i posteriorment reestimulats amb FrvX (n=8) o YidX (n=7) i tractats amb BI119 o amb el vehicle (Figura 39A) (Taula 3, Grup 3).

Els sobrenedants obtinguts després de reestimar els limfòcits T CD4⁺ amb FrvX i YidX induïen un increment en l'expressió de CXCL1, CXCL8, CCL20 i CXCL10 per part de les criptes intestinals (Figura 39B-E).

Resulta interessant observar que els sobrenedants obtinguts de les cèl·lules que havien estat estimulades amb els antígens comensals i tractades amb el BI119 mostren una reducció significativa de la inducció de CXCL1, CXCL8 i CCL20 per part de les criptes intestinals (Figura 39B-D).

En contraposició, l'expressió de CXCL10 es va veure incrementada o inalterada sota les mateixes condicions (Figura 39E).

Els resultats obtinguts en aquest apartat indiquen, de manera col·lectiva, que la inhibició específica del ROR γ t en els limfòcits T modula els seus efectes proinflamatoris en les cèl·lules epitelials.

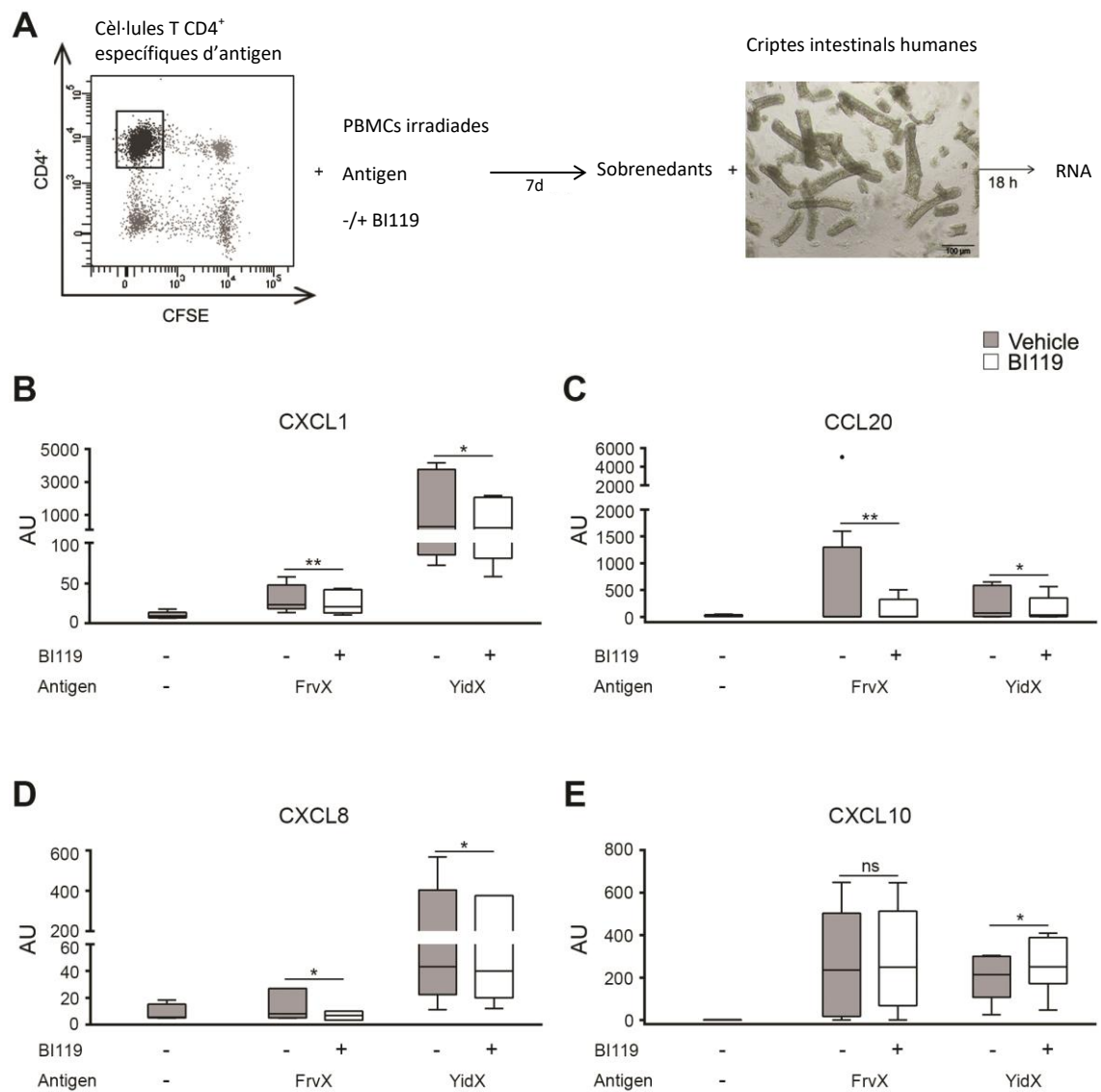


Figura 39. La inhibició de ROR γ t en les cèl·lules T CD4⁺ activades contra dos antígens de la microbiota comensal redueix l'expressió de les quimiocines que recluten neutròfils i limfòcits Th17 per part de les criptes intestinals. (A) Esquema que mostra el pla experimental que es va seguir. Les criptes intestinals (n=5) es van cultivar amb sobredants obtinguts de cultivar limfòcits T CD4⁺ activats i reestimulats amb FrvX (n=8) i YidX (n=7) tractats o no amb BI119. L'expressió de mRNA de (B) CXCL1, (C) CCL20, (D) CXCL8 i (E) CXCL10 es va determinar utilitzant la RT-PCR. Mitjana \pm SEM. ns>.05, *P \leq .05, **P<.005.

Efecte del BI119 en la mucosa intestinal inflamada de pacients amb MC activa

Fins aquí havíem pogut demostrar que el BI119 inhibeix de manera efectiva la transcripció dels gens i la secreció de citocines dependents de ROR γ t en les PBMCs circulants que responen a l'estimulació amb antígens de la microbiota comensal, específicament en les cèl·lules T CD4⁺.

Tot i això, sabem que l'expressió de ROR γ t no està limitada a aquestes poblacions limfocitàries. En efecte, hi ha diferents tipus cel·lulars que expressen ROR γ t que estan presents a la mucosa intestinal però que estan poc representats en sang perifèrica (IELs i ILC3).

Per tant, vam investigar l'efecte de la inhibició de ROR γ t en explants de teixit intestinal (biòpsies endoscòpiques) obtinguts de les parts inflamades de la mucosa de diferents pacients amb MC (n=18; Taula 4). Basant-nos en la composició cel·lular diferent i els diferents perfils transcripcionals entre la mucosa colònica i ileal, vam analitzar per separat els efectes de la inhibició de ROR γ t en ambdues localitzacions intestinals.

Les mostres es van agafar de les parts inflamades de còlon (n=10) i d'ili (n=8) de segments que tenien una activitat endoscòpica comparable basada en el CDEIS calculat per segments (Taula 4).

Tot i que la severitat de la malaltia era comparable, vam trobar una major expressió de IL17A i de S100A8 en estat basal en les mostres ileals en comparació amb les mostres procedents de còlon (Figura 40).

En canvi, l'expressió d'altres marcadors inflamatoris com CXCL1, CXCL8, IFNG, IL6 i CXCL10 era similar en les mostres de còlon i d'ili, suggerint que les diferències en la IL17A i el S100A8 es podien deure a la localització de la malaltia més que no pas al grau d'inflamació.

D'altra banda, com era d'esperar, vam veure que el marcador específic de teixit DEFA5 estava sobreexpressat en les mostres ileals.

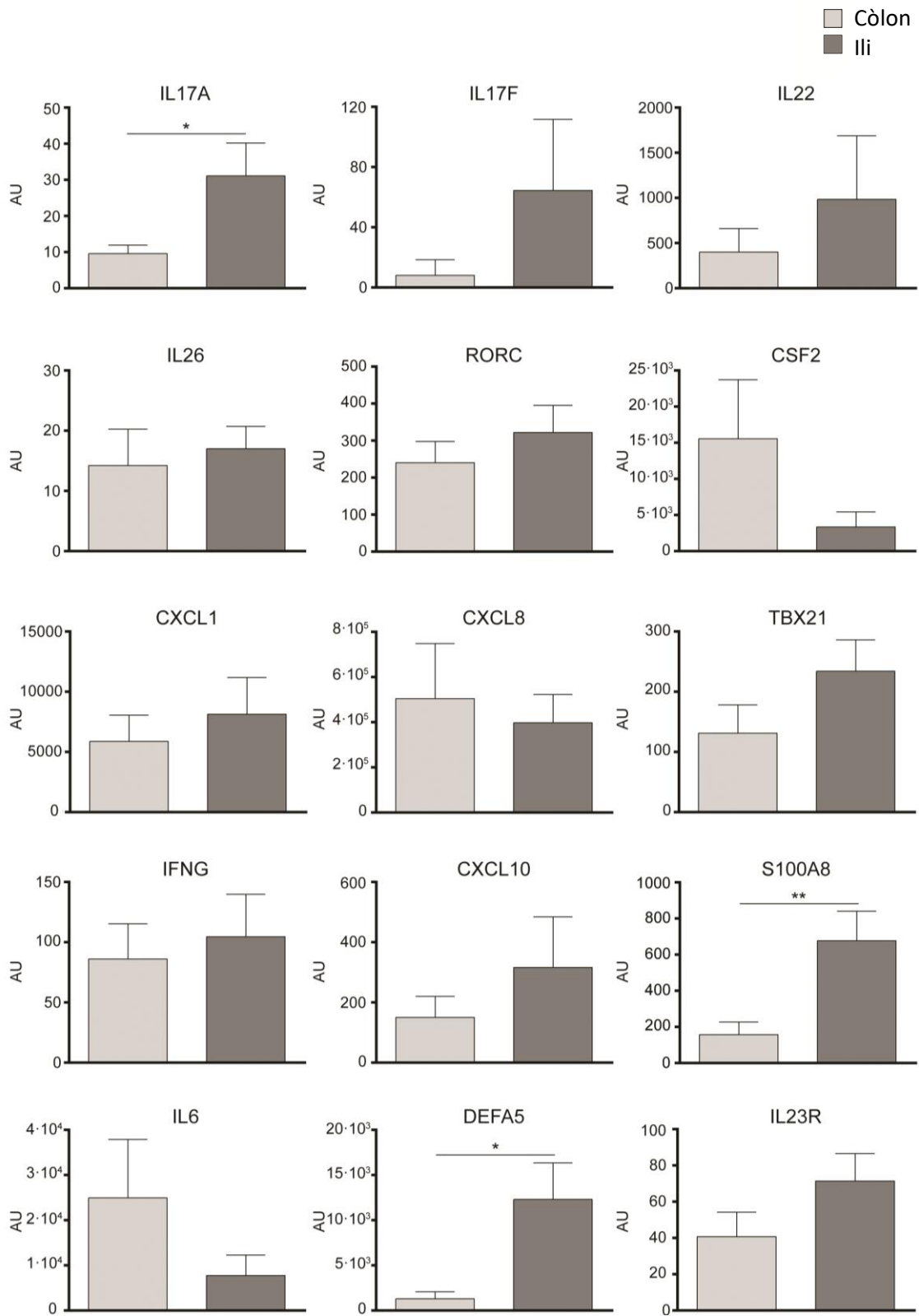


Figura 40. Expressió diferencial de gens entre les mostres procedents de còlon i d'ili de pacients amb MC activa. Nivells de mRNA de biòpsies de còlon (n=10) i d'ili (n=8) després de 18 hores en cultiu. Mitjana ± SEM. ns>.05, P valor nominal *P≤.05., **P<.005.

Tot i aquestes diferències basals, el tractament amb BI119 va reduir de forma significativa l'expressió d'IL17A, IL17F i IL26 en les mostres colòniques (Figura 41A) i en les ileals (Figura 41B).

Cal remarcar que la IL22 no es veu afectada en cap de les localitzacions, a diferència dels resultats obtinguts anteriorment en els cultius de PBMCs (Figura 37).

També vam poder observar una disminució d'altres gens com IL23R, CSF2, CXCL1, CXCL8, IFNG, S100A8, IL6 i un augment de DEFA5 només en les biòpsies ileals tractades, mentre que l'efecte en les mostres colòniques no va aconseguir una diferència estadísticament significativa.

Aquests resultats suggereixen que el BI119 pot modular alguns dels gens relacionats amb la població Th17 en mucosa inflamada però preservant-ne d'altres com la IL22. A més, en aquest experiment es mostra que les respostes Th17 ileals semblen ser més susceptibles a la seva modulació a càrrec d'inhibidors de ROR γ t que les colòniques.

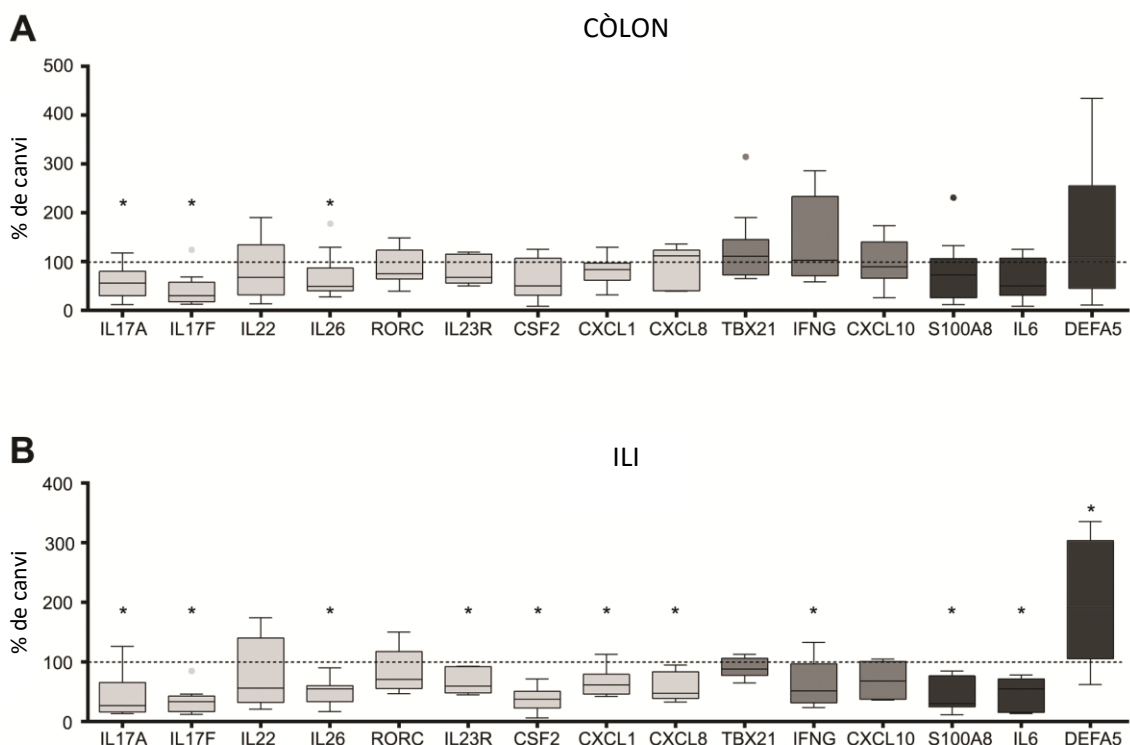


Figura 41. Expressió gènica en biòpsies intestinals de pacients actius quan es tracten amb BI119. Els nivells de RNA de les biòpsies de (A) còlon (n=10) i (B) ili (n=8) representen el 100% de cada donant (línia discontinua) i l'expressió de les mostres tractades es representa com el percentatge restant. Gris clar: gens Th17. Gris fosc: gens Th1. Negre: gens relacionats amb la malaltia. Mitjana \pm SEM. ns>.05, *P \leq .05.

L'ús del BI119 en un model murí de colitis prevé l'aparició de la malaltia

Finalment, es va voler demostrar la eficàcia d'aquest fàrmac *in vivo* en un model murí de colitis. Per induir la inflamació intestinal, es realitzava una transferència de cèl·lules T CD4⁺CD45RB^{high} en ratolins CB.17 SCID que no tenien ni limfòcits B ni T.

Quan s'injecten les cèl·lules CD4⁺CD45RB^{low} la colitis no es desenvolupa ja que aquestes contenen cèl·lules Treg capaces de controlar la resposta immunitària. Els ratolins SCID sols tampoc desenvolupen la colitis, però en canvi, si els hi injectem cèl·lules T CD4⁺CD45RB^{high} no tindrem cèl·lules Treg i es generarà una resposta immunitària contra els bacteris comensals que acabarà originant la malaltia.

Per tant, es van fer servir quatre grups diferents. D'una banda, es van fer servir dos grups controls que inclouen ratolins CB.17 SCID sense alterar (n=9), i un altre grup al que se'ls hi injectava la població no-colitogènica de cèl·lules CD4⁺CD45RB^{low} (n=9). D'altra banda, es van usar dos grups de ratolins als quals se'ls hi injectaven cèl·lules CD4⁺CD45RB^{high}. Immediatament abans de la transferència de les cèl·lules aquests eren tractats amb un vehicle (MC/tween) (n=11) o amb 100 µg/kg de BI119 (n=12) administrat per via oral i a partir d'aquí es tractaven dos cops al dia durant 28 dies.

A la figura següent podem observar que la transferència de les cèl·lules T CD4⁺CD45RB^{high} en els ratolins immunodeprimits va induir una reducció del pes i un increment significatiu dels marcadors d'inflamació que inclouen paràmetres macroscòpics (ratio pes/llargada del còlon), histològics, fecals (lipocalina) i circulants (sCD14) a dia 28 comparant el grup CD4⁺CD45RB^{high} que s'havia tractat amb el vehicle amb els dos grups que s'havien usat com a control (Figura 42A-E).

Si ens fixem en els efectes del fàrmac, veurem que l'administració oral del BI119 prevé la pèrdua de pes si els comparem amb el grup que ha estat tractat amb el vehicle (Figura 42A). De la mateixa manera, si ens fixem en la ràtio que es basa en el gruix i la llargada del còlon, veurem que també s'observa una millora en aquesta, de manera que els ratolins que van ser tractats amb el BI119 mostren còlons més llargs i prims que els que es van tractar amb el vehicle, paràmetres que es relacionen amb una millora de la malaltia (Figura 42A).

Pel que fa als marcadors fecals i plasmàtics de la malaltia, vam poder demostrar que el tractament amb BI119 redueix de manera significativa l'augment de la lipocalina fecal i el sCD14 en sèrum si ho comparem amb el grup que havia estat tractat amb el vehicle (Figura 42B).

En línia amb això, a nivell histològic veiem una reducció significativa en el gruix de la mucosa que es relaciona amb una reducció de la hiperplàsia de les criptes en aquells ratolins que eren tractats amb el BI119 (Figura 42C).

A més, es van mesurar els signes microscòpics d'inflamació en seccions obtingudes dels còlons dels ratolins que s'havien tenyit amb H&E. Per fer-ho, es va utilitzar una puntuació que valorava diferents paràmetres relacionats amb la inflamació que trobem definida a la secció de Materials i mètodes.

Vam poder observar que aquesta puntuació era inferior en el grup tractat amb el BI119 tot i no arribar a assolir una significança estadística ($p=0.18$ respecte el grup tractat amb el vehicle) (Figura 42D).

No obstant, si ens fixem en una mostra representativa d'aquestes tincions de cadascun dels grups de ratolins, podem veure una millora clara pel que fa l'epiteli, al component inflamatori de cèl·lules immunitàries i a la presència de cèl·lules caliciformes en els còlons d'aquells ratolins que havien estat tractats amb el BI119 (Figura 42E).

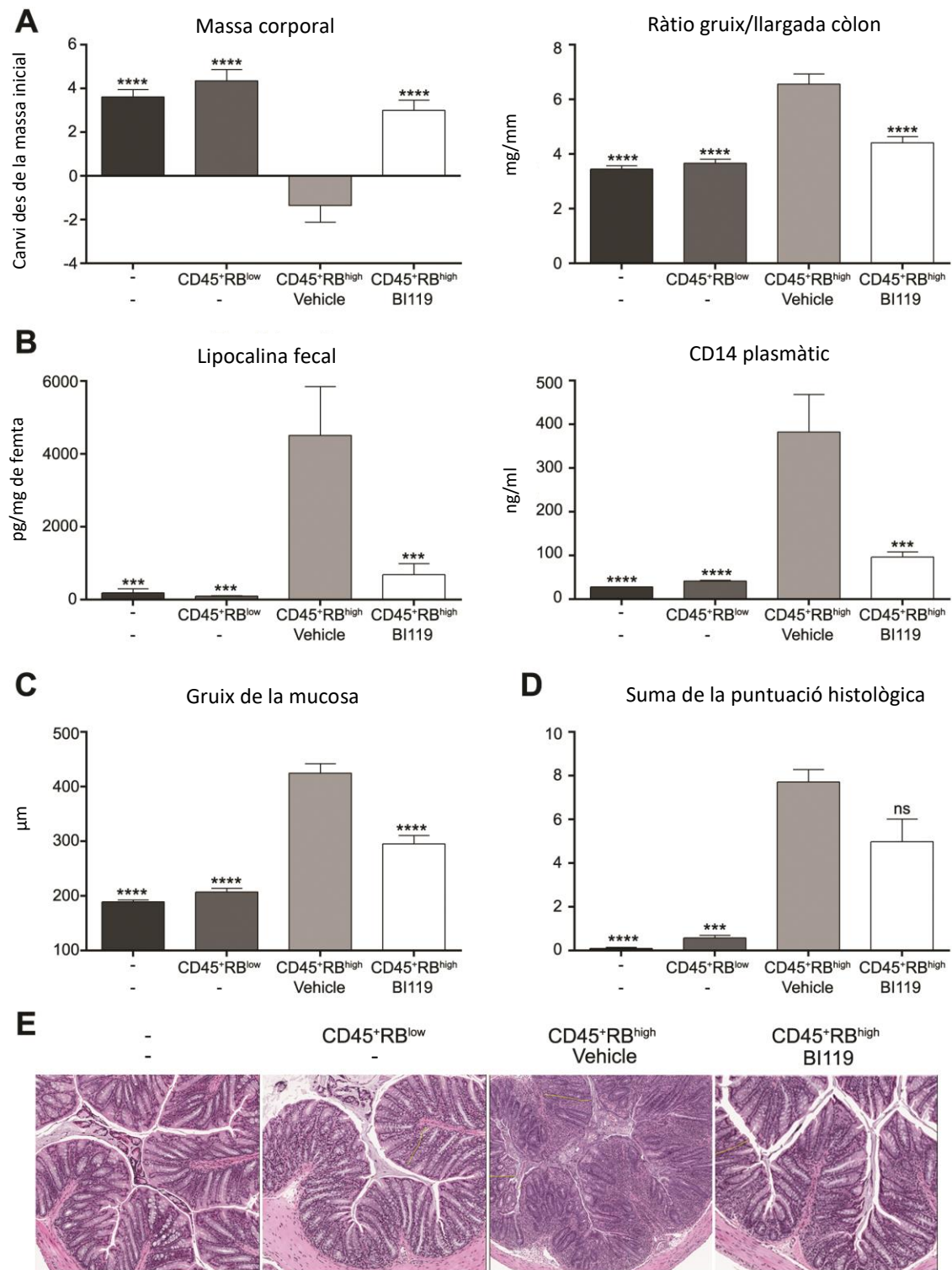


Figura 42. Impacte del tractament amb BI119 d'un model murí de colitis basat en la transferència de cèl·lules T CD4⁺CD45^{high}. (A) La pèrdua de pes corporal i la ratio gruix/llargada del còlon es van veure revertits gràcies al tractament amb BI119. (B) Els biomarcadors fecals i sistèmics es van inhibir en els ratolins colítics que es tractaven amb el BI119. La lipocalina es mesurava per ELISA en els sobredants fecals i el sCD14 també es determinava per ELISA en mostres plasmàtiques. (C) El gruix de la mucosa i (D) la puntuació histopatològica de les mostres de còlon es reduïen gràcies a l'ús del BI119. (E) Seccions histològiques representatives de cada grup que mostren el còlon distal tenyit amb H&E. Mitjana±SEM. ns>.05, ***p<.0005, ****p<.0001 comparat amb el grup tractat amb el vehicle, al qual se li havien injectat les cèl·lules T CD4⁺RB^{high}.

Per últim, vam voler analitzar els mecanismes moleculars involucrats en la resposta al BI119 en aquest model animal mesurant en la mucosa intestinal la transcripció dels gens claus en la inflamació, incloent els gens que depenien de ROR γ t.

Tal i com esperàvem, la colitis induïda per la injecció de les cèl·lules T CD4⁺CD45RB^{high} als ratolins immunodeprimits estava associada a un increment significatiu de gens relacionats amb les poblacions limfocitàries Th17, Th1 així com també a la calprotectina (S100A8/S100A9) (Figura 43).

En consonància amb l'efecte protector que vèiem amb la inhibició de ROR γ t si ens fixàvem en els paràmetres clínics, macroscòpics i histològics, vam observar que els ratolins que havien estat tractats amb el BI119 mostraven una reducció en l'expressió dels gens Th17 com IL17A, IL17F i IL22 així com també en l'IFNG i la calprotectina (Figura 43).

Aquests experiments *in vivo* ens van permetre demostrar l'efecte clar de l'administració oral del fàrmac BI119 en la prevenció de la colitis murina experimental produïda per la transferència de les cèl·lules T CD4⁺CD45RB^{high}.

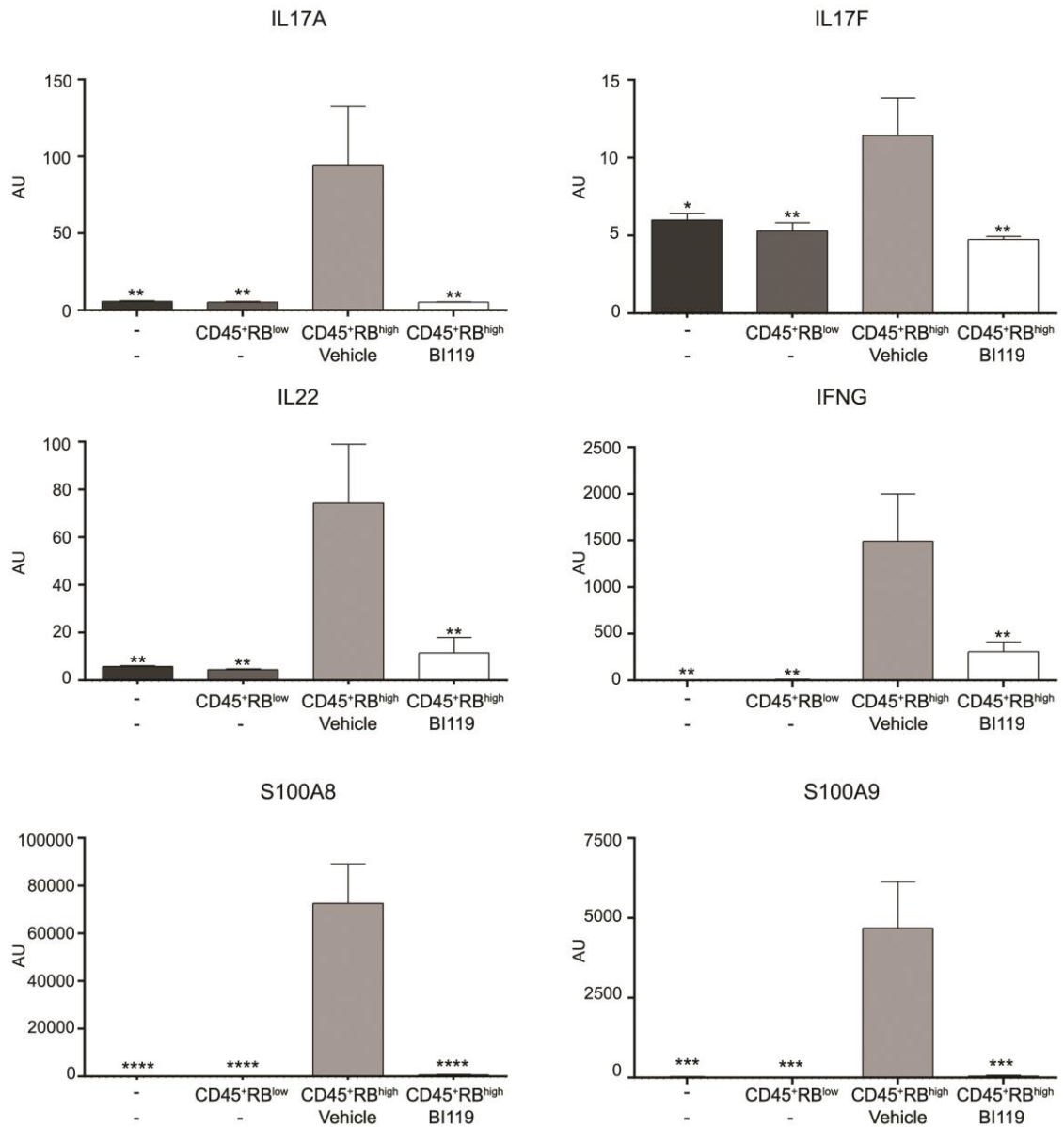
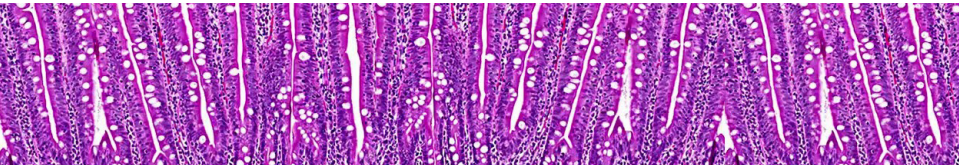


Figura 43. Canvis en l'expressió gènica en el model murí de colitis basat en la transferència de cèl·lules T CD4⁺CD45^{high}. L'expressió d'IL17A, IL17F, IL22, IFNG, S100A8 i S100A9 es reduïa en els ratlons colítics que eren tractats amb BI119. L'expressió de mRNA es va determinar per RT-PCR. Mitjana±SEM. ns>.05, *P≤.05, **P<.005, ***P<.0005, ****P<.0001 comparat amb el grup tractat amb el vehicle, al qual se li havien injectat les cèl·lules T CD4⁺RB^{high}.



DISCUSSió

ESTUDI I: Els limfòcits T CD4⁺ específics contra antígens de la microbiota comensal exhibeixen un fenotip Th17 proinflamatori en pacients amb MC

Majoritàriament s'accepta que la MC es desenvolupa a causa de la pèrdua de tolerància contra diferents bacteris que formen part de la microbiota intestinal. Fins ara, aquest fet s'ha evidenciat gràcies a un increment de la seroreactivitat contra una gran varietat d'antígens microbians descrita en pacients amb MC^{59, 60, 279, 280}. La presència d'anticossos contra antígens de la microbiota evoca l'existència d'unes cèl·lules T col·laboradores que també estaran reaccionant contra els mateixos antígens. Tot i que aquestes cèl·lules T CD4⁺ estan considerades com un dels elements implicats en la patogènesi de la MC, encara hi ha pocs estudis que analitzin l'especificitat antigènica de la resposta de les cèl·lules T en la MC^{62, 281}.

En el primer estudi d'aquest treball, donem evidència de l'existència de cèl·lules T CD4⁺ específiques per diferents antígens de la microbiota en sang perifèrica de controls i pacients amb MC. És important destacar que la proliferació d'aquestes cèl·lules en resposta als diferents antígens comensals era major en les PBMCs dels pacients amb MC que en les dels individus sans. El fet que els individus sans presentin cèl·lules T CD4⁺ circulants específiques per a certs antígens de la microbiota comensal, tot i la menor capacitat proliferativa d'aquestes no és sorprenent. De fet, ja s'havien observat prèviament respostes de les cèl·lules T contra proteïnes d'*E. coli* en individus sans²⁸¹. En línia amb això, si ens fixem en altres malalties autoimmunitàries com l'esclerosi múltiple, veurem que també s'ha identificat una reactivitat a antígens propis com la mielina en individus sans, malgrat que les cèl·lules T específiques de la mielina mostren una major activació en pacients amb esclerosi múltiple^{282, 283}, així com també un perfil inflamatori diferent²⁸⁴. A més, recentment s'ha descrit que molts individus sans també presenten IgGs contra antígens microbians intestinals en sèrum, la qual cosa suggereix que la resposta de les cèl·lules T CD4⁺ es pot desenvolupar tot i l'absència de MC²⁸⁵.

Una troballa clau en el primer estudi va ser que les cèl·lules T CD4⁺ que proliferaven contra FlaX, A4-fla2 i YidX provinents de pacients amb MC, mostraven un perfil de producció de citocines diferent, ja que es tractava d'una resposta caracteritzada per la secreció de grans quantitats de TNF- α , IFN- γ , IL-17A, IL-17F i CCL20. Aquestes diferències es van confirmar gràcies a l'anàlisi transcripcional de les cèl·lules T CD4⁺ que s'havien expandit i aïllat després de ser cultivades amb FlaX, A4-fla2 i YidX. A partir d'aquest anàlisi vam poder identificar diferències significatives en l'expressió de RORC, IL17A, IL17F, CCR6, CCL20 i PTGER2 en les cèl·lules T CD4⁺ específiques d'antigen provinents de pacients amb MC comparades amb les d'individus sans. En canvi, no vam observar cap diferència en els gens relacionats amb la població Th1 ni en el TNFA entre aquests dos grups.

També cal destacar que els percentatges de les cèl·lules Th17 i Th17/Th1 de les cèl·lules T CD4⁺ que proliferaven contra antigens comensals eren més abundants en els pacients amb MC que en els individus sans. De fet, les cèl·lules Th17/Th1 es van trobar en pacients amb MC en una proporció inusualment elevada, juntament amb les cèl·lules Th1 i Th17 convencionals^{179, 286}. També s'ha postulat que les cèl·lules Th17 patogèniques es poden trobar dins del subconjunt Th17/Th1 en els pacients amb MC¹⁹¹, suggerint que les cèl·lules T CD4⁺ que reaccionen contra FlaX, A4-fla2 i YidX tenen un paper proinflamatori en la MC. Estudis en models experimentals demostren que les cèl·lules Th17 poden donar lloc *in vivo* a les cèl·lules Th1 i que aquesta capacitat de produir IFN- γ és necessària per induir la colitis²⁸⁷. Cal destacar que aquest estudi també va demostrar que les cèl·lules Th17 donaven suport a la generació de noves cèl·lules Th1 patogèniques.

Per poder oferir més especificitat a les nostres observacions, al llarg de tot l'estudi vam incloure una proteïna bacteriana no comensal (TT) contra la qual els individus que havien estat vacunats havien de presentar cèl·lules memòria T CD4⁺ en sang perifèrica, independentment de si presentaven MC o no. Tal i com esperàvem, vam poder demostrar que les cèl·lules T CD4⁺ proliferaven enfront d'aquesta proteïna que no estava relacionada amb la MC, de la mateixa manera en controls i pacients. A més d'això, vam poder observar que el TT donava lloc a una resposta predominant dels limfòcits Th1, tant en controls com en pacients.

En conjunt, això demostraria que les cèl·lules T CD4⁺ dels pacients amb MC generalment no presenten un biaix cap a un fenotip Th17 altament proliferatiu, sinó que aquesta resposta va dirigida específicament contra antígens concrets de la microbiota comensal. Les grans diferències entre les cèl·lules T específiques de controls i de pacients amb MC que reaccionaven contra els diferents antígens suggereixen que, malgrat reaccionar al mateix, el primer contacte amb l'antigen podia haver tingut lloc en entorns molt diferents. Aquesta teoria és recolzada pel fet que les cèl·lules que reaccionaven enfront de TT, que s'havien activat contra el mateix adjuvant de la vacuna (alumini) en controls i en pacients amb MC, no van mostrar diferències funcionals entre ambdós grups. A més, altres estudis en ratolins han demostrat que durant la infecció gastrointestinal amb *Toxoplasma gondii*, les cèl·lules T específiques que s'han generat enfront d'antígens de la microbiota comensal (cèl·lules T transgèniques contra CBir1) es diferencien a cèl·lules Th1 mentre que, després d'una disrupció química de la barrera epitelial, donen lloc a cèl·lules Th17. Aquests resultats també indiquen que les cèl·lules T específiques contra la microbiota es formen a partir dels senyals obtinguts al medi inflamatori enlloc de dependre de l'especificitat antigènica²⁸⁸.

D'altra banda, també resulta interessant fixar-nos en un estudi genètic recent fet en pacients amb MII on s'identifiquen associacions causals entre l'al·lel d'HLA-II, HLR-DRB1*01:03 i la MC²⁸⁹, indicant que la resposta immunitària adaptativa juga un rol central en aquesta malaltia. Aquest estudi dona suport als nostres resultats així com també a la teoria de què les cèl·lules T CD4⁺ específiques contra antígens de la microbiota comensal poden contribuir a la inflamació intestinal en el context de la MC.

Així mateix, és probable que aquestes cèl·lules T circulants que reaccionen contra antígens de la microbiota comensal en els pacients amb MC siguin reclutades a la mucosa intestinal durant les recaigudes de la malaltia. De fet, en aquest estudi hem pogut demostrar que aquestes cèl·lules T específiques contra els antígens comensals presenten més expressió de $\beta 7$ que les cèl·lules dels mateixos pacients amb MC que reaccionen contra TT. L'expressió de $\beta 7$ (que en sang perifèrica està associada generalment amb l'expressió d' $\alpha 4$) afavoreix la unió a MAdCAM-1 que s'expressa constitutivament en les vècules endotelials altes i en l'endoteli vascular intestinal

inflammat. Per tal d'avaluar el potencial proinflamatori que podien tenir les cèl·lules T específiques contra FlaX, A4-fla2 i YidX en l'intestí, vam posar en cultiu els sobrenedants derivats d'aquestes cèl·lules sobre criptes epitelials que provenien de segments de còlon d'individus que no patien MII però que s'havien sotmès a cirurgia. Cal destacar que vam observar que el còctel de citocines produït per les cèl·lules dels pacients amb MC que eren específiques pels diferents antígens comensals, a diferència de les específiques per TT, van donar lloc a una resposta proinflamatòria en les criptes epitelials intestinals (augmentant l'expressió de CXCL1, CXCL8 i CCL20 per part d'aquestes). Aquest efecte podia estar promogut per la sinèrgia entre la IL17A i les altres citocines secretades per les cèl·lules T específiques contra els antígens comensals, com per exemple el TNF- α . Això concordaria amb els resultats obtinguts en el cultiu primari de criptes així com també en altres estudis que inclouen IL-17 i TNF- α recombinants en línies cel·lulars intestinals²⁷⁷. Per tant, proposem que les cèl·lules específiques contra antígens comensals podrien exacerbar la inflamació intestinal creant un *loop* que afavoriria l'acumulació de cèl·lules Th17 (gràcies a la producció de CCL20) i de neutròfils (degut a l'expressió de CXCL1 i CXCL8) al lloc de la inflamació (Figura 44).

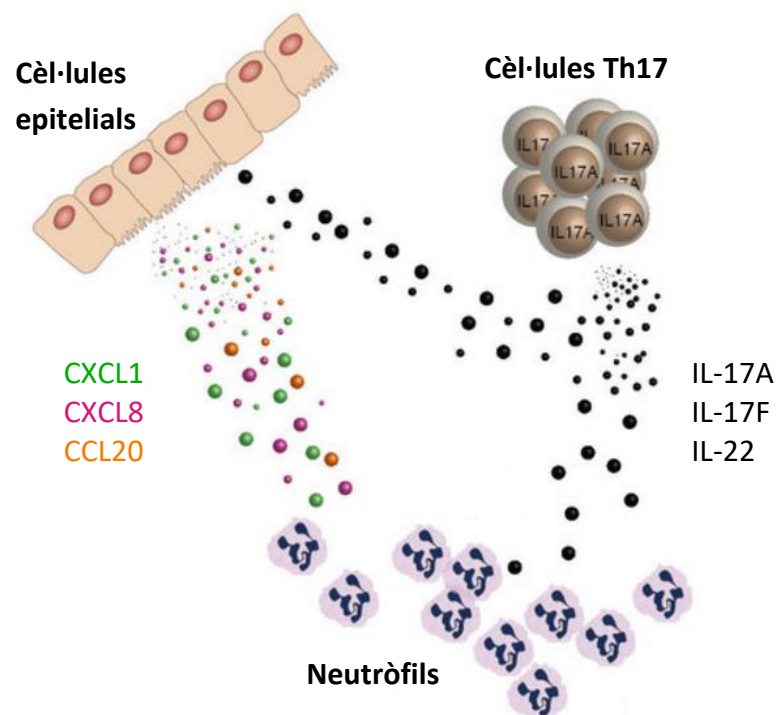


Figura 44: Efecte de les cèl·lules Th17 específiques d'antígens de la microbiota comensal. Les citocines secretades per les cèl·lules Th17 que han reaccionat contra FlaX, A4-fla2 i YidX augmenten l'expressió de CXCL1, CXCL8 i CCL20 per part de les cèl·lules epitelials i afavoreixen al reclutament de neutròfils al lloc d'inflamació.

Un altre assumpte important que vam abordar va consistir en determinar si les respostes de les cèl·lules T CD4⁺ a antígens microbians s'associaven a la presència d'anticossos específics en sèrum. Vam observar que, en la major part dels pacients amb MC, les respostes T CD4⁺ contra FlaX, A4-fla2 i YidX anaven acompanyades de respostes serològiques als mateixos antígens. Tot i que el nombre de pacients és massa petit per poder treure conclusions definitives, els nostres resultats suggereixen que la detecció d'anticossos específics contra aquests antígens pot esdevenir un marcador fiable que indica la presència de la resposta corresponent a aquests antígens per part de les cèl·lules T en pacients amb MC. Cal destacar que la presència d'anticossos anti-YidX en sèrum es correlacionava amb la localització de la malaltia ileocolònica i amb una malaltia de llarga durada, tot i haver analitzat un nombre de pacients molt reduït. De fet, estudis previs que havien utilitzat grans cohorts de pacients amb MC havien identificat correlacions entre anticossos específics per altres proteïnes microbianes i complicacions de la malaltia, incloent-hi la localització ileal^{51, 55}.

Tot i que el nostre estudi no ofereix dades sobre la resposta específica contra antígens de la microbiota comensal en la CU, val a dir que prèviament s'havia descrit que les respostes serològiques contra YidX eren més abundants en pacients amb CU que en pacients amb MC⁵⁷. No obstant, les respostes d'anticossos contra FlaX i A4-fla2 només estaven en un 6% dels pacients amb CU comparat amb el 57% i 59% de pacients amb MC que presentaven respostes contra aquests antígens, respectivament⁵⁵. Degut a què diversos estudis ofereixen evidència de què les cèl·lules Th17 poden estar contribuint a la inflamació intestinal en la CU⁹⁹, podria ser interessant investigar l'especificitat antigènica dels limfòcits T col·laboradors en pacients amb CU, en particular contra YidX.

En general, els nostres resultats assenyalen la IL-17 com a una possible diana a bloquejar per tal de tractar la MC. No obstant, dos assajos clínics de fase II van mostrar els efectes inesperadament negatius de la teràpia anti-IL-17A i anti-IL-17RA^{266, 268}, tot i haver demostrat eficàcia en altres malalties autoimmunitàries²⁹⁰. El resultat d'aquests assajos clínics va remarcar la importància de la IL-17 per controlar les infeccions contra fongs i bacteris extracel·lulars, ja que la seva inhibició va donar lloc a infeccions severes com la candidiasi mucocutània en alguns dels pacients tractats.

A més, cal considerar que la IL-17 també està produïda per altres cèl·lules immunitàries presents a l'intestí, com per exemple les ILCs, les cèl·lules NK o els IELs, i cal tenir en compte que tots aquests tipus cel·lulars poden tenir un rol molt important en la regulació de la homeòstasi intestinal^{128, 291}.

Amb tot això podem dir que la identificació i caracterització de les cèl·lules T CD4⁺ específiques per antígens de la microbiota comensal poden oferir l'oportunitat de modular de forma específica únicament aquestes cèl·lules, sense alterar altres cèl·lules immunitàries productores d'IL-17 que podrien beneficiar la homeòstasi intestinal. Una possibilitat podria ser inhibir únicament aquestes cèl·lules específiques contra FlaX, A4-fla2 i YidX, en lloc d'inhibir únicament la IL-17. Això podria ser una opció terapèutica interessant ja que, a més, podria tenir un impacte sobre altres citocines secretades per aquestes cèl·lules com el TNF- α , que sembla actuar de forma sinèrgica amb la IL-17 per donar lloc a la inflamació intestinal en la MC.

ESTUDI II: Un inhibidor oral del ROR γ t modula les respostes Th17 en sang i en biòpsies intestinals de pacients amb MC i prevé la malaltia en un model murí de colitis

Degut als resultats obtinguts en el primer estudi, on es definia una resposta patogènica per part de les cèl·lules Th17, en aquest segon estudi vam voler analitzar l'eficàcia d'un compost sintetitzat per Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc. capaç d'inhibir ROR γ t com a estratègia terapèutica per tractar la MC.

La inhibició de ROR γ t a través de fàrmacs d'administració oral ha demostrat ser segura i estar ben tolerada en humans. A més, un antagonista de ROR γ t (VTP-43742, Vitae Pharmaceuticals, Inc.) ha donat senyals d'eficàcia en un estudi fase II realitzat en pacients amb psoriasi²⁹².

En el context de la MII, existeix molta evidència de la implicació de la via IL-23/Th17. No obstant, com s'ha comentat anteriorment, la inhibició total de la IL-17 usant mAbs no ha mostrat beneficis en el tractament de la malaltia. Tot i així, la inhibició de ROR γ t com a teràpia alternativa per modular les respostes patogèniques de les cèl·lules Th17 però preservant les respostes protectores podria ser una alternativa al bloqueig amb anticossos. La pregunta clau continua sent si interferir amb les vies dependents de ROR γ t no resultarà en els mateixos efectes negatius observats en els pacients amb MC quan se'ls hi va bloquejar la IL-17.

Hi ha dos llinatges cel·lulars que requereixen l'expressió de ROR γ t per a la seva generació: les cèl·lules Th17¹⁴⁴, incloent la població de limfòcits IEL²⁹³, i les cèl·lules ILC3 que comprenen les cèl·lules LTI (CCR6⁺NCR⁻)¹⁴⁰ i les ILC3s que no expressen CCR6, ja siguin NCR⁺ o NCR⁻.

Les cèl·lules ROR γ t⁺ ofereixen respostes immunitàries contra bacteris i fongs, gràcies a la secreció de diverses citocines (IL-17A, IL-17F, IL-22 i IL-26) que promouen el reclutament de neutròfils i la funció antimicrobiana per part de l'epiteli²⁹⁴. Cal destacar

que aquestes cèl·lules són particularment abundants a la mucosa^{179, 295} i s'ha descrit una desregulació d'aquestes en la inflamació intestinal^{99, 193, 278, 296}.

Tant les cèl·lules Th17 com les ILC3 es caracteritzen per la producció d'IL-17A i IL-22. Tot i així, el requeriment de ROR γ t més enllà de la determinació del llinatge sembla ser diferent entre els diferents subtipus cel·lulars, una consideració molt important a tenir en compte quan s'inhibeix ROR γ t amb agonistes o antagonistes^{272, 273}. En línia amb això, els ratolins que perden constitutivament RORC mostren una colitis exacerbada en el model de DSS i una mortalitat del 100% en resposta a la infecció per *C. rodentium*, tot i que aquests efectes no es poden extrapolar a la inhibició farmacològica del ROR γ t. De fet, els ratolins que són deficients per RORC tenen un defecte en tots els llinatges dependents de ROR γ t (incloent els ILCs), la qual cosa els fa més susceptibles a patir infeccions. En canvi, quan la deleció de RORC no és constitutiva, sinó que s'indueix utilitzant un knockdown condicional on només es fa una deleció de RORC en els ILC3, s'observa que els ratolins mostren nombres preservats d'ILCs IL17A⁺ IL22⁺ en els NLM i d'ILCs IL17A⁺ a la melsa i s'observa una supervivència incrementada a la infecció per *C. rodentium* comparada amb els ratolins que són completament deficients per RORC²⁷⁵.

És interessant observar que el dèficit de RORC en cèl·lules T CD4⁺ resulta en una producció més baixa d'IL17A en els NLM després de la infecció per *C. rodentium*, demostrant diferents requeriments per ROR γ t entre els ILC3s i les cèl·lules Th17. Tots aquests estudis realitzats en models murins suggereixen que mentre que el ROR γ t és necessari pel desenvolupament dels diferents llinatges dependents d'ell, la seva expressió es troba controlant principalment les respostes IL-17 en el compartiment CD4, mentre que l'habilitat dels ILC3s de produir la signatura Th17 és independent de la funció de ROR γ t. Aquesta observació es veu recolzada per uns estudis realitzats en cèl·lules T i ILC3s aïllades d'una cohort pediàtrica de pacients amb MC, on s'observa que després de tractar aquestes cèl·lules amb GSK805 (un inhibidor oral de ROR γ t) troben inhibició de la IL17 i de la IL22 només en les cèl·lules T obtingudes del compartiment de la làmina pròpia, però no en el de les ILC3 (llinatge⁻CD127⁺)²⁷⁵. Per tant, tot i que està clar que les ILC3s depenen de ROR γ t per al seu desenvolupament, encara cal determinar si el receptor nuclear també és necessari pel seu manteniment i funció.

Totes aquestes evidències suggereixen que la inhibició transitòria de l'activitat de ROR γ t pot tenir un impacte efectiu sobre les respostes Th17 en els escenaris rellevants per la malaltia, preservant respostes innates per part de les ILC3s. En concordança amb això, els nostres resultats mostren que la funció efectora dels limfòcits Th17 de la sang perifèrica front als diferents antígens bacterians (FrvX i YidX) es pot modular de manera significativa amb la inhibició de ROR γ t.

A més, hem pogut demostrar que la inhibició de ROR γ t també era capaç d'induir una reducció de les citocines Th17 en biòpsies, tenint un efecte més profund en la regulació transcripcional de la inflamació a l'ili que al còlon. Donat a què les respostes Th17 són més predominants a l'intestí prim²⁹⁷ degut a comunitats microbianes específiques²²⁰, té sentit que els efectes del ROR γ t siguin més potents en aquest tram en particular.

Finalment, vam mostrar que la inhibició de ROR γ t prevé de manera significativa la inflamació intestinal depenent de les cèl·lules T en el model murí de colitis que es basa en la transferència de cèl·lules T CD4⁺CD45RB^{high}. Això recolza el benefici obtingut de bloquejar les respostes Th17 *in vivo* per tal de controlar la inflamació intestinal.

Tota aquesta evidència suggereix que la inhibició transitòria de l'activitat de ROR γ t impacta de manera eficaç en les respostes Th17 en els diferents escenaris rellevants de la malaltia. A més, cal destacar que a la dosi usada, el BI119 no inhibia de manera completa la secreció de la IL-17 per part de les PBMCs específiques d'antígens microbians. Aquesta podria ser una diferència clau respecte a l'ús de mAbs anti-IL-17 que la inhibien per complet. Això podria representar un avantatge a la clínica degut a que d'aquesta manera intentaríem mantenir les respostes de defensa front a diferents bacteris i fongs.

Un altre efecte que caldria destacar és que mentre que el BI119 redueix de manera significativa la producció de la IL-22 per part de les PBMCs dels pacients amb MC, podem observar que aquest compost no regula la transcripció d'aquesta citocina a les biòpsies inflamades procedents de còlons i d'ilis de pacients amb MC. Com s'ha comentat a l'apartat d'introducció, a més dels limfòcits Th17, la producció d'IL-22 és característica dels ILC3⁸⁸, tipus cel·lular que sobretot abunda a l'intestí i que es troba

incrementat en pacients amb MC comparat amb donants sans o pacients amb CU⁸⁹. Tal i com s'ha dit en l'apartat d'introducció, les ILC3s CCR6⁻NCR⁺ (també anomenats NK-22) produeixen IL-22 i IL-26 a la mucosa intestinal humana, però s'ha vist que no produeixen IL-17²⁹⁸. Tindria molt de sentit que el nostre inhibidor no estigui alterant la funció d'aquestes cèl·lules ja que, tal i com s'ha dit a la introducció, aquestes presenten una baixa expressió de ROR γ t. S'ha proposat que aquestes cèl·lules tenen un rol protector a la mucosa degut a la seva habilitat de produir IL-22. Aquesta citocina promou la producció d'IL-10 per part de les cèl·lules epitelials i també les protegeix de l'apoptosi a través de l'activació del factor de transcripció STAT3^{299, 300}. A més, s'ha descrit que té la capacitat de regenerar les cèl·lules mare del compartiment de cèl·lules epitelials³⁰⁰. Així doncs, veiem que el fet de preservar la producció d'IL-22 en el context de la inflamació intestinal tot i la inhibició de ROR γ t és una troballa positiva.

A més de demostrar els efectes del BI119 en la producció de les citocines pròpies de la signatura Th17, hem pogut demostrar tant en les cèl·lules de sang perifèrica que responien a antígens comensals com en les biòpsies ileals de pacients amb MC activa, que la inhibició de ROR γ t reduïa de manera significativa la transcripció del gen del IL23R. Això suggereix que un benefici afegit a aquesta teràpia podria ser el fet d'estar modulant de manera indirecta la resposta d'aquestes cèl·lules a la IL-23. Com s'ha dit anteriorment, la IL-23 és important per l'expansió de les cèl·lules Th17 i s'ha demostrat que és un factor important en el manteniment i l'amplificació de la MC. De fet, un dels tractaments usats actualment per tractar la MC és l'Ustekinumab, un mAb dirigit a bloquejar la subunitat p40 que es troba en la IL-12 i en la IL-23³⁰¹. D'altra banda, trobem el Risankizumab, un mAb anti-p19, que per tant inhibeix únicament la IL-23, i que ha demostrat eficàcia en un assaig clínic de fase II (Figura 45).

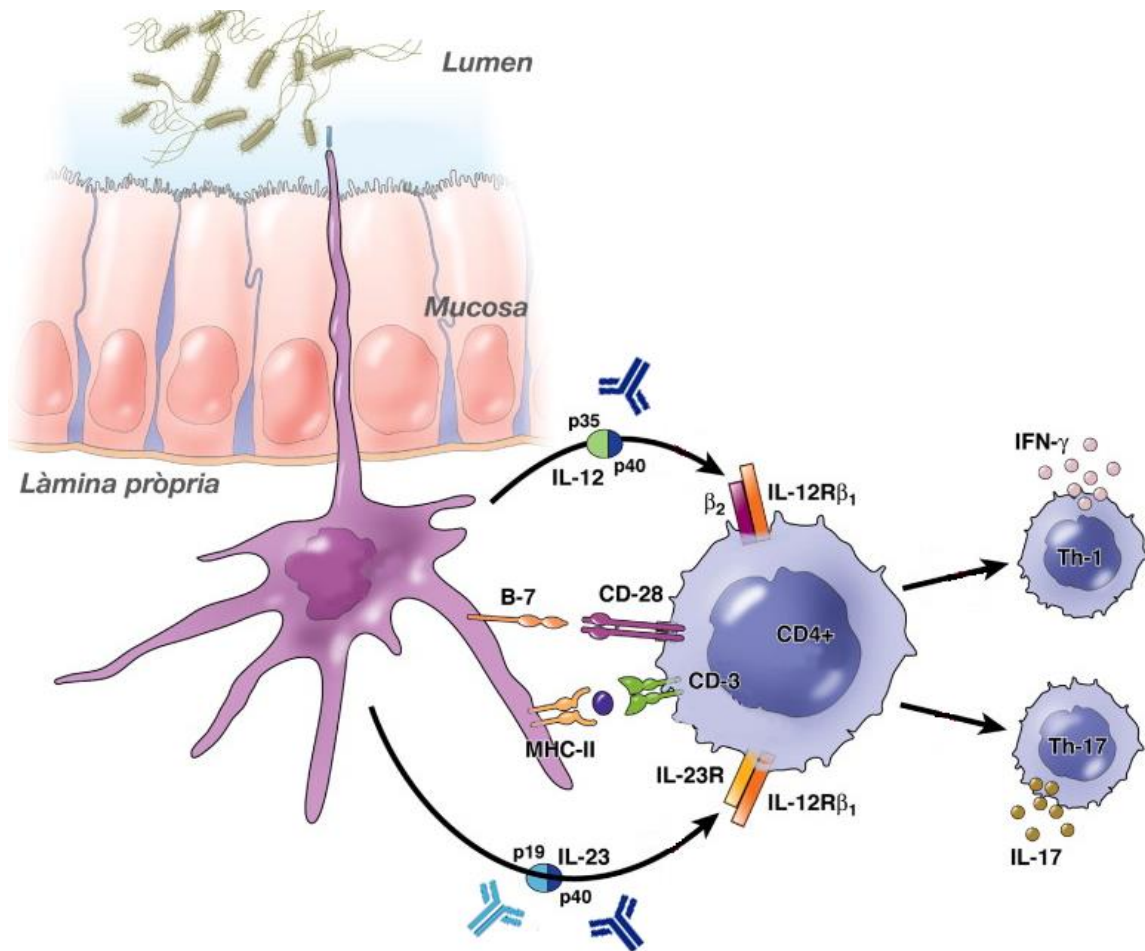


Figura 45: Lloc d'actuació dels mAbs dirigits a inhibir les subunitats p19 o p40. L'Ustekinumab (blau fosc) inhibeix la subunitat p40 present a la IL-12 i a la IL-23, alterant per tant les vies Th1 i Th17, mentre que el Risankizumab (blau clar) va dirigit a inhibir la subunitat p19, present a la IL-23 i bloquejant únicament la via Th17.

Un altre avantatge que ofereix l'ús del BI119 respecte a l'ús de mAb anti-IL-17A (Secukinumab) i anti-IL-17R (Brodalumab) és la potencial activació del programa dependent de FoxP3 després de l'antagonisme de ROR γ t. Està ben descrit que els programes de diferenciació dels limfòcits Th17 i Treg competeixen entre ells^{119, 302}. De fet, el ROR γ t s'associa físicament al FoxP3 per antagonitzar les seves funcions²⁷¹. En aquest estudi hem demostrat que l'ús del BI119 ens permet bloquejar de manera específica la signatura Th17 mentre que preserva les poblacions Th1 i Th2 en els cultius de les PBMCs provinents de pacients amb MC. En canvi, tant la transcripció de FoxP3 com la secreció d'IL-10 augmenten en les cèl·lules que van estar cultivades amb els antígens bacterians FrvX i YidX i que havien sigut tractades amb l'inhibidor de ROR γ t.

Aquesta observació és consistent amb el treball dut a terme al laboratori del Kuchroo, usant cèl·lules Th17 murines diferenciades *in vitro*²⁷¹.

Tot i que ni els nostres resultats ni els resultats obtinguts en altres estudis han sigut capaços de confirmar la naturalesa reguladora de les cèl·lules T després de la seva exposició a l'antagonista de ROR γ t, aquesta observació suggereix un possible benefici de l'ús d'aquesta teràpia vers d'altres. La possibilitat de què l'antagonisme de ROR γ t doni lloc a un canvi en la resposta específica contra l'antigen a un fenotip tolerogènic en els pacients amb MC resulta molt intrigant i atractiva. No obstant, això tan sols és una hipòtesi que necessita ser estudiada amb profunditat per tal de ser confirmada amb certesa.

En definitiva, basant-nos en els resultats obtinguts en el nostre estudi i en estudis previs, proposem que la inhibició de ROR γ t pot bloquejar de manera efectiva les respostes dels limfòcits Th17 tant en sang perifèrica com en la mucosa de pacients amb MC. Per contra, aquest inhibidor no altera la transcripció de la IL22 potencialment provinent de diferents tipus cel·lulars pertanyents a la immunitat innata a la mucosa, fet que resultaria positiu degut als efectes protectors per l'epiteli associats a aquesta citocina. Tanmateix, aquesta estratègia diferiria de l'ús del Secukinumab i del Brodalumab (que van tenir efectes negatius) en què el BI119 no bloqueja de manera completa la IL-17, que com s'ha dit, és important per la defensa contra bacteris extracel·lulars i fongs. Altrament, una possibilitat és que l'antagonisme de ROR γ t, a diferència del bloqueig d'IL-17, ens podria permetre una transició de les cèl·lules que expressin ROR γ t cap a un fenotip de cèl·lula Treg, hipòtesi que, com s'ha comentat, necessitaríem explorar amb molt més detall.



CONCLUSIONS

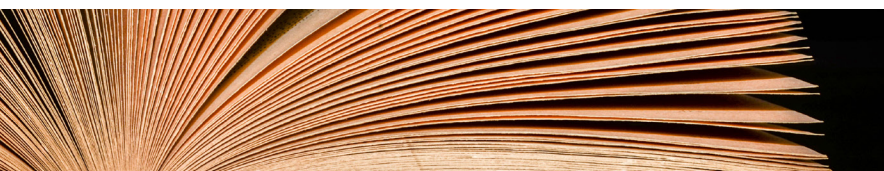
Les conclusions que es poden extreure del primer estudi són les següents:

1. Els pacients amb MC presenten una resposta T CD4⁺ incrementada en resposta als antígens FlaX, A4-fla2 i YidX, provinents d'*E.coli* comensal. Aquesta resposta es correlaciona en gran part amb la presència d'anticossos en sèrum.
2. Els limfòcits T CD4⁺ dels pacients amb MC que reaccionen de manera específica enfront de FlaX, A4-fla2 i YidX presenten una signatura transcripcional relacionada amb la població Th17.
3. Els limfòcits T CD4⁺ que són activats contra els diferents antígens de la microbiota comensal expressen més $\beta 7$ que els limfòcits T CD4⁺ que són activats enfront de TT.
4. La IL-17 i el TNF- α indueixen una sobreexpressió de CXCL1, CXCL8 i CCL20 en criptes intestinals sanes.
5. Les citocines produïdes pels limfòcits específics pels diferents antígens de la microbiota comensal promouen la producció de quimiocines proinflamatòries per part de criptes epitelials sanes.
6. Els efectes observats en les criptes intestinals depenen en part de la IL-17 produïda pels limfòcits específics contra la microbiota intestinal.

Les conclusions que deriven del segon estudi s'anomenen a continuació:

1. El compost BI119 inhibeix eficaçment l'expressió del fenotip Th17 en les PBMCs de pacients amb MC estimulades amb diferents antígens de la microbiota comensal.
2. La inhibició de ROR γ t no interfereix en les respostes Th1 ni Th2, però indueix un lleuger augment de la població T reguladora.
3. La inhibició específica de ROR γ t en els limfòcits T CD4⁺ específics d'antígens de la microbiota comensal modula les respostes proinflamatòries en criptes epitelials sanes.

4. El BI119 inhibeix la majoria dels gens relacionats amb la població Th17 en la mucosa inflamada de pacients amb MC però en preserva d'altres com la IL22.
5. L'administració oral del fàrmac BI119 prevé la colitis murina experimental produïda per la transferència de les cèl·lules T $CD4^+CD45RB^{high}$ en ratolins immunosuprimits.



BIBLIOGRAFIA

1. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007;448:427-34.
2. Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2009;361:2066-78.
3. Magro F, Langner C, Driessen A, et al. European consensus on the histopathology of inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* 2013;7:827-51.
4. Vinay Kumar AA, Nelson Fausto, Richard N. Mitchell. *Robbins Basic Pathology* 8th Edition.
5. Crohn BB, Ginzburg, L. & Oppenheimer, G.D. Regional ileitis; a pathologic and clinical entity. *Am. J. Med* 1932;13:583-590.
6. Fishman M. Diagnosis and classification of inflammatory bowel disease. *Can J Gastroenterol* 2001;15:627-8.
7. Laube R, Liu K, Schifter M, et al. Oral and upper gastrointestinal Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2018;33:355-364.
8. Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, et al. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* 2006;55:749-53.
9. Cosnes J, Cattan S, Blain A, et al. Long-term evolution of disease behavior of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2002;8:244-50.
10. Stange EF, Travis SP, Vermeire S, et al. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Gut* 2006;55 Suppl 1:i1-15.
11. Munkholm P, Langholz E, Davidsen M, et al. Intestinal cancer risk and mortality in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1993;105:1716-23.
12. Su CG, Judge TA, Lichtenstein GR. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 2002;31:307-27.
13. Rimola J, Ordas I, Rodriguez S, et al. Magnetic resonance imaging for evaluation of Crohn's disease: Validation of parameters of severity and quantitative index of activity. *Inflamm Bowel Dis* 2011;17:1759-68.
14. Sands BE. Biomarkers of Inflammation in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 2015;149:1275-1285 e2.
15. Main J, McKenzie H, Yeaman GR, et al. Antibody to *Saccharomyces cerevisiae* (bakers' yeast) in Crohn's disease. *BMJ* 1988;297:1105-6.
16. Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, et al. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2011;140:1785-94.
17. Gupta N, Bostrom AG, Kirschner BS, et al. Gender differences in presentation and course of disease in pediatric patients with Crohn disease. *Pediatrics* 2007;120:e1418-25.
18. Bernstein CN, Rawsthorne P, Cheang M, et al. A population-based case control study of potential risk factors for IBD. *Am J Gastroenterol* 2006;101:993-1002.
19. Ng SC, Tang W, Ching JY, et al. Incidence and phenotype of inflammatory bowel disease based on results from the Asia-pacific Crohn's and colitis epidemiology study. *Gastroenterology* 2013;145:158-165 e2.

20. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* 2012;142:46-54 e42; quiz e30.
21. Khalili H, Huang ES, Ananthakrishnan AN, et al. Geographical variation and incidence of inflammatory bowel disease among US women. *Gut* 2012;61:1686-92.
22. Nerich V, Monnet E, Etienne A, et al. Geographical variations of inflammatory bowel disease in France: a study based on national health insurance data. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:218-26.
23. Gearry RB, Richardson A, Frampton CM, et al. High incidence of Crohn's disease in Canterbury, New Zealand: results of an epidemiologic study. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:936-43.
24. Ng SC, Tsoi KK, Kamm MA, et al. Genetics of inflammatory bowel disease in Asia: systematic review and meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis* 2012;18:1164-76.
25. Asquith M, Powrie F. An innately dangerous balancing act: intestinal homeostasis, inflammation, and colitis-associated cancer. *J Exp Med* 2010;207:1573-7.
26. Sartor RB. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006;3:390-407.
27. Halme L, Paavola-Sakki P, Turunen U, et al. Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2006;12:3668-72.
28. Yang H, McElree C, Roth MP, et al. Familial empirical risks for inflammatory bowel disease: differences between Jews and non-Jews. *Gut* 1993;34:517-24.
29. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603.
30. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:603-606.
31. Adler J, Rangwalla SC, Dwamena BA, et al. The prognostic power of the NOD2 genotype for complicated Crohn's disease: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2011;106:699-712.
32. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* 2012;491:119-24.
33. Kotlarz D, Beier R, Murugan D, et al. Loss of interleukin-10 signaling and infantile inflammatory bowel disease: implications for diagnosis and therapy. *Gastroenterology* 2012;143:347-55.
34. Uhlig HH, Schwerd T, Koletzko S, et al. The diagnostic approach to monogenic very early onset inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2014;147:990-1007 e3.
35. Mahid SS, Minor KS, Soto RE, et al. Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Mayo Clin Proc* 2006;81:1462-71.
36. Higuchi LM, Khalili H, Chan AT, et al. A prospective study of cigarette smoking and the risk of inflammatory bowel disease in women. *Am J Gastroenterol* 2012;107:1399-406.
37. Ananthakrishnan AN, Khalili H, Konijeti GG, et al. Long-term intake of dietary fat and risk of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 2014;63:776-84.
38. Ananthakrishnan AN, Khalili H, Konijeti GG, et al. A prospective study of long-term intake of dietary fiber and risk of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2013;145:970-7.

39. Cornish JA, Tan E, Simillis C, et al. The risk of oral contraceptives in the etiology of inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2008;103:2394-400.
40. Ananthakrishnan AN, Higuchi LM, Huang ES, et al. Aspirin, nonsteroidal anti-inflammatory drug use, and risk for Crohn disease and ulcerative colitis: a cohort study. *Ann Intern Med* 2012;156:350-9.
41. Bonaz BL, Bernstein CN. Brain-gut interactions in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2013;144:36-49.
42. Bailey MT, Dowd SE, Galley JD, et al. Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: implications for stressor-induced immunomodulation. *Brain Behav Immun* 2011;25:397-407.
43. Goodhand J, Rampton D. Psychological stress and coping in IBD. *Gut* 2008;57:1345-7.
44. Khalili H, Ananthakrishnan AN, Konijeti GG, et al. Physical activity and risk of inflammatory bowel disease: prospective study from the Nurses' Health Study cohorts. *BMJ* 2013;347:f6633.
45. Kinnucan JA, Rubin DT, Ali T. Sleep and inflammatory bowel disease: exploring the relationship between sleep disturbances and inflammation. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* 2013;9:718-27.
46. Pasternak BA, D'Mello S, Jurickova, II, et al. Lipopolysaccharide exposure is linked to activation of the acute phase response and growth failure in pediatric Crohn's disease and murine colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2010;16:856-69.
47. Ott SJ, Musfeldt M, Wenderoth DF, et al. Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut* 2004;53:685-93.
48. Nygard L. Study reveals that people may inherit 'gut' bacteria that cause Crohn's disease and ulcerative colitis. 2014.
49. Berg DJ, Davidson N, Kuhn R, et al. Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. *J.Clin.Invest* 1996;98:1010-1020.
50. Cong Y, Brandwein SL, McCabe RP, et al. CD4+ T cells reactive to enteric bacterial antigens in spontaneously colitic C3H/HeJBir mice: increased T helper cell type 1 response and ability to transfer disease. *J Exp Med* 1998;187:855-64.
51. Targan SR, Landers CJ, Yang H, et al. Antibodies to CBir1 flagellin define a unique response that is associated independently with complicated Crohn's disease. *Gastroenterology* 2005;128:2020-8.
52. Elson CO, Cong Y, McCracken VJ, et al. Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunol Rev* 2005;206:260-76.
53. Landers CJ, Cohavy O, Misra R, et al. Selected loss of tolerance evidenced by Crohn's disease-associated immune responses to auto- and microbial antigens. *Gastroenterology* 2002;123:689-99.
54. Lodes MJ, Cong Y, Elson CO, et al. Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease. *J Clin Invest* 2004;113:1296-306.
55. Schoepfer AM, Schaffer T, Mueller S, et al. Phenotypic associations of Crohn's disease with antibodies to flagellins A4-Fla2 and Fla-X, ASCA, p-ANCA, PAB, and NOD2 mutations in a Swiss Cohort. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:1358-67.

56. Duck LW, Walter MR, Novak J, et al. Isolation of flagellated bacteria implicated in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:1191-201.
57. Chen CS, Sullivan S, Anderson T, et al. Identification of novel serological biomarkers for inflammatory bowel disease using *Escherichia coli* proteome chip. *Mol Cell Proteomics* 2009;8:1765-76.
58. Ferrante M, Henckaerts L, Joossens M, et al. New serological markers in inflammatory bowel disease are associated with complicated disease behaviour. *Gut* 2007;56:1394-403.
59. Mow WS, Vasiliauskas EA, Lin YC, et al. Association of antibody responses to microbial antigens and complications of small bowel Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004;126:414-24.
60. Arnott ID, Landers CJ, Nimmo EJ, et al. Sero-reactivity to microbial components in Crohn's disease is associated with disease severity and progression, but not NOD2/CARD15 genotype. *Am J Gastroenterol* 2004;99:2376-84.
61. van Schaik FD, Oldenburg B, Hart AR, et al. Serological markers predict inflammatory bowel disease years before the diagnosis. *Gut* 2013;62:683-8.
62. Shen C, Landers CJ, Derkowski C, et al. Enhanced CBir1-specific innate and adaptive immune responses in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:1641-51.
63. Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, et al. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin.Exp.Immunol.* 1995;102:448-455.
64. Duchmann R, May E, Heike M, et al. T cell specificity and cross reactivity towards enterobacteria, bacteroides, bifidobacterium, and antigens from resident intestinal flora in humans. *Gut* 1999;44:812-8.
65. Duchmann R, Marker-Hermann E, Meyer zum Buschenfelde KH. Bacteria-specific T-cell clones are selective in their reactivity towards different enterobacteria or *H. pylori* and increased in inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol* 1996;44:71-9.
66. Salim SY, Soderholm JD. Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2011;17:362-81.
67. Bauer H, Horowitz RE, Levenson SM, et al. The response of the lymphatic tissue to the microbial flora. Studies on germfree mice. *Am J Pathol* 1963;42:471-83.
68. Buisine MP, Desreumaux P, Debailleul V, et al. Abnormalities in mucin gene expression in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 1999;5:24-32.
69. Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, et al. Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2003;9:215-23.
70. Wehkamp J, Salzman NH, Porter E, et al. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:18129-34.
71. Radtke F, Clevers H. Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science* 2005;307:1904-9.
72. Torres J, Mehandru S, Colombel JF, et al. Crohn's disease. *Lancet* 2017;389:1741-1755.
73. Yamamoto-Furusho JK, Korzenik JR. Crohn's disease: innate immunodeficiency? *World J Gastroenterol* 2006;12:6751-5.

74. Idris-Khodja N, Mian MO, Paradis P, et al. Dual opposing roles of adaptive immunity in hypertension. *Eur Heart J* 2014;35:1238-44.
75. Takayama T, Kamada N, Chinen H, et al. Imbalance of NKp44(+)NKp46(-) and NKp44(-)NKp46(+) natural killer cells in the intestinal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2010;139:882-92, 892 e1-3.
76. Van Ierssel AJ, Van der Sluys Veer A, Verspaget HW, et al. Budesonide and prednisolone suppress peripheral blood natural killer cells in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1995;9:173-8.
77. Bar-Ephraim YE, Mebius RE. Innate lymphoid cells in secondary lymphoid organs. *Immunol Rev* 2016;271:185-99.
78. Withers DR, Gaspal FM, Mackley EC, et al. Cutting edge: lymphoid tissue inducer cells maintain memory CD4 T cells within secondary lymphoid tissue. *J Immunol* 2012;189:2094-8.
79. Lee JS, Cella M, McDonald KG, et al. AHR drives the development of gut ILC22 cells and postnatal lymphoid tissues via pathways dependent on and independent of Notch. *Nat Immunol* 2011;13:144-51.
80. Qiu J, Heller JJ, Guo X, et al. The aryl hydrocarbon receptor regulates gut immunity through modulation of innate lymphoid cells. *Immunity* 2012;36:92-104.
81. Kiss EA, Vonarbourg C, Kopfmann S, et al. Natural aryl hydrocarbon receptor ligands control organogenesis of intestinal lymphoid follicles. *Science* 2011;334:1561-5.
82. Sanos SL, Bui VL, Mortha A, et al. RORgammat and commensal microflora are required for the differentiation of mucosal interleukin 22-producing NKp46+ cells. *Nat Immunol* 2009;10:83-91.
83. Klose CS, Kiss EA, Schwierzeck V, et al. A T-bet gradient controls the fate and function of CCR6-RORgammat+ innate lymphoid cells. *Nature* 2013;494:261-5.
84. Sonnenberg GF, Monticelli LA, Alenghat T, et al. Innate lymphoid cells promote anatomical containment of lymphoid-resident commensal bacteria. *Science* 2012;336:1321-5.
85. Hanash AM, Dudakov JA, Hua G, et al. Interleukin-22 protects intestinal stem cells from immune-mediated tissue damage and regulates sensitivity to graft versus host disease. *Immunity* 2012;37:339-50.
86. Bernink JH, Krabbendam L, Germar K, et al. Interleukin-12 and -23 Control Plasticity of CD127(+) Group 1 and Group 3 Innate Lymphoid Cells in the Intestinal Lamina Propria. *Immunity* 2015;43:146-60.
87. Bernink JH, Peters CP, Munneke M, et al. Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. *Nat Immunol* 2013;14:221-9.
88. Peters CP, Mjosberg JM, Bernink JH, et al. Innate lymphoid cells in inflammatory bowel diseases. *Immunol Lett* 2016;172:124-31.
89. Geremia A, Arancibia-Carcamo CV, Fleming MP, et al. IL-23-responsive innate lymphoid cells are increased in inflammatory bowel disease. *J Exp Med* 2011;208:1127-33.
90. Fuchs A, Vermi W, Lee JS, et al. Intraepithelial type 1 innate lymphoid cells are a unique subset of IL-12- and IL-15-responsive IFN-gamma-producing cells. *Immunity* 2013;38:769-81.

91. Li J, Doty AL, Iqbal A, et al. The differential frequency of Lineage(-)CRTH2(-)CD45(+)Nkp44(-)CD117(-)CD127(+)ILC subset in the inflamed terminal ileum of patients with Crohn's disease. *Cell Immunol* 2016;304-305:63-8.
92. Artis D, Spits H. The biology of innate lymphoid cells. *Nature* 2015;517:293-301.
93. Sieber G, Herrmann F, Zeitz M, et al. Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in patients with Crohn's disease. *Gut* 1984;25:1255-61.
94. Quinton JF, Sendid B, Reumaux D, et al. Anti-Saccharomyces cerevisiae mannan antibodies combined with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease: prevalence and diagnostic role. *Gut* 1998;42:788-91.
95. Harris DP, Haynes L, Sayles PC, et al. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat Immunol* 2000;1:475-82.
96. LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 2008;112:1570-80.
97. Tomita T, Kanai T, Nemoto Y, et al. Colitogenic CD4+ effector-memory T cells actively recirculate in chronic colitic mice. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:1630-40.
98. Parronchi P, Romagnani P, Annunziato F, et al. Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am.J.Pathol.* 1997;150:823-832.
99. Fujino S, Andoh A, Bamba S, et al. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 2003;52:65-70.
100. Powrie F, Leach MW, Mauze S, et al. Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *Int Immunol* 1993;5:1461-71.
101. O'Shea JJ, Paul WE. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science* 2010;327:1098-102.
102. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, et al. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 2000;100:655-69.
103. Romagnani S. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol* 1994;12:227-57.
104. Monteleone G, Biancone L, Marasco R, et al. Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells. *Gastroenterology* 1997;112:1169-78.
105. Breese E, Braegger CP, Corrigan CJ, et al. Interleukin-2- and interferon-gamma-secreting T cells in normal and diseased human intestinal mucosa. *Immunology* 1993;78:127-131.
106. Noguchi M, Hiwatashi N, Liu Z, et al. Enhanced interferon-gamma production and B7-2 expression in isolated intestinal mononuclear cells from patients with Crohn's disease. *J Gastroenterol* 1995;30 Suppl 8:52-5.
107. Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 1997;89:587-96.
108. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299:1057-61.
109. Gagliani N, Amezcua Vesely MC, Iseppon A, et al. Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. *Nature* 2015;523:221-5.

110. Xu T, Stewart KM, Wang X, et al. Metabolic control of TH17 and induced Treg cell balance by an epigenetic mechanism. *Nature* 2017;548:228-233.
111. Eastaff-Leung N, Mabarrack N, Barbour A, et al. Foxp3+ regulatory T cells, Th17 effector cells, and cytokine environment in inflammatory bowel disease. *J Clin Immunol* 2010;30:80-9.
112. Wang AH, Lam WJ, Han DY, et al. The effect of IL-10 genetic variation and interleukin 10 serum levels on Crohn's disease susceptibility in a New Zealand population. *Hum Immunol* 2011;72:431-5.
113. Kucharzik T, Stoll R, Luger N, et al. Circulating antiinflammatory cytokine IL-10 in patients with inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1995;100:452-6.
114. Nielsen OH, Koppen T, Rudiger N, et al. Involvement of interleukin-4 and -10 in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1996;41:1786-93.
115. Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, et al. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest* 1999;103:1345-52.
116. Oppmann B, Lesley R, Blom B, et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 2000;13:715-25.
117. Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, et al. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2003;198:1951-7.
118. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J.Exp.Med.* 2005;201:233-240.
119. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006;441:235-238.
120. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, et al. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 2006;24:179-189.
121. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 2006;441:231-234.
122. Bauquet AT, Jin H, Paterson AM, et al. The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells. *Nat Immunol* 2009;10:167-75.
123. Nurieva R, Yang XO, Martinez G, et al. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* 2007;448:480-3.
124. Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, et al. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 2007;8:942-9.
125. Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C, et al. IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature* 2008;454:350-2.
126. Volpe E, Servant N, Zollinger R, et al. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat Immunol* 2008;9:650-7.

127. Korn T, Bettelli E, Gao W, et al. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 2007;448:484-487.
128. Korn T, Bettelli E, Oukka M, et al. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 2009;27:485-517.
129. Nancey S, Hamzaoui N, Moussata D, et al. Serum interleukin-6, soluble interleukin-6 receptor and Crohn's disease activity. *Dig Dis Sci* 2008;53:242-7.
130. Thompson AI, Lees CW. Genetics of ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2011;17:831-48.
131. Muranski P, Restifo NP. Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood* 2013;121:2402-14.
132. Zhou L, Ivanov II, Spolski R, et al. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* 2007;8:967-74.
133. Yang XO, Panopoulos AD, Nurieva R, et al. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J Biol Chem* 2007;282:9358-63.
134. Harris TJ, Grosso JF, Yen HR, et al. Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity. *J Immunol* 2007;179:4313-7.
135. Hirahara K, Ghoreschi K, Laurence A, et al. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in Th17 cell differentiation. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010;21:425-34.
136. Jetten AM. Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. *Nucl Recept Signal* 2009;7:e003.
137. Hirose T, Smith RJ, Jetten AM. ROR gamma: the third member of ROR/RZR orphan receptor subfamily that is highly expressed in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;205:1976-83.
138. Ortiz MA, Piedrafita FJ, Pfahl M, et al. TOR: a new orphan receptor expressed in the thymus that can modulate retinoid and thyroid hormone signals. *Mol Endocrinol* 1995;9:1679-91.
139. Eberl G, Littman DR. The role of the nuclear hormone receptor RORgamma in the development of lymph nodes and Peyer's patches. *Immunol Rev* 2003;195:81-90.
140. Eberl G, Marmon S, Sunshine MJ, et al. An essential function for the nuclear receptor RORgamma(t) in the generation of fetal lymphoid tissue inducer cells. *Nat Immunol* 2004;5:64-73.
141. Luci C, Reynders A, Ivanov II, et al. Influence of the transcription factor RORgamma on the development of NKp46+ cell populations in gut and skin. *Nat Immunol* 2009;10:75-82.
142. Sun Z, Unutmaz D, Zou YR, et al. Requirement for RORgamma in thymocyte survival and lymphoid organ development. *Science* 2000;288:2369-73.
143. Kurebayashi S, Ueda E, Sakaue M, et al. Retinoid-related orphan receptor gamma (RORgamma) is essential for lymphoid organogenesis and controls apoptosis during thymopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:10132-7.

144. Ivanov, II, McKenzie BS, Zhou L, et al. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell* 2006;126:1121-33.
145. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor- β and induction of the nuclear receptor ROR γ . *Nat Immunol* 2008;9:641-9.
146. Ivanov, II, Zhou L, Littman DR. Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation. *Semin Immunol* 2007;19:409-17.
147. Yang J, Sundrud MS, Skepner J, et al. Targeting Th17 cells in autoimmune diseases. *Trends Pharmacol Sci* 2014;35:493-500.
148. Giguere V, Tini M, Flock G, et al. Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of ROR α , a novel family of orphan hormone nuclear receptors. *Genes Dev* 1994;8:538-53.
149. Matysiak-Scholze U, Nehls M. The structural integrity of ROR α isoforms is mutated in staggerer mice: cerebellar coexpression of ROR α 1 and ROR α 4. *Genomics* 1997;43:78-84.
150. Du J, Huang C, Zhou B, et al. Isoform-specific inhibition of ROR α -mediated transcriptional activation by human FOXP3. *J Immunol* 2008;180:4785-92.
151. Dzhagalov I, Giguere V, He YW. Lymphocyte development and function in the absence of retinoic acid-related orphan receptor α . *J Immunol* 2004;173:2952-9.
152. Dzhagalov I, Zhang N, He YW. The roles of orphan nuclear receptors in the development and function of the immune system. *Cell Mol Immunol* 2004;1:401-7.
153. Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, et al. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR α and ROR γ . *Immunity* 2008;28:29-39.
154. Soroosh P, Wu J, Xue X, et al. Oxysterols are agonist ligands of ROR γ and drive Th17 cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:12163-8.
155. Santori FR, Huang P, van de Pavert SA, et al. Identification of natural ROR γ ligands that regulate the development of lymphoid cells. *Cell Metab* 2015;21:286-298.
156. Fauber BP, Magnuson S. Modulators of the nuclear receptor retinoic acid receptor-related orphan receptor- γ (ROR γ or ROR γ c). *J Med Chem* 2014;57:5871-92.
157. Solt LA, Burris TP. Action of RORs and their ligands in (patho)physiology. *Trends Endocrinol Metab* 2012;23:619-27.
158. Schraml BU, Hildner K, Ise W, et al. The AP-1 transcription factor Batf controls T(H)17 differentiation. *Nature* 2009;460:405-9.
159. Brustle A, Heink S, Huber M, et al. The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nat Immunol* 2007;8:958-66.
160. Zhang F, Meng G, Strober W. Interactions among the transcription factors Runx1, ROR γ and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol* 2008;9:1297-306.
161. Quintana FJ, Basso AS, Iglesias AH, et al. Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 2008;453:65-71.
162. Veldhoen M, Hirota K, Westendorf AM, et al. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* 2008;453:106-9.

163. Ishigame H, Kakuta S, Nagai T, et al. Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucoepithelial bacterial infection and allergic responses. *Immunity* 2009;30:108-19.
164. Happel KI, Dubin PJ, Zheng M, et al. Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*. *J Exp Med* 2005;202:761-9.
165. Huang W, Na L, Fidel PL, et al. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *J Infect Dis* 2004;190:624-31.
166. Conti HR, Shen F, Nayyar N, et al. Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *J Exp Med* 2009;206:299-311.
167. Park H, Li Z, Yang XO, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005;6:1133-41.
168. Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol* 2009;9:556-67.
169. Yao Z, Painter SL, Fanslow WC, et al. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J Immunol* 1995;155:5483-6.
170. Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, et al. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 2007;25:821-52.
171. Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, et al. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity* 2011;34:149-62.
172. Sonnenberg GF, Fouser LA, Artis D. Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nat Immunol* 2011;12:383-90.
173. Brand S, Beigel F, Olszak T, et al. IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 2006;290:G827-G838.
174. Leung JM, Davenport M, Wolff MJ, et al. IL-22-producing CD4+ cells are depleted in actively inflamed colitis tissue. *Mucosal Immunol* 2014;7:124-33.
175. Andoh A, Zhang Z, Inatomi O, et al. Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts. *Gastroenterology* 2005;129:969-984.
176. Dambacher J, Beigel F, Zitzmann K, et al. The role of the novel Th17 cytokine IL-26 in intestinal inflammation. *Gut* 2009;58:1207-17.
177. Pelletier M, Maggi L, Micheletti A, et al. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood* 2010;115:335-43.
178. von Andrian UH, Mackay CR. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med* 2000;343:1020-34.
179. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* 2007;204:1849-61.
180. Baba M, Imai T, Nishimura M, et al. Identification of CCR6, the specific receptor for a novel lymphocyte-directed CC chemokine LARC. *J Biol Chem* 1997;272:14893-8.
181. Zenewicz LA, Antov A, Flavell RA. CD4 T-cell differentiation and inflammatory bowel disease. *Trends Mol Med* 2009;15:199-207.

182. Seiderer J, Elben I, Diegelmann J, et al. Role of the novel Th17 cytokine IL-17F in inflammatory bowel disease (IBD): upregulated colonic IL-17F expression in active Crohn's disease and analysis of the IL17F p.His161Arg polymorphism in IBD. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:437-45.
183. Sugihara T, Kobori A, Imaeda H, et al. The increased mucosal mRNA expressions of complement C3 and interleukin-17 in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 2010;160:386-93.
184. Bogaert S, Laukens D, Peeters H, et al. Differential mucosal expression of Th17-related genes between the inflamed colon and ileum of patients with inflammatory bowel disease. *BMC Immunol* 2010;11:61.
185. Kamada N, Hisamatsu T, Okamoto S, et al. Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN-gamma axis. *J.Clin.Invest* 2008;118:2269-2280.
186. Dige A, Stoy S, Rasmussen TK, et al. Increased levels of circulating Th17 cells in quiescent versus active Crohn's disease. *J Crohns Colitis* 2013;7:248-55.
187. Hor S, Pirzer H, Dumoutier L, et al. The T-cell lymphokine interleukin-26 targets epithelial cells through the interleukin-20 receptor 1 and interleukin-10 receptor 2 chains. *J Biol Chem* 2004;279:33343-51.
188. Hirota K, Yoshitomi H, Hashimoto M, et al. Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. *J Exp Med* 2007;204:2803-12.
189. Rovedatti L, Kudo T, Biancheri P, et al. Differential regulation of interleukin 17 and interferon gamma production in inflammatory bowel disease. *Gut* 2009;58:1629-36.
190. Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, et al. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. *Nature* 2010;467:967-71.
191. Ramesh R, Kozhaya L, McKeivitt K, et al. Pro-inflammatory human Th17 cells selectively express P-glycoprotein and are refractory to glucocorticoids. *J Exp Med* 2014;211:89-104.
192. Kugathasan S, Saubermann LJ, Smith L, et al. Mucosal T-cell immunoregulation varies in early and late inflammatory bowel disease. *Gut* 2007;56:1696-705.
193. Veny M, Esteller M, Ricart E, et al. Late Crohn's disease patients present an increase in peripheral Th17 cells and cytokine production compared with early patients. *Aliment.Pharmacol.Ther.* 2010;31:561-572.
194. Zhang Z, Zheng M, Bindas J, et al. Critical role of IL-17 receptor signaling in acute TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:382-8.
195. Yen D, Cheung J, Scheerens H, et al. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J.Clin.Invest* 2006;116:1310-1316.
196. O'Connor W, Jr., Kamanaka M, Booth CJ, et al. A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation. *Nat Immunol* 2009;10:603-9.
197. Leppkes M, Becker C, Ivanov II, et al. RORgamma-expressing Th17 cells induce murine chronic intestinal inflammation via redundant effects of IL-17A and IL-17F. *Gastroenterology* 2009;136:257-67.
198. Ogawa A, Andoh A, Araki Y, et al. Neutralization of interleukin-17 aggravates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Clin Immunol* 2004;110:55-62.

199. Yang XO, Chang SH, Park H, et al. Regulation of inflammatory responses by IL-17F. *J Exp Med* 2008;205:1063-75.
200. Kinugasa T, Sakaguchi T, Gu X, et al. Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators. *Gastroenterology* 2000;118:1001-11.
201. Sugimoto K, Ogawa A, Mizoguchi E, et al. IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2008;118:534-44.
202. Zenewicz LA, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, et al. Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease. *Immunity* 2008;29:947-57.
203. Yosef N, Shalek AK, Gaublomme JT, et al. Dynamic regulatory network controlling TH17 cell differentiation. *Nature* 2013;496:461-8.
204. Hirota K, Duarte JH, Veldhoen M, et al. Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat Immunol* 2011;12:255-63.
205. Lee YK, Turner H, Maynard CL, et al. Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity* 2009;30:92-107.
206. Cosmi L, De Palma R, Santarasci V, et al. Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. *J Exp Med* 2008;205:1903-16.
207. Xu L, Kitani A, Fuss I, et al. Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. *J Immunol* 2007;178:6725-9.
208. McGeachy MJ, Cua DJ. The link between IL-23 and Th17 cell-mediated immune pathologies. *Semin Immunol* 2007;19:372-6.
209. Tanoue T, Atarashi K, Honda K. Development and maintenance of intestinal regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2016;16:295-309.
210. Li J, Ueno A, Iacucci M, et al. Crossover Subsets of CD4(+) T Lymphocytes in the Intestinal Lamina Propria of Patients with Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *Dig Dis Sci* 2017;62:2357-2368.
211. Ivanov II, Frutos Rde L, Manel N, et al. Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe* 2008;4:337-49.
212. Chen Y, Thai P, Zhao YH, et al. Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/autocrine loop. *J Biol Chem* 2003;278:17036-43.
213. Zhu J, Paul WE. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res* 2010;20:4-12.
214. Baecher-Allan C, Wolf E, Hafler DA. MHC class II expression identifies functionally distinct human regulatory T cells. *J Immunol* 2006;176:4622-31.
215. Konkel JE, Zhang D, Zanvit P, et al. Transforming Growth Factor-beta Signaling in Regulatory T Cells Controls T Helper-17 Cells and Tissue-Specific Immune Responses. *Immunity* 2017;46:660-674.
216. Dang EV, Barbi J, Yang HY, et al. Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1. *Cell* 2011;146:772-84.
217. Hot A, Miossec P. Effects of interleukin (IL)-17A and IL-17F in human rheumatoid arthritis synoviocytes. *Ann Rheum Dis* 2011;70:727-32.

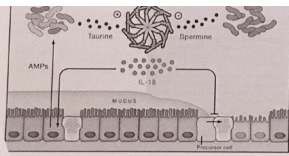
218. Omenetti S, Pizarro TT. The Treg/Th17 Axis: A Dynamic Balance Regulated by the Gut Microbiome. *Front Immunol* 2015;6:639.
219. Ohnmacht C, Marques R, Presley L, et al. Intestinal microbiota, evolution of the immune system and the bad reputation of pro-inflammatory immunity. *Cell Microbiol* 2011;13:653-9.
220. Ivanov, II, Atarashi K, Manel N, et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* 2009;139:485-98.
221. Wu S, Rhee KJ, Albesiano E, et al. A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat Med* 2009;15:1016-22.
222. Uematsu S, Jang MH, Chevrier N, et al. Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c+ lamina propria cells. *Nat Immunol* 2006;7:868-74.
223. Atarashi K, Nishimura J, Shima T, et al. ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation. *Nature* 2008;455:808-12.
224. Gaboriau-Routhiau V, Rakotobe S, Lecuyer E, et al. The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity* 2009;31:677-89.
225. Sczesnak A, Segata N, Qin X, et al. The genome of th17 cell-inducing segmented filamentous bacteria reveals extensive auxotrophy and adaptations to the intestinal environment. *Cell Host Microbe* 2011;10:260-72.
226. Kinnebrew MA, Buffie CG, Diehl GE, et al. Interleukin 23 production by intestinal CD103(+)CD11b(+) dendritic cells in response to bacterial flagellin enhances mucosal innate immune defense. *Immunity* 2012;36:276-87.
227. Lee SJ, McLachlan JB, Kurtz JR, et al. Temporal expression of bacterial proteins instructs host CD4 T cell expansion and Th17 development. *PLoS Pathog* 2012;8:e1002499.
228. Uematsu S, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *J Mol Med (Berl)* 2006;84:712-25.
229. Torchinsky MB, Garaude J, Martin AP, et al. Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs T(H)17 cell differentiation. *Nature* 2009;458:78-82.
230. Elson CO, Cong Y, Weaver CT, et al. Monoclonal anti-interleukin 23 reverses active colitis in a T cell-mediated model in mice. *Gastroenterology* 2007;132:2359-70.
231. Garrett WS, Gordon JI, Glimcher LH. Homeostasis and inflammation in the intestine. *Cell* 2010;140:859-70.
232. Stepankova R, Powrie F, Kofronova O, et al. Segmented filamentous bacteria in a defined bacterial cocktail induce intestinal inflammation in SCID mice reconstituted with CD45RB^{high} CD4⁺ T cells. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:1202-11.
233. Martin B, Hirota K, Cua DJ, et al. Interleukin-17-producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals. *Immunity* 2009;31:321-30.
234. Korn T, Petermann F. Development and function of interleukin 17-producing gammadelta T cells. *Ann N Y Acad Sci* 2012;1247:34-45.

235. Fenoglio D, Poggi A, Catellani S, et al. Vdelta1 T lymphocytes producing IFN-gamma and IL-17 are expanded in HIV-1-infected patients and respond to *Candida albicans*. *Blood* 2009;113:6611-8.
236. Roark CL, French JD, Taylor MA, et al. Exacerbation of collagen-induced arthritis by oligoclonal, IL-17-producing gamma delta T cells. *J Immunol* 2007;179:5576-83.
237. Sutton CE, Lalor SJ, Sweeney CM, et al. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity* 2009;31:331-41.
238. Moreira-Teixeira L, Resende M, Coffre M, et al. Proinflammatory environment dictates the IL-17-producing capacity of human invariant NKT cells. *J Immunol* 2011;186:5758-65.
239. Webster KE, Kim HO, Kyparissoudis K, et al. IL-17-producing NKT cells depend exclusively on IL-7 for homeostasis and survival. *Mucosal Immunol* 2014;7:1058-67.
240. Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2010;10:479-89.
241. Panes J, Gomollon F, Taxonera C, et al. Crohn's disease: a review of current treatment with a focus on biologics. *Drugs* 2007;67:2511-37.
242. Sandborn WJ, Feagan BG, Rutgeerts P, et al. Vedolizumab as induction and maintenance therapy for Crohn's disease. *N Engl J Med* 2013;369:711-21.
243. Jauregui-Amezaga A, Rovira M, Marin P, et al. Improving safety of autologous haematopoietic stem cell transplantation in patients with Crohn's disease. *Gut* 2015.
244. Lopez-Garcia A, Rovira M, Jauregui-Amezaga A, et al. Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Refractory Crohn's Disease: Efficacy in a Single-Centre Cohort. *J Crohns Colitis* 2017.
245. Lovato P, Brender C, Agnholt J, et al. Constitutive STAT3 activation in intestinal T cells from patients with Crohn's disease. *J Biol Chem* 2003;278:16777-81.
246. Flanagan ME, Blumenkopf TA, Brissette WH, et al. Discovery of CP-690,550: a potent and selective Janus kinase (JAK) inhibitor for the treatment of autoimmune diseases and organ transplant rejection. *J Med Chem* 2010;53:8468-84.
247. Danese S, Grisham M, Hodge J, et al. JAK inhibition using tofacitinib for inflammatory bowel disease treatment: a hub for multiple inflammatory cytokines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2016;310:G155-62.
248. Sandborn WJ, Ghosh S, Panes J, et al. A phase 2 study of tofacitinib, an oral Janus kinase inhibitor, in patients with Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2014;12:1485-93 e2.
249. Sandborn WJ, Ghosh S, Panes J, et al. Tofacitinib, an oral Janus kinase inhibitor, in active ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2012;367:616-24.
250. Vermeire S, Schreiber S, Petryka R, et al. Clinical remission in patients with moderate-to-severe Crohn's disease treated with filgotinib (the FITZROY study): results from a phase 2, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 2017;389:266-275.
251. Sandborn W FB, Panes J, et al. Safety and efficacy of ABT-494 (Upadacitinib), an oral Jak1 inhibitor, as induction therapy in patients with Crohn's disease: results from celest. . *Digestive Disease Week, Chicago* 2017.

252. De Vries LCS, Wildenberg ME, De Jonge WJ, et al. The Future of Janus Kinase Inhibitors in Inflammatory Bowel Disease. *J Crohns Colitis* 2017;11:885-893.
253. Vermeire S, O'Byrne S, Keir M, et al. Etrolizumab as induction therapy for ulcerative colitis: a randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet* 2014;384:309-18.
254. Vermeire S, Sandborn WJ, Danese S, et al. Anti-MAdCAM antibody (PF-00547659) for ulcerative colitis (TURANDOT): a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2017;390:135-144.
255. Ardizzone S, Bevivino G, Monteleone G. Mongersen, an oral Smad7 antisense oligonucleotide, in patients with active Crohn's disease. *Therap Adv Gastroenterol* 2016;9:527-32.
256. Monteleone G, Kumberova A, Croft NM, et al. Blocking Smad7 restores TGF-beta1 signaling in chronic inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 2001;108:601-9.
257. Monteleone G, Pallone F. Mongersen, an Oral SMAD7 Antisense Oligonucleotide, and Crohn's Disease. *N Engl J Med* 2015;372:2461.
258. Atreya R, Mudter J, Finotto S, et al. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med* 2000;6:583-8.
259. Ito H, Takazoe M, Fukuda Y, et al. A pilot randomized trial of a human anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in active Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004;126:989-96.
260. Reinisch W, Hommes DW, Van Assche G, et al. A dose escalating, placebo controlled, double blind, single dose and multidose, safety and tolerability study of fontolizumab, a humanised anti-interferon gamma antibody, in patients with moderate to severe Crohn's disease. *Gut* 2006;55:1138-44.
261. Sandborn WJ, Feagan BG, Fedorak RN, et al. A randomized trial of Ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with moderate-to-severe Crohn's disease. *Gastroenterology* 2008;135:1130-41.
262. Sandborn WJ, Gasink C, Gao LL, et al. Ustekinumab induction and maintenance therapy in refractory Crohn's disease. *N Engl J Med* 2012;367:1519-28.
263. Feagan BG, Sandborn WJ, Gasink C, et al. Ustekinumab as Induction and Maintenance Therapy for Crohn's Disease. *N Engl J Med* 2016;375:1946-1960.
264. Sands BE, Chen J, Feagan BG, et al. Efficacy and Safety of MEDI2070, an Antibody Against Interleukin 23, in Patients With Moderate to Severe Crohn's Disease: A Phase 2a Study. *Gastroenterology* 2017;153:77-86 e6.
265. Feagan BG, Sandborn WJ, D'Haens G, et al. Induction therapy with the selective interleukin-23 inhibitor risankizumab in patients with moderate-to-severe Crohn's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet* 2017;389:1699-1709.
266. Targan SR, Vermeire S, Panaccione R, Melmed GY, Blosch C, Newmark R, Zhang N, Chon Y, Lin SL, Klekotka P. Mo2083 A randomized, double-blind, placebo-controlled study to evaluate the safety, tolerability, and efficacy of AMG827 in subjects with moderate to severe Crohn's disease. *Gastroenterology* 2012;143:e26.
267. Thaci D, Blauvelt A, Reich K, et al. Secukinumab is superior to ustekinumab in clearing skin of subjects with moderate to severe plaque psoriasis: CLEAR, a randomized controlled trial. *J Am Acad Dermatol* 2015;73:400-9.

268. Hueber W, Sands BE, Lewitzky S, et al. Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn's disease: unexpected results of a randomised, double-blind placebo-controlled trial. *Gut* 2012.
269. Verstockt B, Deleenheer B, Van Assche G, et al. A safety assessment of biological therapies targeting the IL-23/IL-17 axis in inflammatory bowel diseases. *Expert Opin Drug Saf* 2017;16:809-821.
270. Kim DH, Cheon JH. Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease and Recent Advances in Biologic Therapies. *Immune Netw* 2017;17:25-40.
271. Xiao S, Yosef N, Yang J, et al. Small-molecule ROR γ antagonists inhibit T helper 17 cell transcriptional network by divergent mechanisms. *Immunity* 2014;40:477-89.
272. Huh JR, Leung MW, Huang P, et al. Digoxin and its derivatives suppress TH17 cell differentiation by antagonizing ROR γ activity. *Nature* 2011;472:486-90.
273. Solt LA, Kumar N, Nuhant P, et al. Suppression of TH17 differentiation and autoimmunity by a synthetic ROR ligand. *Nature* 2011;472:491-4.
274. Guendisich U, Weiss J, Ecoeur F, et al. Pharmacological inhibition of ROR γ suppresses the Th17 pathway and alleviates arthritis in vivo. *PLoS One* 2017;12:e0188391.
275. Withers DR, Hepworth MR, Wang X, et al. Transient inhibition of ROR- γ therapeutically limits intestinal inflammation by reducing TH17 cells and preserving group 3 innate lymphoid cells. *Nat Med* 2016;22:319-23.
276. Jung P, Sato T, Merlos-Suarez A, et al. Isolation and in vitro expansion of human colonic stem cells. *Nat Med* 2011;17:1225-7.
277. Lee JW, Wang P, Kattah MG, et al. Differential regulation of chemokines by IL-17 in colonic epithelial cells. *J Immunol* 2008;181:6536-45.
278. Calderon-Gomez E, Bassolas-Molina H, Mora-Buch R, et al. Commensal-Specific CD4(+) Cells From Patients With Crohn's Disease Have a T-Helper 17 Inflammatory Profile. *Gastroenterology* 2016;151:489-500 e3.
279. Blaser MJ, Miller RA, Lacher J, et al. Patients with active Crohn's disease have elevated serum antibodies to antigens of seven enteric bacterial pathogens. *Gastroenterology* 1984;87:888-94.
280. Macpherson A, Khoo UY, Forgacs I, et al. Mucosal antibodies in inflammatory bowel disease are directed against intestinal bacteria. *Gut* 1996;38:365-75.
281. Ergin A, Syrbe U, Scheer R, et al. Impaired peripheral Th1 CD4+ T cell response to *Escherichia coli* proteins in patients with Crohn's disease and ankylosing spondylitis. *J Clin Immunol* 2011;31:998-1009.
282. Pette M, Fujita K, Kitze B, et al. Myelin basic protein-specific T lymphocyte lines from MS patients and healthy individuals. *Neurology* 1990;40:1770-6.
283. Zhang J, Markovic-Plese S, Lacet B, et al. Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 1994;179:973-84.
284. Cao Y, Goods BA, Raddassi K, et al. Functional inflammatory profiles distinguish myelin-reactive T cells from patients with multiple sclerosis. *Sci Transl Med* 2015;7:287ra74.

285. Christmann BS, Abrahamsson TR, Bernstein CN, et al. Human seroreactivity to gut microbiota antigens. *J Allergy Clin Immunol* 2015.
286. Globig AM, Hennecke N, Martin B, et al. Comprehensive Intestinal T Helper Cell Profiling Reveals Specific Accumulation of IFN-gamma+IL-17+Coproducting CD4+ T Cells in Active Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis* 2014.
287. Harbour SN, Maynard CL, Zindl CL, et al. Th17 cells give rise to Th1 cells that are required for the pathogenesis of colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112:7061-6.
288. Hand TW, Dos Santos LM, Bouladoux N, et al. Acute gastrointestinal infection induces long-lived microbiota-specific T cell responses. *Science* 2012;337:1553-6.
289. Goyette P, Boucher G, Mallon D, et al. High-density mapping of the MHC identifies a shared role for HLA-DRB1*01:03 in inflammatory bowel diseases and heterozygous advantage in ulcerative colitis. *Nat Genet* 2015;47:172-9.
290. Hueber W, Patel DD, Dryja T, et al. Effects of AIN457, a fully human antibody to interleukin-17A, on psoriasis, rheumatoid arthritis, and uveitis. *Sci Transl Med* 2010;2:52ra72.
291. Hovhannisyan Z, Treatman J, Littman DR, et al. Characterization of interleukin-17-producing regulatory T cells in inflamed intestinal mucosa from patients with inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2011;140:957-65.
292. McGeehan GM, Palmer SA, Bryson CC, et al. Safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of VTP-43742, a ROR γ t inhibitor, in normal healthy volunteers. *Volume 196: J Immunol*, 2016:4.
293. Weitkamp JH, Rosen MJ, Zhao Z, et al. Small intestinal intraepithelial TCR γ delta+ T lymphocytes are present in the premature intestine but selectively reduced in surgical necrotizing enterocolitis. *PLoS One* 2014;9:e99042.
294. Bettelli E, Korn T, Oukka M, et al. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 2008;453:1051-7.
295. Eberl G. ROR γ mat, a multitask nuclear receptor at mucosal surfaces. *Mucosal Immunol* 2017;10:27-34.
296. Buonocore S, Ahern PP, Uhlig HH, et al. Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology. *Nature* 2010;464:1371-5.
297. Esplugues E, Huber S, Gagliani N, et al. Control of TH17 cells occurs in the small intestine. *Nature* 2011;475:514-8.
298. Cella M, Fuchs A, Vermi W, et al. A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature* 2009;457:722-5.
299. Aparicio-Domingo P, Romera-Hernandez M, Karrich JJ, et al. Type 3 innate lymphoid cells maintain intestinal epithelial stem cells after tissue damage. *J Exp Med* 2015;212:1783-91.
300. Lindemans CA, Calafiore M, Mertelsmann AM, et al. Interleukin-22 promotes intestinal-stem-cell-mediated epithelial regeneration. *Nature* 2015;528:560-564.
301. Deepak P, Sandborn WJ. Ustekinumab and Anti-Interleukin-23 Agents in Crohn's Disease. *Gastroenterol Clin North Am* 2017;46:603-626.
302. Zhou L, Lopes JE, Chong MM, et al. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing ROR γ mat function. *Nature* 2008;453:236-40.



immense interest to study how various metabolites tune the immune response, as this will allow for the identification of key biomarkers and therapeutics. Indeed, Levy et al. (2015) raise the exciting possibility that administration of microbial metabolites such as tauroine could be therapeutic in patients predisposed to IBD.

Taken together, these two papers paint a complex portrait of IL-18 wherein its role at steady state is to bolster the barrier and prevent the outgrowth of more aggressive members of the microbiota, but during instances of severe inflammation, IL-18 expression leads to a loss of goblet cells, depleting barrier

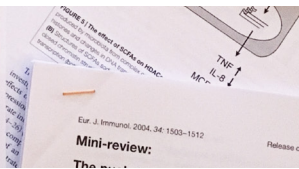


FIGURE 1 The release of TNF and IL-9. TNF and IL-9 are released from the cell. TNF and IL-9 are released from the cell. TNF and IL-9 are released from the cell.

Eur. J. Immunol. 2004, 34:1503-1512

Mini-review:

ANNEX

Publicació derivada dels estudis d'aquesta tesi:

- Calderón-Gómez E, **Bassolas-Molina H**, Mora-Buch R, Dotti I, Planell N, Esteller M, Gallego M, Martí M, Garcia-Martín C, Martínez-Torró C, Ordás I, Singh S, Panés J, Benítez-Ribas D, Salas A. Commensal-Specific CD4(+) Cells From Patients With Crohn's Disease Have a T-Helper 17 Inflammatory Profile. *Gastroenterology* 2016;151:489-500 e3.

Altres publicacions de l'etapa predoctoral fruit de col·laboracions amb altres grups (no inclosa en aquest annex):

- Hebbandi Nanjundappa R, Ronchi F, Wang J, Clemente-Casares X, Yamanouchi J, Sokke Umeshappa C, Yang Y, Blanco J, **Bassolas-Molina H**, Salas A, Khan H, Slattery RM, Wyss M, Mooser C, Macpherson AJ, Sycuro LK, Serra P, McKay DM, McCoy KD, Santamaria P. A Gut Microbial Mimic that Hijacks Diabetogenic Autoreactivity to Suppress Colitis. *Cell*. 2017;171(3):655-667.e17.

BASIC AND TRANSLATIONAL—ALIMENTARY TRACT

Commensal-Specific CD4⁺ Cells From Patients With Crohn's Disease Have a T-Helper 17 Inflammatory Profile



Elisabeth Calderón-Gómez,¹ Helena Bassolas-Molina,¹ Rut Mora-Buch,¹ Isabella Dotti,¹ Núria Planell,^{1,2} Míriam Esteller,¹ Marta Gallego,¹ Mercè Martí,³ Carme Garcia-Martín,³ Carlos Martínez-Torró,³ Ingrid Ordás,¹ Sharat Singh,⁴ Julian Panés,¹ Daniel Benítez-Ribas,¹ and Azucena Salas¹

¹Department of Gastroenterology, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Hospital Clínic, ²Bioinformatics Platform, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Barcelona, Spain; ³Laboratory of Cellular Immunology, Institute of Biotechnology and Biomedicine, Autonomous University of Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Spain; ⁴Department of Research and Development, Prometheus Laboratories, San Diego, California

BACKGROUND & AIMS: Crohn's disease (CD) has been associated with an altered immune response to commensal microbiota, mostly based on increased seroreactivity to microbial proteins. Although T cells are believed to contribute to the development of CD, little is known about the antigens involved. We investigated the antigen-specificity of T cells isolated from patients with CD. **METHODS:** We isolated peripheral blood mononuclear cells from 65 patients with CD and 45 healthy individuals (controls). We investigated T-cell reactivity to commensal microbial antigens using proliferation assays (based on thymidine incorporation and carboxyfluorescein succinimidyl ester dilution). Gene expression patterns were determined using microarray and real-time polymerase chain reaction analyses. Cytokines, chemokines, and antibodies were measured by enzyme-linked immunosorbent assay, flow cytometry, or multiplex cytokine assays. Intestinal crypts were obtained from surgical resection specimens of 7 individuals without inflammatory bowel disease. We examined the effects of commensal-specific CD4⁺ T cells on primary intestinal epithelial cells from these samples. **RESULTS:** The bacterial proteins FlaX, A4-fla2, and YidX increased proliferation of CD4⁺ T cells isolated from peripheral blood of patients with CD compared with controls. In blood samples from controls, CD4⁺ T cells specific for FlaX, A4-fla2, or YidX had a T-helper (Th)1 phenotype; a larger proportion of CD4⁺ T cells specific for these proteins in patients with CD had a Th17 phenotype or produced Th1 and Th17 cytokines. When supernatants collected from commensal-specific CD4⁺ T cells from patients with CD were applied to healthy intestinal epithelial cells, the epithelial cells increased the expression of the chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (CXCL1), CXCL8 and the CC chemokine ligand 20 (CCL20). **CONCLUSIONS:** A larger proportion of commensal-specific CD4⁺ T cells from patients with CD have a Th17 phenotype or produce Th1 and Th17 cytokines, compared with T cells from controls; this might contribute to intestinal inflammation in patients with CD. These cells might be targeted for treatment of CD. The transcriptional data of commensal-specific CD4⁺ T cells from healthy individuals and CD patients have been deposited in the Gene Expression Omnibus at the National Center for Biotechnology Information (accession no: GSE70469).

Keywords: Antigen-Specific Immune Response; IBD; Immunity; Effector T Cells.

Crohn's disease (CD) is a chronic remitting and relapsing inflammatory disease of the intestinal tract that is thought to result from a loss of tolerance to commensal microorganisms. This view is supported strongly by studies conducted in animal models of intestinal inflammation, in which pathogenic CD4⁺ T-cell responses are directed against the enteric microbiota.^{1–4}

In CD patients, antibodies to several microbial components have been detected in serum, indicating an exacerbated acquired immune response toward commensal microbiota. These antibodies recognize microbial components such as *Saccharomyces cerevisiae* oligomannan (anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies [ASCA]),⁵ *Escherichia coli*'s outer membrane protein C (OmpC),⁶ or various subtypes of flagellins such as A4-fla2, FlaX, FliC, or CBir1.^{7–9} The search for novel bacterial-reacting immunoglobulins in the serum of CD has led recently to the identification of new *E coli*-derived seroreactive proteins such as YidX, FrvX, Era, and GabT.¹⁰ Importantly, seroreactivity to microbial antigens correlates with complicated disease,^{3,11,12} encouraging the exploitation of these antibodies as predictors of disease course.^{13–15}

Although the presence of antimicrobial antibodies in CD patients⁶ strongly suggests that a microbial-specific T-helper response is generated as well, little evidence has

Abbreviations used in this paper: Ag, antigen; ASCA, anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibody; CD, Crohn's disease; CFSE, carboxyfluorescein succinimidyl ester; IBD, inflammatory bowel disease; IFN, interferon; IL, interleukin; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; r-IL, recombinant interleukin; TCR, T-cell receptor; Th, T-helper; TT, tetanus toxoid; UC, ulcerative colitis.

Most current article

© 2016 by the AGA Institute. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).
0016-5085

<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2016.05.050>

been found to support the existence of a T-cell response toward bacterial antigens in CD patients.¹⁶ It generally is accepted that T cells, and more specifically CD4⁺ T cells, play a pathogenic role in CD because they heavily infiltrate involved areas of the intestinal mucosa and extensive data from experimental models support this.¹⁷ These cells show T-helper (Th)1 and Th17 proinflammatory profiles.^{18–22} Despite being regarded as pathogenic key players in CD, their antigen specificity remains largely unexplored. Most of the studies that have focused on T-cell reactivity to the intestinal microbiota used total bacterial sonicates or bacterial protein pools to stimulate T cells. Although these data showed that T cells from CD patients overreacted to intestinal bacteria, no specific antigens were identified.^{23–25} More recently, the group of Targan,¹⁶ based on findings in animal models of inflammatory bowel disease, were able to detect CBir1-reactive T cells in CD patients.

Defining an antigen-specific, T-cell response in the context of CD would have many implications. From a pathophysiological point of view, it would reinforce the concept of loss-of-tolerance toward commensal organisms. Moreover, it will enable exploring the nature and function of such cells. From a clinical point of view, it also may provide a possible mechanism for disease relapse and damage progression, as well as potential new specific therapeutic targets.

We therefore set out to investigate the T-cell response to several commensal bacterial- and yeast-derived proteins in CD patients. Our data provide evidence of the existence of commensal microbial-specific CD4⁺ T cells in healthy individuals and in CD patients. More importantly, we show that although commensal-specific CD4⁺ T cells from healthy controls show a Th1 phenotype, these cells present a unique Th17-biased transcriptional and functional profile in CD patients and they are able to amplify the inflammatory response in the intestinal epithelium. Based on these findings, we hypothesize that specifically targeting these microbial-reacting T cells could represent a novel and effective approach to CD treatment.

Materials and Methods

More detailed information is provided in the online [Supplementary Materials and Methods](#) section.

Study Subjects

Patients diagnosed with CD (N = 65) by endoscopic, histologic, and radiologic criteria were recruited for the study. Healthy volunteers (N = 45) without any known underlying acute or chronic pathologic condition served as control donors. Epithelial crypts were obtained from surgical resection specimens from non-inflammatory bowel disease (IBD) individuals (N = 7) undergoing surgery for colorectal cancer; the healthy mucosa was separated from the lesion by at least 10 cm. Demographic and clinical characteristics are summarized in [Supplementary Table 1](#). This study was approved by the Ethics Committee at the Hospital Clínic de Barcelona and was performed in accordance with the principles stated in the Declaration of Helsinki. All patients, healthy controls, and non-IBD subjects signed an informed consent before their inclusion in the study.

Antigen Stimulation of Peripheral Blood Mononuclear Cells

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from heparinized peripheral blood by Ficoll (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) gradient centrifugation. For T-cell proliferation screening, PBMCs were cultured with the microbial commensal antigens ASCA-Ag (*Saccharomyces Cerevisiae* oligomannan; antigen recognized by ASCA), CBir1, FlaX, A4-fla2, and YidX (Prometheus Laboratories, Inc, San Diego, CA) at 1 µg/mL for 7 days. ³H thymidine (1 µCi/well; Amersham, Cambridge, United Kingdom) incorporation took place during the last 16 hours of culture. For major histocompatibility complex II blocking, anti-HLA-DR, -DP, and -DQ (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) was added at 20 µg/mL to the culture. For carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) (Cell Trace CFSE cell proliferation kit; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) staining, PBMCs were incubated with CFSE at 5 µmol/L and cultured with tetanus toxoid (TT; Sigma-Aldrich) and microbial commensal antigens (Prometheus Laboratories, Inc) all at 2 µg/mL for 7 days.

Cytokine Analysis

For intracellular cytokine staining, cells were restimulated with phorbol myristate acetate and ionomycin in the presence of brefeldin A (all from Sigma-Aldrich) for the final 4 hours of culture. Cells were fixed and permeabilized with FIX and PERM (Thermo Fisher Scientific). Cells were stained with a Live/Dead fixable violet dead cell stain kit (Thermo Fisher Scientific) and fluorescent antibodies. Cells were acquired in a Fluorescence-Activated Cell Sorting Canto II (BD Biosciences) and analyzed with BD Fluorescence-Activated Cell Sorting Diva Software v6.1.1.

Cytokine secretion by PBMCs was measured by an enzyme-linked immunosorbent assay or using the multiplex cytokine assay Milliplex Human Th17 magnetic bead (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA).

Cell Sorting of Antigen-Specific CD4⁺ T Cells and RNA Isolation

CFSE-labeled PBMCs were cultured in the presence of TT, FlaX, A4-fla2, or YidX antigens. Recombinant interleukin (IL)2 (20 IU/mL) was added to the culture on day 7. Viable CFSE⁺ CD4⁺ cells were sorted on day 14 of culture in a Fluorescence-Activated Cell Sorting Aria II (BD Biosciences) and restimulated with antigen in the presence of autologous irradiated PBMCs. Ten days later RNA was extracted.

Intestinal Crypt Isolation and Culture

Non-IBD intestinal epithelial crypts were isolated from intestinal tissue as previously described.²⁶ For short-term crypt culture, 30 isolated crypts/25 µL Matrigel (BD Biosciences) were plated and cultured in either complete crypt culture medium or in medium containing supernatants from activated sorted antigen-specific CD4⁺ T cells. Antigen-specific T-cell supernatants were obtained from restimulating sorted cells with anti-CD3 (BD Biosciences) and anti-CD28 (BD Biosciences) at 1 µg/mL for 5 days. Neutralization of IL17 was achieved by preincubation of T-cell supernatants with monoclonal anti-IL17A (R&D Systems, Minneapolis, MN). After overnight culture of crypts, RNA was extracted. Chemokine analysis in culture

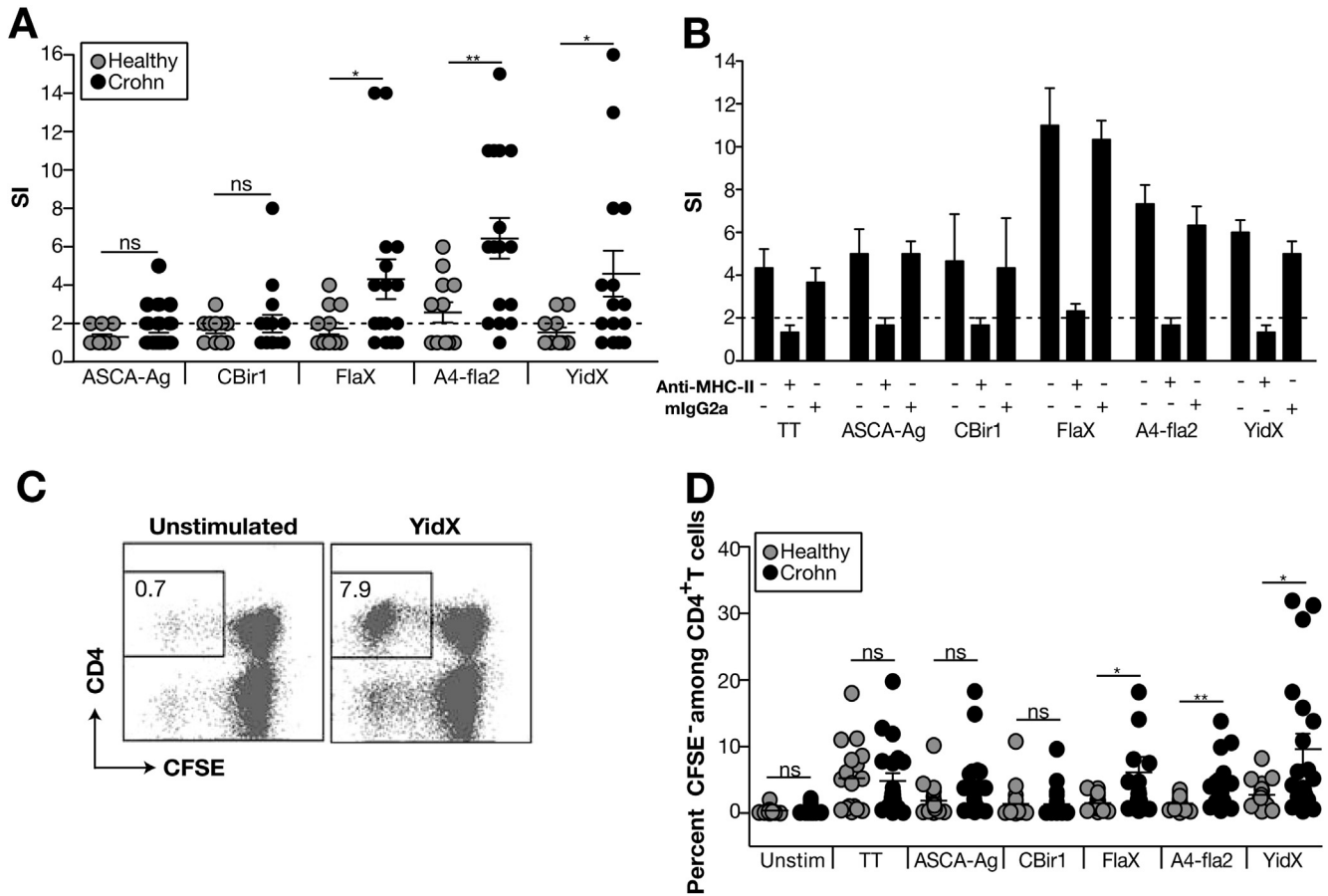


Figure 1. Enhanced proliferative response to commensal microbial antigens in CD patients. (A) Proliferation was measured by ³H-thymidine incorporation in PBMCs from healthy controls (n = 11) and CD patients (n = 16) cultured in the presence of microbial antigens for 7 days. Stimulation index (SI): counts per million from stimulated cells/counts per million unstimulated controls. A dashed line was set at a stimulation index of 2 and indicates the threshold for antigen-specific proliferation. (B) Proliferation measured by ³H-thymidine incorporation of PBMCs from CD patients (n = 3) cultured with microbial antigens in the presence of a human anti-major histocompatibility complex (MHC)-II antibody (anti-HLA-DP-DR-DQ) or isotype control (mlgG2a) for 7 days. (C) Representative fluorescence-activated cell sorting dot plots of CFSE dilution of CD4⁺ T cells after 7 days of culture with YidX. Numbers indicate the frequency of CFSE⁻ cells among live CD4⁺ T cells. (D) Percentage of CFSE⁻ CD4⁺ T cells in CFSE-labeled PBMCs from healthy controls (n = 18) and CD patients (n = 21). Means ± SEM. ns > .05, *P ≤ .05, **P < .01.

supernatant was determined by enzyme-linked immunosorbent assay following the manufacturer’s instructions (R&D Systems).

Statistical Analysis

For 2-group comparisons, the 2-tailed Mann-Whitney-Wilcoxon test was used. One-way analysis of variance was performed using the Kruskal-Wallis statistics test or the Friedman test, both followed by the Dunn post-test. Data associations were analyzed using a Spearman rank correlation test. Statistical analyses were performed using Prism4 (Graphpad Software, San Diego, CA). Error bars show the mean and SEM. P values of .05 or less were considered statistically significant.

Results

Enhanced CD4⁺ T-Cell Proliferation to Commensal Microbial Antigens in CD Patients

We first measured PBMC proliferation to ASCA-Ag, CBir1, FlaX, A4-fla2, and YidX. These antigens were selected based

on reported increased sera reactivity in CD.^{7,9,10,27} CD patients (n = 16) showed a significantly higher stimulation index (defined as the fold-change in proliferation compared with unstimulated PBMCs) than healthy controls (n = 11) in response to FlaX, A4-fla2, and YidX stimulation (Figure 1A). The detected cell proliferation was attributable to antigen-specific-CD4⁺ T cells because it was abrogated specifically by an anti-major histocompatibility complex-II-blocking antibody (Figure 1B). To identify and further characterize antigen-responding CD4⁺ T cells, we used a CFSE-based dilution assay to quantify the percentage of CD4⁺ T cells that proliferated upon antigen stimulation (Figure 1C). TT was included in this assay as a non-commensal-derived bacterial antigen. An independent cohort of healthy controls (n = 18) and CD patients (n = 21) was used for this measurement; of those, 6 CD patients overlapped with data in Figure 1A. Similar to the total PBMC proliferation measured by thymidine incorporation, the percentage of proliferating (CFSE⁻) CD4⁺ cells was significantly higher in CD patients

compared with healthy controls upon FlaX, A4-fla2, and YidX, but not ASCA-Ag or CBir1 stimulation (Figure 1D). In contrast, the proliferative CD4⁺ T cell response to TT was comparable in CD patients and controls, strongly suggesting that increased reactivity to microbial components is a characteristic feature of CD patients.

We focused on FlaX, A4-fla2, and YidX because they drive higher PBMC proliferation (Figure 1A and D) in CD patients and analyzed the co-occurrence of antigen-specific T-cell reactivity. According to data shown in Figure 1A, 75% of CD patients (12 of 16) reacted to at least 1 of the 3 bacterial proteins (stimulation index, ≥ 3); of those, 83% (10 of 12) responded to more than one antigen (Supplementary Figure 1A). Regarding patients included in Figure 1D, more than 60% (14 of 21) showed CD4⁺ T cell reactivity to at least 1 of the 3 bacterial proteins. Of those, 78% (11 of 14) responded to more than 1 bacterial protein (Supplementary Figure 1B).

Next, we determined serologic responses to FlaX, A4-fla2, and YidX in CD patients (n = 19) and healthy controls (n = 17) for whom we had measured the antigen-specific CD4⁺ T-cell response (Figure 1D). Supplementary Figure 2A shows the comparative scatterplot of IgG serologic responses to FlaX, A4-fla2, and YidX in CD patients. Serologic positivity to each antigen was determined as described in the Supplementary Materials and Methods section.

More than 70% (14 of 19) presented with either a CD4⁺ T cell and/or an antibody response. Eighty-five percent of those (12 of 14) had combined serologic and CD4⁺ T-cell responses to at least 1 of the 3 antigens (Supplementary Figure 2B). Regarding each independent antigen, we found that 54% (6 of 11), 58% (7 of 12), and 58% (7 of 12) of the patients presented combined CD4⁺ T cell and antibody responses to FlaX, A4-fla2, and YidX, respectively (Supplementary Figure 2C).

Overall we show that CD patients have increased proliferative CD4⁺ T-cell responses to FlaX, A4-fla2, and YidX, and that these correlate in most individuals with the presence of specific IgG in serum.

We also analyzed the association of antigen-specific T cell and antibody responses with the patients' characteristics (included in Supplementary Table 1), and treatment at the time of the study. Although we did not find any significant association between the T-cell responses and any of the patient variables (data not shown), we did observe a positive association between the presence of YidX-specific antibodies and disease location because a higher number of patients with a positive serologic response present with ileocolonic (L3) disease (Supplementary Figure 3A). Interestingly, the presence of YidX-specific antibody responses also correlated positively with longer disease duration (Supplementary Figure 3B).

FlaX-, A4-fla2-, and YidX-Specific CD4⁺ T Cells From CD Patients Show a Th1 and Th17 Proinflammatory Phenotype

To define the cytokine profile of microbial antigen-driven T-cell responses, we first measured interferon

(IFN)- γ and IL17 in culture supernatants of total PBMCs stimulated for 7 days with TT, ASCA-Ag, CBir1, FlaX, A4-fla2, and YidX. We looked at IFN- γ and IL17 because they are characteristic of Th1 and Th17 responses, respectively, both of which have been associated with gut inflammation in CD.²⁸ Both cytokines were increased significantly in CD compared with control supernatants in response to FlaX, A4-fla2, and YidX (Supplementary Figure 4A and B). IFN- γ also was overproduced significantly by CD patients in response to ASCA-Ag, however, there was no difference in IL17 secretion. No differences in cytokines secretion were detected in response to CBir1. Interestingly, neither IFN- γ nor IL17 secretion induced by stimulation of PBMCs with the noncommensal antigen TT were significantly different in CD compared with healthy controls.

To specifically measure cytokine production by antigen-specific CD4⁺ T cells, we performed intracellular IFN- γ and IL17 staining on CFSE-labeled PBMCs cultured with TT, FlaX, A4-fla2, or YidX (Figure 2A) in an independent group of CD patients and controls. We observed that TT-specific CD4⁺ T cells mainly produced IFN- γ (Figure 2B), both in healthy individuals and CD patients. In contrast, FlaX-, A4-fla2-, and YidX-specific CD4⁺ T cells presented a mixed IFN- γ and IL17 profile. Although the percentage of single IFN- γ ⁺ IL17⁻ cells (Th1) was similar for CD patients and controls (Figure 2B), the frequency of IL17-producing T cells was significantly higher in the former. Remarkably, we noted significantly higher frequencies of IL17⁺ IFN- γ ⁻ single-(Th17) and IL17⁺ IFN- γ ⁺ double-positive (Th17/Th1) CD4⁺ T cells that recognized FlaX, A4-fla2, and YidX in CD patients compared with control individuals (Figure 2C and D). These data indicate that commensal-specific CD4⁺ T cells in CD patients present a Th17 and Th17/Th1 phenotype upon antigen recall that was not observed in T cells responding to the same antigen in healthy controls.

Commensal Antigen-Specific CD4⁺ T Cells From CD Patients Present a Th17-Related Transcriptional Signature

Next, we stimulated CFSE-labeled PBMCs with the commensal antigens FlaX, A4-fla2 or YidX, and sorted out CD4⁺ CFSE⁻ (proliferating) cells from a different cohort of CD patients and healthy controls. Freshly sorted cells then were restimulated with their cognate antigen, and autologous irradiated PBMCs were used as antigen-presenting cells. Total RNA from expanded antigen-specific T cells then was isolated. The whole genomic transcriptional signature of a pool of FlaX-, A4-fla2-, and YidX-specific CD4⁺ T cells was interrogated by microarray analysis and compared CD individuals (n = 10) with healthy controls (n = 8). Differential expression analysis of the microarray identified 299 genes whose expression was significantly different in CD patients compared with controls ($P \leq .05$; $|FC| \geq 1.5$) (Figure 3 and Supplementary Table 2). Among these genes, 37 belonged to the Th17 and Th17.1 transcriptional signatures (marked in purple in Figure 3), as described by Ramesh et al.²⁹ This included the up-regulation of *CCR6*, *IL17F*, *RORC*, *CCL20*, and *IL26* in CD

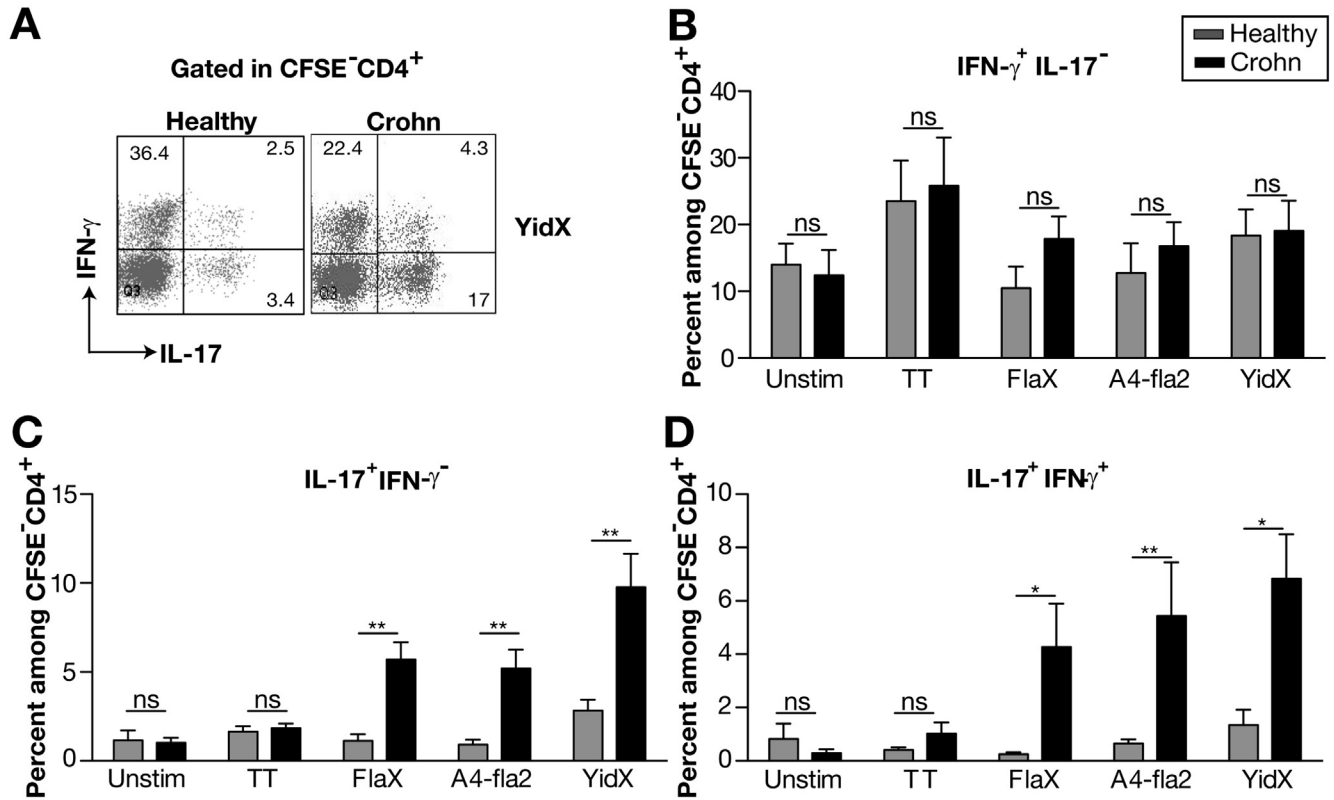


Figure 2. FlaX-, A4-fla2-, and YidX-specific CD4⁺ T cells from CD patients show a Th17/Th1 proinflammatory phenotype. CFSE-labeled PBMCs from healthy controls (n = 8) and CD patients (n = 9) were cultured alone or in the presence of TT, FlaX, A4-fla2, or YidX antigen for 7 days. (A) Representative fluorescence-activated cell sorting plots for IFN-γ and IL17 staining gated on live CFSE⁻ CD4⁺ T cells stimulated with YidX. (B) Frequency of IFN-γ⁺ IL17⁻, (C) IL17⁺ IFN-γ⁻, (D) IL17⁺ IFN-γ⁺ among live CFSE⁻ CD4⁺ T cells. Means ± SEM. ns > .05, *P ≤ .05, **P < .01. MHC, major histocompatibility complex; SI, stimulation index.

commensal antigen-specific CD4⁺ T cells, whereas other genes such as *PTGER2* were down-regulated. To validate the microarray data, a number of Th1 and Th17 signature genes were identified by real-time polymerase chain reaction in an independent group of samples from healthy controls (n = 5) and CD patients (n = 6). Real-time polymerase chain reaction analysis showed higher expression of *RORC*, *IL17A*, and *IL17F* in FlaX-, A4-fla2-, and YidX-specific T cells from CD patients compared with healthy controls (Figure 4A–C). Also in agreement with microarray data, expression of *CCR6* and *PTGER2* was significantly up- and down-regulated, respectively, in A4-fla2- and YidX-specific T cells from CD patients, but not in FlaX-specific T cells (Figure 4D and E). In addition, the expression of *CCL20* was higher in A4-fla2- and YidX-specific T cells from CD patients compared with controls (Figure 4F). Importantly, the Th1 signature genes *TBX21* and *IFNG*, and tumor necrosis factor (*TNF*)A, were expressed similarly in healthy controls and CD microbial antigen-specific T cells (Figure 5).

To investigate the clonality of antigen-specific T cells, we analyzed the T-cell receptor (TCR) repertoire of TT-, FlaX-, A4-fla2-, and YidX-specific CD4⁺ T cells by measuring the complementarity determining region 3 distribution length using spectratyping. We observed a diverse TCR repertoire for the 3 commensal-specific T cells in all individuals with

few monoclonal expansions within the TCR β-variable region. However, we did not detect a bias in TCR β-variable use, excluding the possibility of a superantigen-driven expansion (Supplementary Figure 5).

Activated Commensal Antigen-Specific CD4⁺ T Cells From CD Patients Promote Epithelial Inflammatory Responses

To further characterize commensal-specific T cells from CD patients, we analyzed the expression of the intestinal-homing integrin β7 on antigen-specific CD4⁺ T cells in a total of 10 patients. We observed significantly higher expression of β7 in FlaX-, A4-fla2-, and YidX-specific T cells compared with TT-specific T cells from CD patients (Supplementary Figure 6). Given their characteristic Th17-biased phenotype, as well as their relative increase in β7 surface expression, we asked whether these cells could drive inflammation in the intestinal mucosa. To test the effect of antigen-specific T cells from CD patients on healthy intestinal epithelium, we isolated whole intestinal crypts from non-IBD surgical specimens (Figure 6A) and cultured them in the presence of supernatants from activated sorted TT-, FlaX-, A4-fla2-, and YidX-specific CD4⁺ T cells obtained from an independent cohort of CD patients (n = 5).

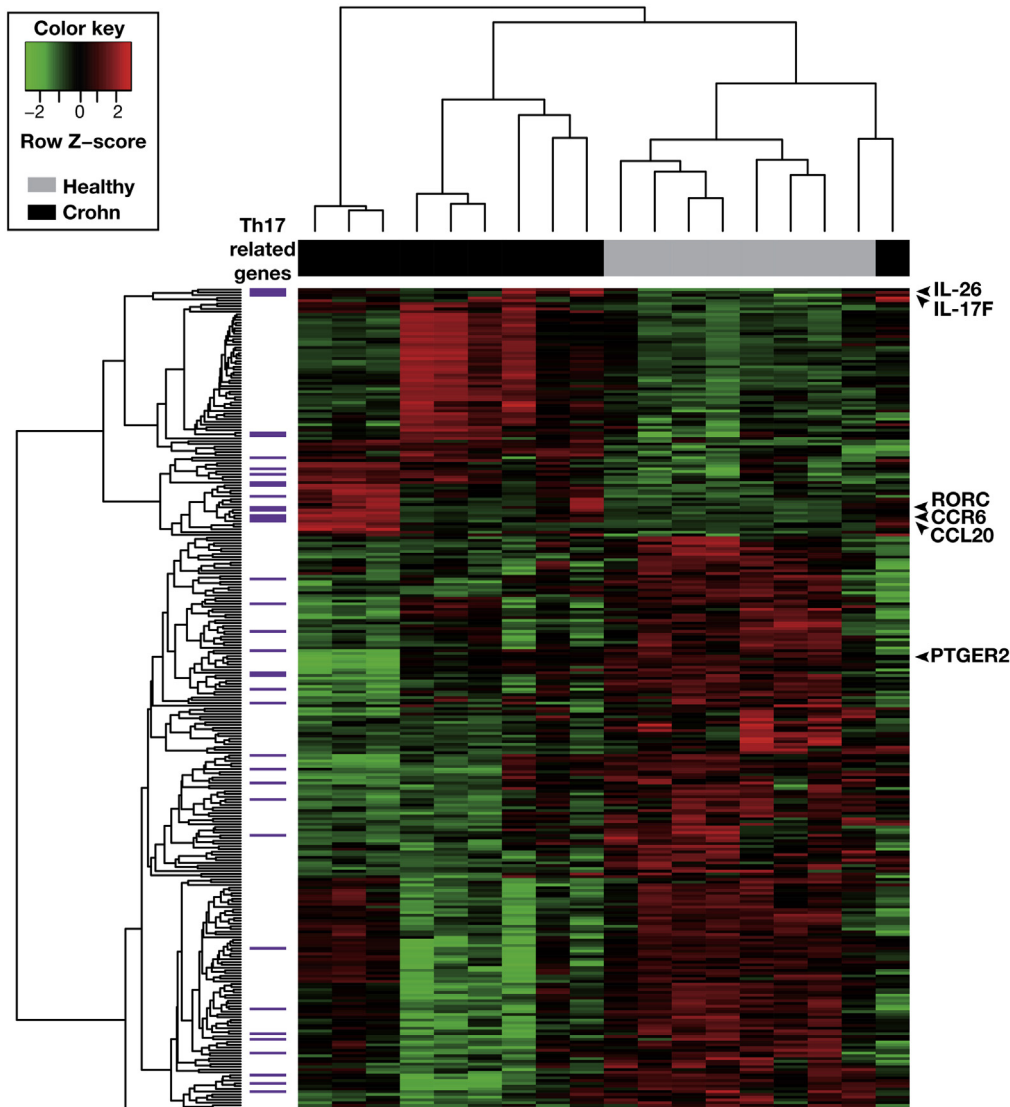


Figure 3. FlaX-, A4-fla2-, and YidX-specific CD4⁺ T cells from CD patients present Th17-biased transcriptional profiles. Differentially expressed genes by commensal microbial antigen (FlaX, A4-fla2, and YidX)-specific CD4⁺ T cells of healthy controls (n = 8) and Crohn's disease patients (n = 10) based on microarray analysis ($P \leq .05$ and $|\text{fold-change}| \geq 2$). Each row shows 1 individual probe (299 differentially expressed genes) and each column shows an experimental sample. Genes related to the Th17 and Th17.1 transcriptional signatures are marked in purple. An unsupervised hierarchical cluster method using Pearson distance and average linkage method was applied for gene and sample classification.

Treatment of isolated intestinal crypts with supernatants from anti-CD3/anti-CD28-activated commensal antigen-specific CD4⁺ T cells induced higher transcriptional expression (Figure 6B and 6D) and protein secretion (Supplementary Figure 7A and B) of the neutrophil-recruiting chemokines *CXCL8* and *CXCL1* compared with crypts that had been cultured with medium alone. Of note, crypts treated with supernatants from activated TT-specific CD4⁺ T cells did not up-regulate *CXCL1* or *CXCL8* expression. Supernatants of commensal-specific T cells also induced higher expression of *CCL20*, a chemoattractant for CCR6-expressing Th17 cells, on non-IBD intestinal crypts (Figure 6C) compared with those treated with supernatants derived from TT-specific T cells; nonetheless, the differences compared with nonactivated crypts were not significant. In contrast, we observed that supernatants from TT induced higher transcriptional and protein expression of the Th1-attracting chemokine *CXCL10* compared with unstimulated crypts (Figure 6E and Supplementary Figure 7C). These results suggest that commensal-specific T cells from

CD patients prompt a predominant neutrophil and Th17 recruitment to the intestinal epithelium.

IL17 Regulates Proinflammatory Chemokine Expression by Intestinal Epithelial Crypts

We next determined which cytokines were present in the T-cell supernatants used to stimulate intestinal epithelial crypts. As predicted by their transcriptional signatures, FlaX-, A4-fla2-, and YidX-specific T-cell supernatants contained high amounts of IL17A, IL17F, IL22, and CCL20 (Supplementary Figure 8A–D), whereas TT-specific T-cell supernatants contained very low concentrations of these cytokines. In contrast, we measured similar amounts of IFN- γ (Supplementary Figure 8E) and TNF- α (Supplementary Figure 8F) in all supernatants regardless of antigen specificity.

It has been observed that IL17 and TNF- α can act synergistically to drive *CXCL8*, *CXCL1*, and *CCL20* expression on epithelial cell lines, whereas IL17 represses the expression

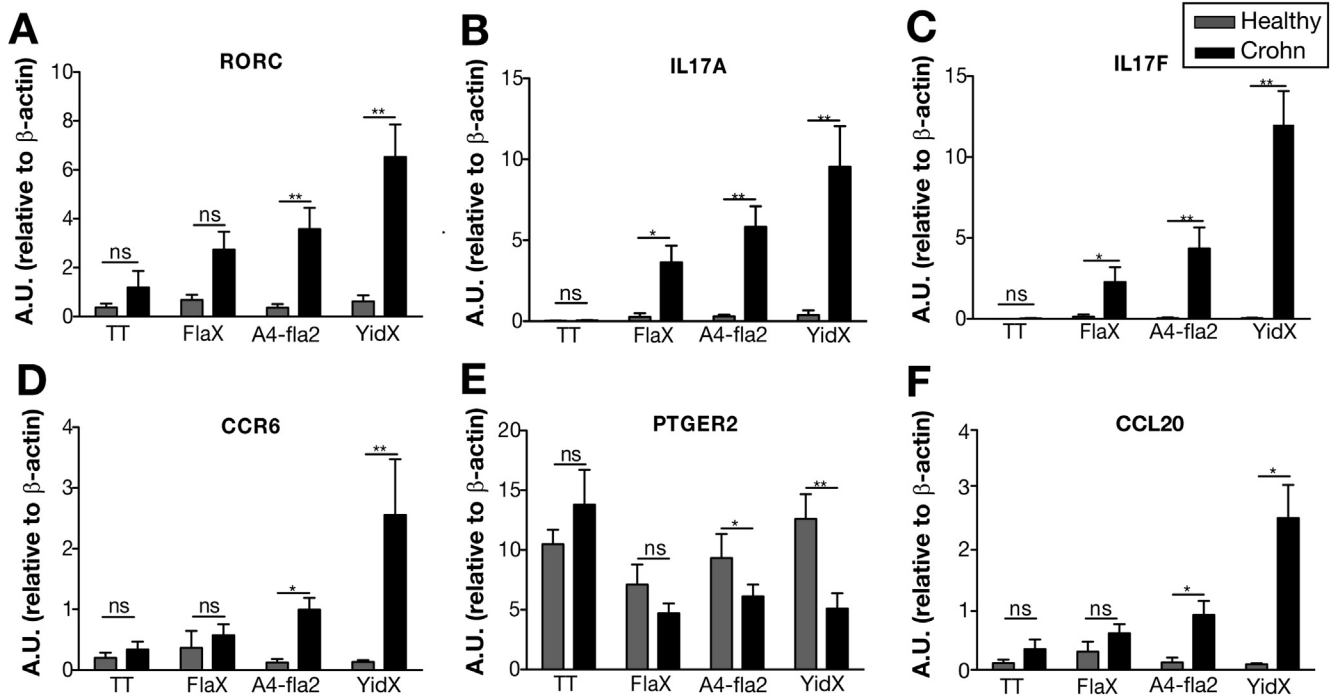


Figure 4. Differential expression of Th17-related genes by commensal antigen-specific CD4⁺ T cells from CD patients. Messenger RNA expression of (A) *RORC*, (B) *IL17A*, (C) *IL17F*, (D) *CCR6*, (E) *PTGER2*, and (F) *CCL20* genes assessed by real-time polymerase chain reaction in sorted antigen-specific CFSE⁻ CD4⁺ T cells from healthy controls (n = 5) and CD patients (n = 6). Arbitrary units (AU) relative to β -actin expression. Means \pm SEM. ns > .05, *P \leq .05, **P < .01.

of *CXCL10*, even in the presence of TNF- α .³⁰ We observed a similar effect on primary intestinal epithelial crypts upon the addition of recombinant IL17 (r-IL17) and TNF- α because they induced increased *CXCL8*, *CXCL1*, and *CCL20* transcriptional expression (Supplementary Figure 9A-C). In contrast, *CXCL10* expression was inhibited when r-IL17 was added to the culture (Supplementary Figure 9D). Interestingly, neutralization of IL17 reduced the synergistic effect of r-IL17 and recombinant TNF- α in the induction of *CXCL8*, *CXCL1*, and *CCL20* (Supplementary Figure 9A-C), but it restored *CXCL10* expression (Supplementary Figure 9D). In line with this, the effect of FlaX-, A4-fla2-, and YidX-specific T-cell supernatants on *CXCL8*, *CXCL1*, and *CCL20* expression

in intestinal crypts was reduced upon neutralization of IL17 (Figure 7A-C). It is worth noting that neutralization of IL17 in commensal-specific T-cell supernatants induced higher expression of *CXCL10* on intestinal crypts (Figure 7D).

Discussion

The loss of tolerance toward commensal bacteria as a mechanism driving CD is widely accepted. To date, it is mostly understood as increased seroreactivity toward a variety of microbial antigens in CD.^{12,13,31-33} This suggests the existence of helper T cells reacting to the same commensal microorganisms. Despite the fact that CD4⁺ T

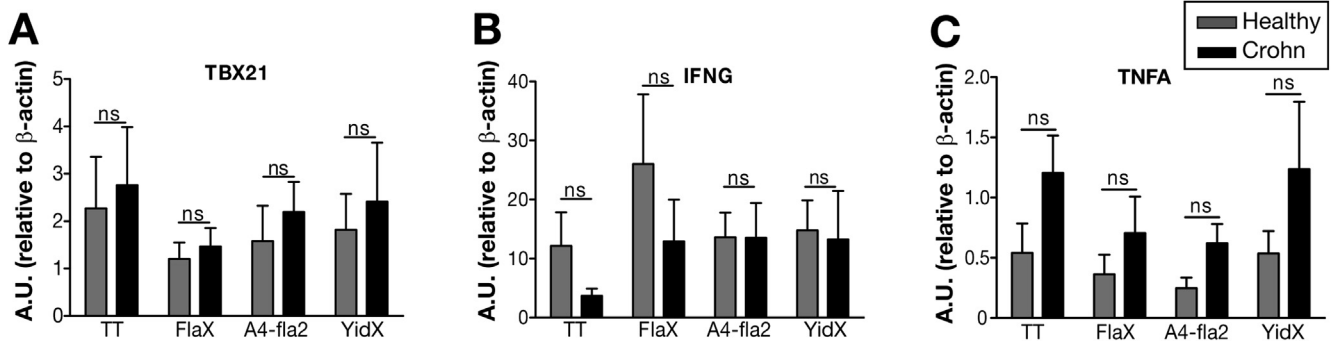


Figure 5. Th1-related genes and *TNFA* are not expressed differently by commensal antigen-specific CD4⁺ T cells from CD and healthy controls. Messenger RNA expression of (A) *TBX21*, (B) *IFNG*, and (C) *TNFA* genes assessed by real-time polymerase chain reaction in sorted antigen-specific CFSE⁻ CD4⁺ T cells from healthy controls (n = 5) and CD patients (n = 6). Arbitrary units (AU) relative to β -actin expression. Means \pm SEM. ns > .05.

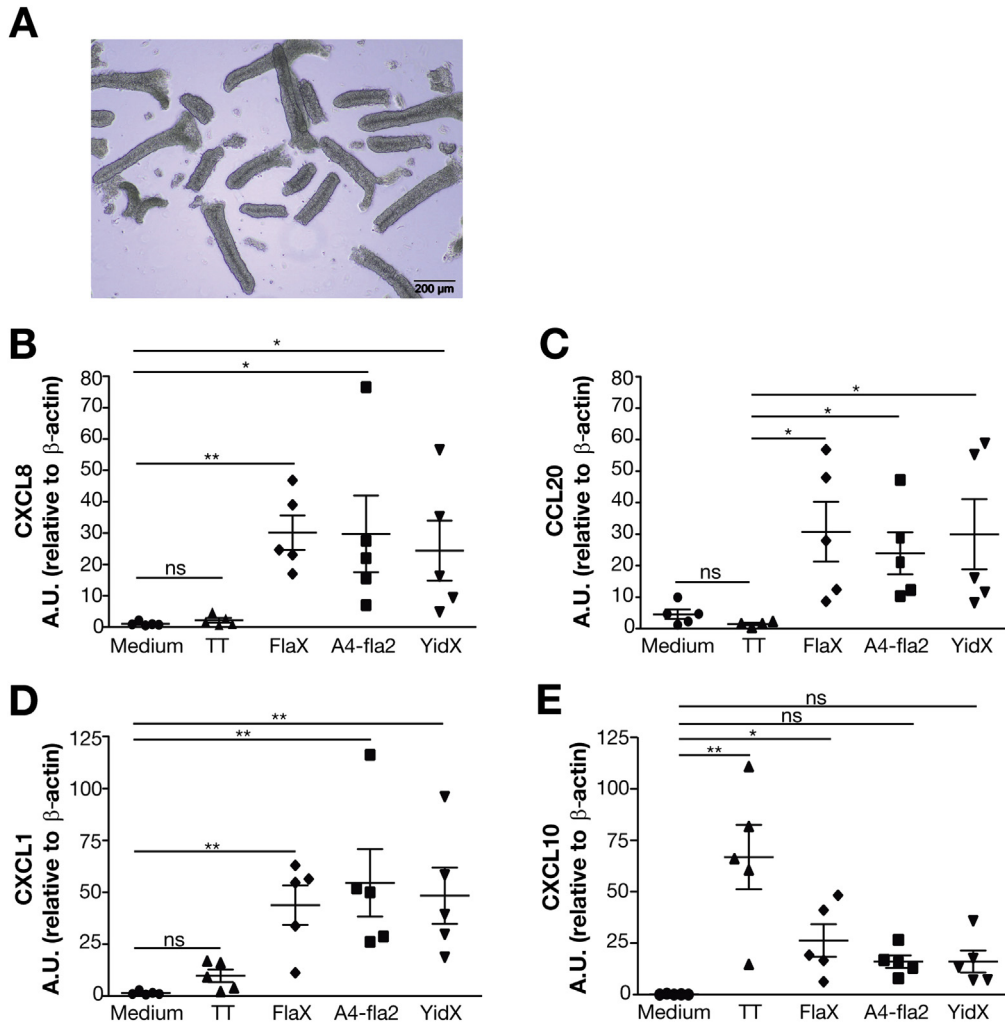


Figure 6. Activated FlaX-, A4-fla2-, and YidX-specific CD4⁺ T cells from CD patients promote intestinal inflammation. (A) Representative picture of whole intestinal crypts from non-IBD surgical specimens after 18 hours of culture. Relative gene messenger RNA expression of (B) CXCL8, (C) CCL20, (D) CXCL1, and (E) CXCL10 in intestinal crypts cultured with supernatants from activated antigen-specific CD4⁺ T cells from CD patients (n = 5). Means \pm SEM. ns > .05, *P \leq .05, **P < .01.

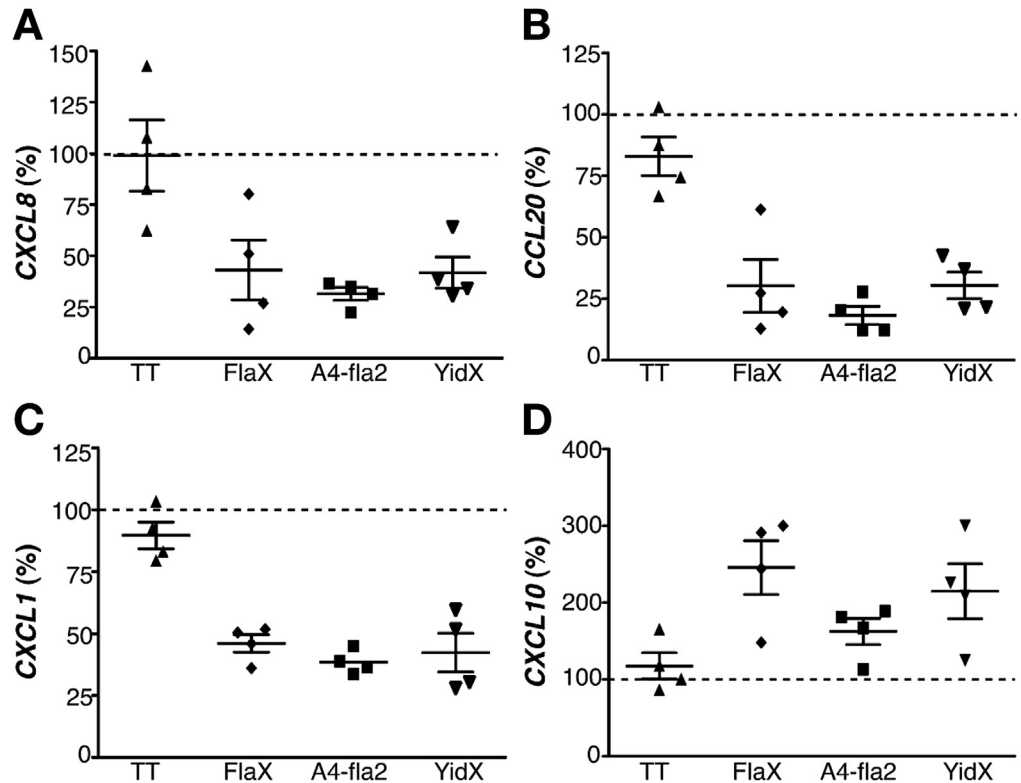
cells are regarded as key players in CD pathogenesis, there still are limited data on the antigen specificity of the T-cell response in CD.^{16,23,25,34,35}

Here, we provide novel evidence of the existence of commensal microbial-specific CD4⁺ T cells in the peripheral blood of both CD patients and healthy individuals. Importantly, proliferation in response to commensal antigen stimulation was enhanced in CD patients compared with healthy controls. The fact that healthy individuals present with circulating commensal-specific CD4⁺ T cells is not completely unexpected. In fact, a T-cell responses to *E coli* proteins have been observed previously in healthy subjects.³⁵ In other immune-mediated diseases, such as multiple sclerosis, T-cell reactivity to self-antigens (myelin) has been reported in healthy controls despite the fact that myelin-specific T cells showed increased activation in multiple sclerosis patients^{36,37} and a different functional inflammatory profile.³⁸ Moreover, it has been described recently that healthy individuals present IgG antibodies to gut microbial antigens in serum, suggesting that microbial-specific CD4⁺ T-cell helper cells can similarly develop in the absence of CD.³⁹

A key finding of our study was that FlaX-, A4-fla2-, and YidX-driven CD4⁺ T-cell responses in CD patients showed a distinct inflammatory phenotype, a response characterized by secretion of high amounts of TNF- α , IFN- γ , IL17A, IL17F, and CCL20. These differences were confirmed by transcriptional analysis of sorted FlaX, A4-fla2, and YidX-specific CD4⁺ T cells. Through this analysis we identified significant differences in the expression of *RORC*, *IL17A*, *IL17F*, *CCR6*, *CCL20*, and *PTGER2* in commensal-specific T cells from CD patients compared with control subjects. In contrast, we observed no difference in Th1-related genes and *TNFA* between these 2 groups.

Importantly, the percentage of Th17 and Th17/Th1 cells among commensal-specific CD4⁺ T cells in CD patients was remarkably higher than in healthy controls. In fact, Th17/Th1 cells have been found in CD at unusually higher rates, together with conventional Th1 and Th17 cells.^{28,40} It also has been postulated that pathogenic Th17 cells can be found within the Th17/Th1 (Th17.1) subset in CD,²⁹ suggesting that FlaX-, A4-fla2-, and YidX-specific T cells play a proinflammatory role in CD. Data in experimental models show that Th17 cells can give rise in vivo to Th1 cells and that this

Figure 7. IL17 neutralization reduces the expression of neutrophil and Th17-recruiting chemokines by intestinal epithelial crypts. Chemokine levels of (A) *CXCL8*, (B) *CCL20*, (C) *CXCL1*, and (D) *CXCL10*, on intestinal crypts after 18 hours of culture with supernatants from activated antigen-specific CD4⁺ T cells from CD patients pre-treated with anti-IL17 monoclonal antibody (n = 4). Chemokine levels after stimulation with untreated supernatants were set as the 100% value for each donor (dashed line), and expression for stimulation with anti-IL17-treated supernatants is shown as the percentage thereof. Means \pm SEM.



ability to produce IFN γ is required to induce colitis.⁴¹ Remarkably, this study also showed that Th17 also supports the de novo generation of pathogenic Th1 cells.

To provide additional specificity to our observations, we included throughout our study a noncommensal bacterial protein (TT) for which all appropriately vaccinated individuals presented memory TT-specific CD4⁺ T cells in peripheral blood. We show that the CD4⁺ T-cell proliferative response to the disease-unrelated protein TT is comparable in CD patients and healthy controls. Moreover, TT elicits a predominantly Th1 response both in CD and in healthy controls. Collectively, this would show that CD4⁺ T cells from CD patients are not generally biased toward a highly proliferative Th17 phenotype, but rather that this response is geared specifically toward defined gut commensal antigens. The marked differences among commensal-specific T cells from healthy controls and CD patients suggest that despite reacting to the same protein antigens, their priming may have taken place in strikingly different environments. This notion is supported further by the fact that TT-specific T cells, which have been primed in the presence of the same vaccine adjuvant (alum) in both healthy controls and CD patients, do not show functional differences among patients and controls. In addition, it has been shown that during gastrointestinal infection with *Toxoplasma gondii*, commensal-specific T cells (CBir1 transgenic T cells) differentiated into Th1 cells, while giving rise to Th17 cells upon chemical disruption of the epithelial barrier in mice. These data thus indicate that microbiota-specific T cells are shaped by signals provided by the inflammatory milieu rather than by antigen specificity.⁴²

Interestingly, a recent genetic study in IBD patients identified a causal association between the HLA-II allele HLR-DRB1*01:03 and CD,⁴³ indicating that the adaptive immune response plays a central role in CD. This study supports our findings and the notion that antigen-specific CD4⁺ T cells could contribute to intestinal inflammation in the context of CD.

It is likely that these circulating commensal-specific T cells in CD patients are recruited to the intestinal mucosa during disease flares. In fact, we show that commensal-specific T cells present an overall higher $\beta 7$ expression profile compared with TT-specific cells in CD patients. High $\beta 7$ (which in peripheral blood is associated primarily with $\alpha 4$) favors binding to the endothelial adhesion molecule mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1 (MAdCAM-1), which is expressed constitutively by high endothelial venules and the inflamed intestinal vascular endothelium. To test the proinflammatory potential of commensal-specific T cells from CD patients in the intestine, we cultured non-IBD primary epithelial crypts with T-cell-derived supernatants. Importantly, we found that the cytokine cocktail produced by commensal-specific T cells, but not by noncommensal-specific T cells (TT), in CD patients elicited a proinflammatory response in intestinal epithelial crypts (higher expression of *CXCL1*, *CXCL8*, and *CCL20*). Thus, this effect may be promoted by the synergy between IL17A and other secreted cytokines such as TNF- α (all highly secreted by commensal-specific CD T cells). This would be in agreement with our observation regarding primary intestinal epithelial cells and other studies involving recombinant IL17 and TNF- α on intestinal

epithelial cell lines.³⁰ Hence, we believe that in CD patients, commensal-specific T cells, which show a mixed Th17/Th1 phenotype, may exacerbate intestinal inflammation by creating a feedback loop that favors the accumulation of Th17 cells (CCL20) and neutrophils (CXCL1 and CXCL8) at the site of inflammation.

An important issue we addressed was whether CD4⁺ T-cell responses to microbial antigens occurred simultaneously with the presence of specific antibodies in serum. We observed that, in most patients, CD4⁺ T-cell responses to FlaX, A4-fla2, or YidX were accompanied by serologic responses to the antigens studied. Although the number of patients may be too low to make any definitive conclusions, our results suggest that detection of specific antibodies to these antigens can act as a reliable surrogate marker for the presence of the cognate T-helper response in CD patients. Remarkably, anti-YidX antibodies in serum independently correlated with ileocolonic disease location and with long-term disease despite the small number of patients analyzed. Previous studies using larger cohorts of CD patients identified correlations between antibodies to other microbial proteins with complicated disease behavior, including small-bowel disease location.^{3,8}

Although our study does not provide data on the microbial-specific response in ulcerative colitis (UC), it has been described previously that YidX-specific serologic responses are more abundant in UC patients, in relation to other microbial components, compared with CD patients.¹⁰ However, antibody responses to FlaX and A4-fla2 arise in only a small percentage (6%) of UC patients compared with CD patients (57% and 59%, respectively).⁸ Because increasing evidence has indicated that Th17 cells may be important contributors to intestinal inflammation in UC,¹⁹ it would be interesting to investigate the antigen specificity of T cells in patients with UC, in particular to YidX.

Overall, our data would point to IL17 as a desirable target in treating CD. Nonetheless, recent clinical data unexpectedly showed the negative effects of such therapy in 2 phase II studies,^{44,45} despite having shown efficacy in other immune-mediated diseases.⁴⁶ The results of these clinical trials highlighted the important role of IL17 in controlling microbial and fungal growth in subjects with ongoing mucosal ulceration because its blockade induced severe infections, including mucocutaneous candidiasis in treated patients. Furthermore, IL17 also is produced by other immune cells in the intestine, such as innate-like lymphocytes, natural killer cells, natural killer-T cells, and T-regulatory cells, which may play an important role in the regulation of intestinal homeostasis.^{47,48} The identification and characterization of commensal-specific CD4⁺ T cells offers the opportunity to specifically target potential pathogenic CD4⁺ T cells without altering other IL17-producing immune cells that may be beneficial to control fungal growth and intestinal homeostasis. Targeting FlaX-, A4-fla2-, and YidX-specific CD4⁺ T cells, as opposed to blocking IL17 alone, may offer a valuable therapeutic option because it may impact other cytokines secreted by these cells, such as TNF- α , which appears to act synergistically on intestinal inflammation in CD.

Supplementary Material

Note: To access the supplementary material accompanying this article, visit the online version of *Gastroenterology* at www.gastrojournal.org, and at <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2016.05.050>.

References

1. Berg DJ, Davidson N, Kuhn R, et al. Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. *J Clin Invest* 1996;98:1010–1020.
2. Cong Y, Brandwein SL, McCabe RP, et al. CD4+ T cells reactive to enteric bacterial antigens in spontaneously colitic C3H/HeJBir mice: increased T helper cell type 1 response and ability to transfer disease. *J Exp Med* 1998;187:855–864.
3. Targan SR, Landers CJ, Yang H, et al. Antibodies to CBir1 flagellin define a unique response that is associated independently with complicated Crohn's disease. *Gastroenterology* 2005;128:2020–2028.
4. Elson CO, Cong Y, McCracken VJ, et al. Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunol Rev* 2005;206:260–276.
5. Main J, McKenzie H, Yeaman GR, et al. Antibody to *Saccharomyces cerevisiae* (bakers' yeast) in Crohn's disease. *BMJ* 1988;297:1105–1106.
6. Landers CJ, Cohavy O, Misra R, et al. Selected loss of tolerance evidenced by Crohn's disease-associated immune responses to auto- and microbial antigens. *Gastroenterology* 2002;123:689–699.
7. Lodes MJ, Cong Y, Elson CO, et al. Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease. *J Clin Invest* 2004;113:1296–1306.
8. Schoepfer AM, Schaffer T, Mueller S, et al. Phenotypic associations of Crohn's disease with antibodies to flagellins A4-Fla2 and Fla-X, ASCA, p-ANCA, PAB, and NOD2 mutations in a Swiss Cohort. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:1358–1367.
9. Duck LW, Walter MR, Novak J, et al. Isolation of flagellated bacteria implicated in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:1191–1201.
10. Chen CS, Sullivan S, Anderson T, et al. Identification of novel serological biomarkers for inflammatory bowel disease using *Escherichia coli* proteome chip. *Mol Cell Proteomics* 2009;8:1765–1776.
11. Ferrante M, Henckaerts L, Joossens M, et al. New serological markers in inflammatory bowel disease are associated with complicated disease behaviour. *Gut* 2007;56:1394–1403.
12. Mow WS, Vasiliauskas EA, Lin YC, et al. Association of antibody responses to microbial antigens and complications of small bowel Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004;126:414–424.
13. Arnott ID, Landers CJ, Nimmo EJ, et al. Sero-reactivity to microbial components in Crohn's disease is associated

- with disease severity and progression, but not NOD2/CARD15 genotype. *Am J Gastroenterol* 2004;99:2376–2384.
14. Lichtenstein GR. Emerging prognostic markers to determine Crohn's disease natural history and improve management strategies: a review of recent literature. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* 2010;6:99–107.
 15. van Schaik FD, Oldenburg B, Hart AR, et al. Serological markers predict inflammatory bowel disease years before the diagnosis. *Gut* 2013;62:683–688.
 16. Shen C, Landers CJ, Derkowski C, et al. Enhanced CBir1-specific innate and adaptive immune responses in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:1641–1651.
 17. Tomita T, Kanai T, Nemoto Y, et al. Colitogenic CD4⁺ effector-memory T cells actively recirculate in chronic colitic mice. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:1630–1640.
 18. Parronchi P, Romagnani P, Annunziato F, et al. Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am J Pathol* 1997;150:823–832.
 19. Fujino S, Andoh A, Bamba S, et al. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 2003;52:65–70.
 20. Kleinschek MA, Boniface K, Sadekova S, et al. Circulating and gut-resident human Th17 cells express CD161 and promote intestinal inflammation. *J Exp Med* 2009;206:525–534.
 21. Veny M, Esteller M, Ricart E, et al. Late Crohn's disease patients present an increase in peripheral Th17 cells and cytokine production compared with early patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2010;31:561–572.
 22. Rovedatti L, Kudo T, Biancheri P, et al. Differential regulation of interleukin 17 and interferon gamma production in inflammatory bowel disease. *Gut* 2009;58:1629–1636.
 23. Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, et al. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1995;102:448–455.
 24. Duchmann R, May E, Heike M, et al. T cell specificity and cross reactivity towards enterobacteria, bacteroides, bifidobacterium, and antigens from resident intestinal flora in humans. *Gut* 1999;44:812–818.
 25. Duchmann R, Marker-Hermann E, Meyer zum Buschenfelde KH. Bacteria-specific T-cell clones are selective in their reactivity towards different enterobacteria or *H. pylori* and increased in inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol* 1996;44:71–79.
 26. Jung P, Sato T, Merlos-Suarez A, et al. Isolation and in vitro expansion of human colonic stem cells. *Nat Med* 2011;17:1225–1227.
 27. Coukos JA, Howard LA, Weinberg JM, et al. ASCA IgG and CBir antibodies are associated with the development of Crohn's disease and fistulae following ileal pouch-anal anastomosis. *Dig Dis Sci* 2012;57:1544–1553.
 28. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* 2007;204:1849–1861.
 29. Ramesh R, Kozhaya L, McKevitt K, et al. Pro-inflammatory human Th17 cells selectively express P-glycoprotein and are refractory to glucocorticoids. *J Exp Med* 2014;211:89–104.
 30. Lee JW, Wang P, Kattah MG, et al. Differential regulation of chemokines by IL-17 in colonic epithelial cells. *J Immunol* 2008;181:6536–6545.
 31. Blaser MJ, Miller RA, Lacher J, et al. Patients with active Crohn's disease have elevated serum antibodies to antigens of seven enteric bacterial pathogens. *Gastroenterology* 1984;87:888–894.
 32. Macpherson A, Khoo UY, Forgacs I, et al. Mucosal antibodies in inflammatory bowel disease are directed against intestinal bacteria. *Gut* 1996;38:365–375.
 33. Sutton CL, Kim J, Yamane A, et al. Identification of a novel bacterial sequence associated with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2000;119:23–31.
 34. Konrad A, Rutten C, Flogerzi B, et al. Immune sensitization to yeast antigens in ASCA-positive patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2004;10:97–105.
 35. Ergin A, Syrbe U, Scheer R, et al. Impaired peripheral Th1 CD4⁺ T cell response to *Escherichia coli* proteins in patients with Crohn's disease and ankylosing spondylitis. *J Clin Immunol* 2011;31:998–1009.
 36. Pette M, Fujita K, Kitze B, et al. Myelin basic protein-specific T lymphocyte lines from MS patients and healthy individuals. *Neurology* 1990;40:1770–1776.
 37. Zhang J, Markovic-Plese S, Lacet B, et al. Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 1994;179:973–984.
 38. Cao Y, Goods BA, Raddassi K, et al. Functional inflammatory profiles distinguish myelin-reactive T cells from patients with multiple sclerosis. *Sci Transl Med* 2015;7:287ra74.
 39. Christmann BS, Abrahamsson TR, Bernstein CN, et al. Human seroreactivity to gut microbiota antigens. *J Allergy Clin Immunol* 2015;136:1378.
 40. Globig AM, Hennecke N, Martin B, et al. Comprehensive intestinal T helper cell profiling reveals specific accumulation of IFN-gamma+IL-17+coproducing CD4⁺ T Cells in active inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2014;20:2321–2329.
 41. Harbour SN, Maynard CL, Zindl CL, et al. Th17 cells give rise to Th1 cells that are required for the pathogenesis of colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112:7061–7066.
 42. Hand TW, Dos Santos LM, Bouladoux N, et al. Acute gastrointestinal infection induces long-lived microbiota-specific T cell responses. *Science* 2012;337:1553–1556.
 43. Goyette P, Boucher G, Mallon D, et al. High-density mapping of the MHC identifies a shared role for HLA-DRB1*01:03 in inflammatory bowel diseases and heterozygous advantage in ulcerative colitis. *Nat Genet* 2015;47:172–179.
 44. Hueber W, Sands BE, Lewitzky S, et al. Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn's disease: unexpected results of a randomized, double-blind placebo-controlled trial. *Gut* 2012;61:1693–1700.
 45. Targan SR, Feagan BG, Vermiere S, Panaccione R, et al. Mo2083 A randomized, double-blind, placebo-controlled

study to evaluate the safety, tolerability, and efficacy of AMG827 in subjects with moderate to severe Crohn's disease. *Gastroenterology* 2012;143:e26.

46. Hueber W, Patel DD, Dryja T, et al. Effects of AIN457, a fully human antibody to interleukin-17A, on psoriasis, rheumatoid arthritis, and uveitis. *Sci Transl Med* 2010; 2:52ra72.
47. Korn T, Bettelli E, Oukka M, et al. IL-17 and Th17 cells. *Annu Rev Immunol* 2009;27:485–517.
48. Hovhannisyán Z, Treatman J, Littman DR, et al. Characterization of interleukin-17-producing regulatory T cells in inflamed intestinal mucosa from patients with inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2011; 140:957–965.

Author names in bold designate shared co-first authorship.

Received August 7, 2015. Accepted May 29, 2016.

Reprint requests

Address requests for reprints to: Azucena Salas, PhD, Department of Gastroenterology, IDIBAPS, Hospital Clínic, CIBERehd, Barcelona, Spain. e-mail: asalas1@clinic.ub.es; fax: +34 933129406.

Acknowledgments

Author contributions: Elisabeth Calderón-Gómez designed and conducted the experiments, acquired and analyzed the data, and wrote the manuscript; Helena Bassolas-Molina conducted the experiments and acquired and analyzed the data; Rut Mora-Buch and Isabella Dotti designed and conducted the experiments; Núria Planell executed the bioinformatics and biostatistics analysis; Míriam Esteller collected samples and provided technical support; Marta Gallego, Ingrid Ordás, and Julian Panés recruited patients and collected samples; Mercè Martí, Carme Garcia-Martin, and Carlos Martínez-Torró designed and conducted experiments and analyzed data; Sharat Singh provided reagents; Daniel Benítez-Ribas designed and supervised the experiments; and Azucena Salas designed the study, supervised experiments, analyzed data, and wrote the manuscript.

Conflicts of interest

This author discloses the following: Sharat Singh was employed by Prometheus Laboratories. The remaining authors disclose no conflicts.

Funding

The research leading to these results received funding from the European Community's Seventh Framework Program (FP7/2009-2013) under grant agreement 229673 (E.C.-G.), the International Organization for the Study of Inflammatory Bowel Disease, Leona and Harry Helmsley Charitable Trust, Ministerio de Economía y Competitividad SAF 2012/33560 (J.P.), and Instituto de Salud Carlos III PIE13/00033 (A.S.). This work was co-financed by the European Union through the European Regional Development Fund, "A way of making Europe." Also supported by the Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (M.E., N.P., and D.B.-R.). Writing assistance was provided by Joe Moore, which was funded by the Leona and Harry Helmsley Charitable Trust.

Supplementary Materials and Methods

Antigen Stimulation of PBMCs

PBMCs were isolated from heparinized peripheral blood of healthy controls or patients with CD by Ficoll (Sigma-Aldrich) gradient centrifugation. Cells were cultured in X-VIVO 15 medium (Bio Whittaker, Lonza, Belgium) supplemented with 2% inactivated AB human serum (Sigma-Aldrich) for 7 days. For T-cell proliferation screening, 1×10^5 PBMCs were cultured with the microbial commensal antigens ASCA-Ag, CBir1, FlaX, A4-fla2, and YidX (Prometheus Laboratories, Inc) at 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 7 days. Human r-IL2 (20 IU/mL; eBioscience) was added on day 3 of culture. On day 6, tritiated thymidine (1 $\mu\text{Ci}/\text{well}$; Amersham) was added to the culture in triplicate. The ^3H thymidine incorporation took place during the last 16 hours of culture. For major histocompatibility complex-II blocking, anti-HLA-DR, -DP, -DQ (BD Pharmingen) was added at 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to the culture. For CFSE (Cell Trace CFSE cell proliferation kit; Life Technologies) staining, freshly isolated PBMCs were incubated with CFSE at 5 mmol/L according to the supplier's instructions. Cells then were plated at 1×10^6 cells/mL and cultured with TT (Sigma-Aldrich) and microbial commensal antigens (Prometheus Laboratories, Inc), all at 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 7 days.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assays of Serum Antimicrobial Antibodies

Serum antibodies to FlaX, A4-fla2, and YidX were measured by enzyme-linked immunosorbent assay in 37 samples (18 healthy individuals and 19 CD patients). Briefly, enzyme-linked immunosorbent assay plates were coated at 4°C overnight with 4 $\mu\text{g}/\text{well}$ of FlaX, A4-fla2, YidX, or with an irrelevant protein for nonspecific background subtraction. Plates were blocked with 3% bovine serum albumin in phosphate-buffered saline for 1.5 hours at room temperature. After washing, serum was added at 1:100 dilution in 0.1% bovine serum albumin-phosphate-buffered saline for 2 hours at room temperature. Afterward, plates were washed and incubated for 1 hour with a 1:50,000 dilution of a horseradish-peroxidase-conjugated goat anti-human γ chain specific antibody (Jackson ImmunoResearch Labs, West Grove, PA). After washing, plates were incubated with tetramethylbenzidine substrate (eBioscience). Absorbance was read at 620 nm on a microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Specific optical density was calculated for each sample and antigen after subtracting its background optical density.

Seroreactivity to each antigen was determined as an optical density value greater than the mean optical density \pm standard deviation in a group of healthy controls.

Flow Cytometry

For intracellular cytokine staining, cells were restimulated with phorbol myristate acetate and ionomycin in the presence of brefeldin A (all from Sigma-Aldrich) at

25 ng/mL, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively, for the final 4 hours of culture. Cells were fixed and permeabilized with FIX and PERM (Caltag, Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Cells were stained with a LIVE/DEAD fixable violet dead cell stain kit (Life Technologies), anti-CD4 (RPA-T4; BD Biosciences), anti-IL17 (clone 64DE17; eBioscience), and anti-IFN- γ (clone 4S.B3; eBioscience) conjugated with different fluorochromes.

To assess the expression of integrin $\beta 7$ on viable CFSE⁻ CD4⁺ cells, the antibody anti-integrin $\beta 7$ (clone FIB504; BD Biosciences) was used.

Stained cells were acquired in a Fluorescence-Activated Cell Sorting Canto II (BD Bioscience) and analyzed with BD Biosciences Fluorescence-Activated Cell Sorting Diva Software v6.1.1.

Soluble Cytokine and Chemokine Analysis

For IL17 detection capture and detection, antibodies were obtained from eBioscience. For IFN- γ an enzyme-linked immunosorbent assay kit (BD OptEIA, Human IFN- γ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Set, BD Biosciences) was used following the manufacturer's instructions. Simultaneous detection of IL17A, IL17F, IL22, CCL20, IFN- γ , and TNF- α in the supernatants of antigen-specific CD4⁺ T cells was performed using the multiplex cytokine assay MILLIPLEX Human Th17 magnetic bead (EMD Millipore Corporation).

For the detection of chemokines in crypt culture supernatants, enzyme-linked immunosorbent assay kits were used. For CXCL1 (Human CXCL1/GRO α DuoSet Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), CXCL10 (Human CXCL10/IP-10 DuoSet Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), and for CXCL8 (Human CXCL8/IL-8 DuoSet ELISA) enzyme-linked immunosorbent assay kits were used, all from R&D Systems. They were used according to the manufacturer's instructions.

Cell Sorting of Antigen-Specific CD4⁺ T Cells and RNA Isolation

CFSE-labeled PBMCs were cultured in the presence of TT, FlaX, A4-fla2, or YidX antigens at 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Recombinant IL2 (R&D systems) (20 IU/mL) was added to the culture on day 7. Cells were harvested at day 14, washed, and stained using a LIVE/DEAD fixable violet dead cell stain kit (Life Technologies) and anti-CD4⁻ (RPA-T4; BD Bioscience). Viable CFSE⁻ CD4⁺ cells were sorted in a Fluorescence-Activated Cell Sorting Aria II and cultured with autologous irradiated PBMCs pulsed with 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of TT, FlaX, A4-fla2, or YidX. IL2 (10 IU/mL) was added on day 5. After 10–12 days of culture, T cells were harvested, washed in PBS, and resuspended in TRIzol (Ambion, Foster City, CA). RNA was isolated using RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the supplier's instructions.

Intestinal Crypt Isolation and Culture

Non-IBD intestinal epithelial crypts were isolated from intestinal tissue as previously described.¹ For short-term

crypt culture, 30 isolated crypts/25 μ L Matrigel (BD Biosciences) were plated and cultured in either complete crypt culture medium: advanced Dulbecco's modified Eagle medium/F12 (Thermo Fisher Scientific), GlutaMax (Thermo Fisher Scientific), 10 mmol/L HEPES (Sigma), N-2 (1 \times) (Thermo Fisher Scientific), B-27 without retinoic acid (1 \times) (Thermo Fisher Scientific), 1 mmol/L N-acetyl-L-cysteine (Sigma), 500 ng/mL RSP01 (Sino Biologicals, Beijing, China), 100 ng/mL human Noggin (Peprotech, Rocky Hill, NJ), 500 nmol/L LY2157299 (Axon MedChem, Groningen, The Netherlands), normocin 100 μ g/mL and 1 mmol/L valproic acid (Sigma-Aldrich), or in medium containing supernatants from activated sorted antigen-specific CD4⁺ T cells (1:1). Antigen-specific T-cell supernatants were obtained from restimulating 1×10^5 cells with anti-CD3 (BD Biosciences) and anti-CD28 (BD Biosciences) at 1 μ g/mL for 5 days.

Neutralization of IL17 was achieved by preincubation of T-cell supernatants for 1 hour with monoclonal anti-IL17A (R&D Systems). After overnight culture at 37°C and 5% CO₂, Matrigel embedded crypts were resuspended in 500 μ L TRIzol (Ambion) and total RNA was isolated using the RNeasy Kit (Qiagen).

Microarray Data Analysis

The derived RNA from sorted antigen-specific CD4⁺ T cells was hybridized to a high-density oligonucleotide Affymetrix Human Genome U219 Array Plate (Affymetrix Santa Clara, CA). Raw data were analyzed using Bioconductor tools (version 2.13²) in R (version 3.1.0³) using the CG (guanine-cytosine) content-adjusted robust multi-array algorithm to normalize and linear models for microarray data for differential expression analysis. Microarray raw data (.cel files) and processed data are accessible through GEO series accession number GSE70469. The transcriptional signature of Th17 or Th17.1 was obtained from GSE49703.

Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction

Total RNA from sorted CD4⁺ T cells or stimulated whole crypts was transcribed to complementary DNA using reverse transcriptase (High Capacity cDNA RT kit, Applied Biosystems, Carlsbad, CA). Polymerase chain reaction was performed in TaqMan Universal Polymerase Chain Reaction Master Mix and probes (Applied Biosystems). Reverse transcription was performed in a 96-well thermocycler (Veriti 96W; Applied Biosystems). TaqMan real-time polymerase chain reaction was used to detect transcripts of *RORC*, *IL17A*, *IL17F*, *CCL20*, *CCR6*, *PTGER2*, *TBX21*, *IFNG*, *TNFA*, *CXCL1*, *CXCL8*, and *CXCL10*. Fluorescence was detected in an ABI PRISM 7500 Fast RT- Polymerase Chain Reaction System (Applied Biosystems). Primers and probes for each sequence were obtained as inventoried TaqMan gene-expression assays (Applied Biosystems). B-actin was used as a reference gene. Fluorescence was detected using an ABI PRISM

7500 Fast RT-Polymerase Chain Reaction System (Applied Biosystems).

Multiplex Polymerase Chain Reaction Amplification of β Chain Complementarity Determining Region 3

Total messenger RNA was extracted with an RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) and reverse-transcribed using oligodeoxythymidine primer. As a control of mRNA integrity, the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene was amplified from all samples. Multiplex polymerase chain reaction was adapted from Chitnis and Pahwa.⁴ Amplification mixtures, including 24 Vb gene families, were performed in 15- μ L reactions containing 1.2 mL of the forward Vb primer MIX and 0.75 mL of the reverse Cb primer at 5 mmol/L, 10 \times each deoxynucleoside triphosphate (2.5 mmol/L), 10 \times polymerase chain reaction buffer with 2 mmol/L MgCl₂, 40 ng complementary DNA, and 0.6 U of Taq polymerase (Biotools, Madrid, Spain). Polymerase chain reaction amplification was 3 minutes at 97°C, 35 cycles of 95°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds, and 72°C for 1 minute, and 10 minutes at 72°C. Primer mixes were as follows: MIX-A (TCR β -variable 9/30/13), MIX-B (TCR β -variable 20/29/12), MIX-C (TCR β -variable 28/6-5), MIX-D (TCR β -variable 5/25), MIX-G (TCR β -variable 3/14), and MIX-H (TCR β -variable 5-6/10), 2.5 mmol/L of each primer; MIX-E (TCR β -variable 7/15), MIX-F (TCR β -variable 4/11), MIX-I (TCR β -variable 6-2/24), and MIX-J (TCR β -variable 18/27), for which primers were at 1.7 and 3.3 mmol/L, respectively; and MIX-K (TCR β -variable 23) and MIX-L (TCR β -variable 2) at 2.5 mmol/L. For each multiplex polymerase chain reaction, a negative control was run in parallel to exclude possible contaminations.

Complementarity Determining Region 3 Length Analysis by Spectratyping

Run-off extension was performed using multiplex polymerase chain reaction products as a template and the reverse primer Cb 5' labeled with 6-carboxyfluorescein 6-FAM, consisting of 3 \times 2 minute cycles at 95°C, 2 minutes at 55°C, and 20 minutes at 72°C. Fluorescent polymerase chain reaction products were run with a size marker GS400HD (Applied Biosystems) and were length-separated by the ABI 3130XL analyzer (Applied Biosystems). Data were analyzed with the software PeakScanner (Applied Biosystems). Peak areas were quantified and normalized with the size marker to determine the total normalized area corresponding to each TCR β -variable family. To assess the presence of monoclonal T-cell expansions, the relative fluorescence intensity was calculated as follows: relative fluorescence intensity (%) = (peak area/total Vb area).^{5,6} A complementarity determining region 3 peak with a relative fluorescence intensity greater than 50% was considered a monoclonal expansion.

References

1. Gentelman RC, Carey VJ, Bates DM, et al. Bioconductor: open software development for computational

- biology and bioinformatics. *Genome Biol* 2004;5:5:R80.
2. R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria 2014.
 3. Jung P, Sato T, Merlos-Suarez A, et al. Isolation and in vitro expansion of human colonic stem cells. *Nat Med* 2011;17:1225–1227.
 4. Chitnis V, Pahwa S. Evaluation of the T-cell receptor repertoire. In: Rose NR, Hamilton RG, Detrick B, eds. Evaluation of the T-cell receptor repertoire. *Manuals of Clinical Laboratory Immunology*. Washington DC, USA: ASM Press, 2002:244–255.
 5. Fozza C, Contini S, Galleu A, et al. Patients with myelodysplastic syndromes display several T-cell expansions, which are mostly polyclonal in the CD4(+) subset and oligoclonal in the CD8(+) subset. *Exp Hematol* 2009;37:947–955.
 6. Kou ZC, Pühr JS, Rojas M, et al. T-cell receptor Vbeta repertoire CDR3 length diversity differs within CD45RA and CD45RO T-cell subsets in healthy and human immunodeficiency virus-infected children. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000;7:953–959.