

## Trabajo Fin de Máster

Estudio de los receptores NOD1 y NOD2 y su  
implicación en la fisiología intestinal: Alteraciones de su  
expresión mediada por TLRs y en patologías inflamatorias intestinales crónicas

Elena Layunta Hernández

Ana Isabel Alcalde Herrero  
José Emilio Mesonero Gutiérrez

Facultad de Veterinaria de Zaragoza  
2013

## ÍNDICE

RESUMEN .....	4
I. INTRODUCCIÓN .....	6
I.1. EL INTESTINO DELGADO .....	6
1.1. Anatomía y fisiología	
1.2. Barrera intestinal	
I.2. LOS RECEPTORES DE RECONOCIMIENTO DE PATRONES (PRR) ...	8
2.1. Receptores tipo Toll (TLR)	
2.2. Receptores tipo NOD (NLR)	
2.2.1. NOD1	
2.2.2. NOD2	
I.3. LAS ENFERMEDADES INFLAMATORIAS INTESTINALES .....	13
3.1. Sintomatología	
I.4. LA SEROTONINA .....	14
4.1. Síntesis y metabolismo	
4.2. El transportador de serotonina (SERT)	
4.3. Sistema serotoninérgico intestinal	
4.4. Implicación del sistema serotoninérgico en la actividad intestinal	
II. OBJETIVOS .....	18
III. MATERIAL Y MÉTODOS .....	19
III.1. Línea celular Caco-2 .....	19
III.2. Extracción de muestras intestinales de ratones .....	21
III.3. Cuantificación de proteínas .....	22
III.4. Estudios de transporte de 5-HT .....	23
III.5. Análisis de expresión proteica: western blot .....	25
III.6. Extracción de ARN, transcripción reversa, PCR y PCR en tiempo real ...	27

IV. RESULTADOS .....	30
IV.1. Análisis preliminar de la expresión molecular Del ARNm y de la proteína de los receptores NOD1 y NOD2 en la línea celular epitelial intestinal humana Caco-2 .....	30
IV.2. Estudio del efecto de la activación de NOD1 o NOD2 sobre la actividad de SERT en células Caco-2 .....	32
2.1. Tratamiento con el agonista de NOD1	
2.2. Tratamiento con el agonista de NOD2	
IV.3. Efecto de la activación del TLR2 sobre la expresión génica de NOD1 y NOD2 en células Caco-2 .....	34
3.1. Expresión de NOD1	
3.2. Expresión de NOD2	
IV.4. Análisis de la expresión de NOD1 y NOD2 en intestino delgado y colon de ratones TLR2 <sup>-/-</sup> , TLR4 <sup>-/-</sup> o TLR2,4 <sup>-/-</sup> .....	36
4.1. Análisis de la expresión de NOD1	
4.2. Análisis de la expresión de NOD2	
V. DISCUSIÓN .....	41
V.1. Efecto de la activación de NOD1 y NOD2 sobre la actividad de SERT ...	41
V.2. Efecto de los TLRs sobre la expresión de NOD1 y NOD2 .....	42
2.1. Análisis de la expresión de NOD1 en intestino delgado y colon de ratones TLR2 <sup>-/-</sup> , TLR4 <sup>-/-</sup> o TLR2,4 <sup>-/-</sup>	
2.2. Análisis de la expresión de NOD2 en intestino delgado y colon de ratones TLR2 <sup>-/-</sup> , TLR4 <sup>-/-</sup> o TLR2,4 <sup>-/-</sup>	
VI. CONCLUSIONES .....	46
VII. REFERENCIAS BIBLIGRÁFICAS .....	47

## RESUMEN

El sistema inmunológico, constituido por la inmunidad adquirida y la innata, tiene una gran importancia en el tracto gastrointestinal, donde actúa de forma coordinada para diferenciar entre agentes propios o necesarios y microorganismos nocivos. El sistema inmune innato es una primera línea de defensa, donde una serie de receptores (TLRs y NODs) reconocen patrones moleculares asociados a microorganismos patógenos, que facilitan el inicio de una respuesta defensiva. En patologías inflamatorias intestinales crónicas, como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, se ha observado la existencia de modificaciones en la expresión de los receptores NOD que alteran el sistema inmune innato. El sistema serotoninérgico intestinal, en el que la serotonina (5-HT) actúa como un neuromodulador que comunica los sistemas nervioso e inmune, y que regula una gran variedad de funciones gastrointestinales, también se ha visto alterado en este tipo de patologías. Así, la disponibilidad extracelular de 5-HT se encuentra aumentada y podría actuar como sustancia proinflamatoria. El transportador de serotonina (SERT) es el responsable de regular la disponibilidad de 5-HT.

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar la relación existente entre el sistema serotoninérgico y los receptores NOD, así como la modulación de la expresión de los NODs mediada por los TLRs, ya que todos estos sistemas se encuentran alterados en situaciones inflamatorias, pero se desconoce si existe conexión entre ambos.

Utilizando la línea celular Caco-2 para realizar estudios de transporte de 5-HT, hemos observado que la activación de NOD1 y NOD2 induce una alteración en la funcionalidad de SERT, y por tanto del sistema serotoninérgico intestinal. Así, la activación de NOD2 inhibe SERT, mientras que NOD1 parece tener un efecto dual inhibiendo SERT a corto plazo, y activándolo a largo plazo. En lo que se refiere a la interacción entre TLRs y NODs, se ha observado que la activación de TLR2 aumenta la expresión de NOD1 y NOD2. Este hecho ha sido corroborado con el estudio de la expresión de los receptores NOD en ratones transgénicos deficientes para diferentes TLR. Así, en ratones TLR2<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup> y TLR2,4<sup>-/-</sup> se ha observado como la expresión de ARNm y proteica de NOD1 y NOD2 se encuentra alterada, tanto en intestino delgado, como en colon, aunque no siempre en el mismo sentido. En consecuencia, este trabajo muestra que existe clara interrelación entre SERT y los receptores NOD, que a su vez también interaccionan con los receptores TLR, constituyendo entre todos ellos un complejo sistema que modula la respuesta inflamatoria, en el que muchas otras moléculas están también implicadas.

## ABSTRACT

The immune system, consisting of innate and acquired immunity, has a great importance in the gastrointestinal tract, in which it acts in a coordinated way to differentiate between necessary or own agents, and harmful microorganisms. The innate immune system is a first defense barrier, which includes some receptors (TLR and NOD) that recognize molecular patterns associated with pathogen microorganisms to assist a defense response. In chronic inflammatory bowel diseases, such as Crohn's disease and ulcerative colitis, changes for NOD receptors and alteration of the innate immune system have been demonstrated. Serotonergic intestinal system, which communicates nervous and immune systems by 5-HT and regulates a wide variety of gastrointestinal functions, has also been shown to be altered in these pathologies. In fact, 5-HT extracellular availability has been shown to be increased and 5-HT may act as a proinflammatory factor. Serotonin transporter (SERT) regulates 5-HT availability. The aim of this work has been to analyze the relationship between serotonergic system and NOD receptors, and the regulation of the expression of NODs mediated by TLRs, since these systems are modified in inflammatory conditions, but it is unknown whether there is a link between both.

Caco-2 cell line has been used to analyze the 5-HT transport after activation of NOD1 and NOD2 receptors. This activation causes an alteration in SERT function and therefore, in the intestinal serotonergic system. Thus, NOD2 activation inhibits SERT while NOD1 seems to have a dual effect; thus NOD1 inhibits SERT in a short term activation and activates SERT in a long term activation. In relation to TLRs-NODs interaction, the results have also shown that TLR2 increases NOD1 and NOD2 expression, suggesting the existence of an interrelationship between these receptors involved in innate immunity. This fact has been confirmed by the study of NOD receptors expression in deficient transgenic mice for different TLRs. Thus, in TLR2<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup> y TLR2,4<sup>-/-</sup> mice, mRNA and protein expression of NOD2 and NOD1 resulted altered, in both small intestine and colon, although not always in the same direction. In consequence, this research work shows that there is a clear relationship between SERT and NOD receptors, and that NODs also interact with TLR receptors, thus establishing a complex system that modulates the inflammatory response, in which many other molecules may also be involved.

# I. INTRODUCCIÓN

## I.1 EL INTESTINO DELGADO

### 1.1. Anatomía y fisiología

El tracto gastrointestinal es un tubo continuo que se extiende desde la boca hasta el ano, en el que los principales órganos son la boca, gran parte de la faringe, el esófago, el estómago, el intestino delgado y el intestino grueso. Como órganos accesorios del tracto gastrointestinal nos encontramos con los dientes, la lengua, las glándulas salivales, el hígado, la vesícula biliar y el páncreas [1].

El intestino delgado es una estructura tubular, que se continúa en su extremo proximal con el estómago y en su extremo distal con el colon, y que se divide en tres regiones: el duodeno, el yeyuno, y el íleon [2].

Histológicamente existe una estructura común para todo el tracto gastrointestinal, compuesta por cuatro capas concéntricas, que desde el interior de la luz del tubo hacia el exterior se describen de la siguiente manera [3]:

- **Mucosa:** se encuentra en contacto directo con la luz, y presenta pliegues circulares, vellosidades y microvellosidades. Estos pliegues incrementan enormemente la superficie de revestimiento, optimizando el proceso de absorción de nutrientes. La capa mucosa está formada, a su vez, por tres capas concéntricas: el epitelio, la lámina propia y la *muscularis mucosae*. La capa epitelial está constituida por un epitelio cilíndrico simple con varios tipos de células: los enterocitos que son las células absortivas (digieren y absorben nutrientes), las células enteroendocrinas, las células de Paneth y las caliciformes. La lámina propia, formada por tejido conectivo, contiene glándulas, vasos sanguíneos y una gran variedad celular con función defensiva y de comunicación. Por último, se encuentra una fina capa de células musculares lisas, la *muscularis mucosae*, que separa la mucosa de la submucosa.
- **Submucosa:** capa gruesa de tejido conectivo que sostiene físicamente a la mucosa. Presenta glándulas de secreción, vasos sanguíneos, y células del sistema inmunitario.
- **Muscular:** formada por dos capas de músculo liso: la externa, más gruesa, con fibras longitudinales y la interna, más fina, de fibras circulares. Es la encargada de la ejecución de las ondas peristálticas con diferentes patrones de movimiento para el mezclado y avance del contenido del tracto.

- **Serosa:** es la capa más externa. Está formada por una capa de células epiteliales planas (mesotelio), y una capa de tejido conectivo elástico. Excepto en la mayor parte del duodeno, la serosa cubre por completo al intestino delgado.

Esta gran complejidad tisular le permiten al intestino desarrollar funciones tales como: la actividad digestiva, la actividad motora, la absorción de nutrientes, la secreción de agua y electrolitos y la actividad inmune, todas ellas perfectamente coordinadas gracias a la interconexión del sistema nervioso, el sistema inmunitario y el sistema endocrino propios del intestino [4].

## **1.2. Barrera Intestinal**

La pared intestinal constituye una barrera anatómica e inmunológica fundamental entre la luz y el compartimento interno intestinal ya que se encuentra en continuo contacto con los contenidos de la luz intestinal que puede incluir entre otros, agentes externos, tanto beneficiosos como patógenos. Por ello, la principal función de la barrera intestinal es permitir un eficiente transporte de nutrientes a través del epitelio, mientras se excluye el paso de moléculas y agentes potencialmente nocivos [5].

Para garantizar la integridad de esta barrera intestinal, el organismo presenta una serie de mecanismos de defensa que se pueden clasificar en mecanismos no inmunológicos y mecanismos inmunológicos.

Los mecanismos no inmunológicos están formados principalmente por células epiteliales que forman parte de la estructura de la mucosa que recubre todo el tubo digestivo, con las uniones estrechas que las mantienen unidas y sellan los espacios intercelulares. Entre estas células epiteliales se encuentran los enterocitos, que son células polarizadas, con un borde basal y un borde apical en cepillo orientado a la luz intestinal. Además, presenta otros componentes como el glucocáliz, que crea una red de mucopolisacárido y glicoproteína, la cual retiene el moco producido por las células caliciformes y protege al epitelio. Las células de Paneth también forman parte del epitelio, y producen y secretan defensinas para controlar la población intestinal de microorganismos.

El intestino, en su cara interna, hacia la luz, está en continuo contacto con una abundante y diversa población de microorganismos, denominada microbiota, con la cual

interactúa gracias a una actividad inmunológica muy desarrollada. Los mecanismos inmunológicos trabajan de forma coordinada entre sí y permiten diferenciar entre agentes propios beneficiosos o necesarios, y microorganismos nocivos externos. Podemos distinguir dos grandes mecanismos defensivos en el intestino; la inmunidad innata y la inmunidad adquirida.

- **Inmunidad innata:** forma la primera línea de defensa frente a agentes nocivos. Produce una respuesta rápida y está mediada por la actividad epitelial y por la de los neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y células fagocíticas que por un lado fagocitan y destruyen patógenos, y por otro, liberan mediadores inflamatorios y citocinas como  $\text{TNF}\alpha$  e  $\text{IL-1}\beta$ . Todo ello inicia la activación de la respuesta inmune adquirida y en consecuencia la inflamación.
- **Inmunidad adquirida:** es específica contra el antígeno y genera memoria inmunológica, produciendo una defensa duradera en el tiempo. Su respuesta se fundamenta en la acción de los linfocitos B y T. Los linfocitos B son células productoras de inmunoglobulinas que neutralizan a los antígenos, a nivel sistémico IgG e IgM, y a nivel intestinal IgA [6].

Cabe señalar la gran importancia de la inmunidad innata en el intestino, ya que permite establecer una correcta relación con las bacterias comensales del mismo. Además, ante una situación patológica, constituye la primera línea de defensa activa, que junto con la inmunidad adquirida, puede finalizar en un proceso inflamatorio. Para realizar esta función, la mucosa intestinal cuenta con una serie de receptores llamados receptores de reconocimiento de patrones (Pattern Recognition Receptors, PRRs), mediante los cuales puede discernir los agentes nocivos de los que no lo son. Existen básicamente dos tipos de PRRs, los receptores tipo Toll (Toll-like receptors, TLRs) y los tipo NOD (Nucleotide-binding Oligomerization Domain receptors, NLR). Estos receptores reconocen fragmentos de los microorganismos patógenos llamados patrones moleculares asociados a patógenos (Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMPs) [7].

## **1.2. LOS RECEPTORES DE RECONOCIMIENTO DE PATRONES (PRR)**

El fundamento de la respuesta innata es el reconocimiento inespecífico de patógenos, a la vez que mantiene la tolerancia de los “elementos propios”. Por este motivo, la inmunidad innata debe ser capaz de reconocer un gran número de patógenos mediante un número restringido de receptores [7].



Los receptores PRRs son capaces de reconocer unos fragmentos de microorganismos patógenos que no se encuentran en las células eucariotas y que están sometidos a pocas mutaciones, ya que son esenciales para la vida de los mismos, los PAMPs. Estos PAMPs incluyen componentes de la pared bacteriana, como el lipopolisacárido (LPS), los peptidoglicanos o los ácidos teicoicos, así como otros componentes de hongos, levaduras y protozoos.

Tal como anteriormente se ha indicado, existen dos grandes grupos de PRRs: los NLRs y los TLRs. Los NLRs son receptores citosólicos que participan en la regulación del proceso inflamatorio al percibir patógenos intracelulares. Los TLRs en su mayoría son receptores transmembrana, muy conservados filogenéticamente, esenciales para la inmunidad innata y para la activación de la inmunidad adquirida [8].

## **2.1. Receptores tipo Toll (TLR)**

La familia de los TLRs presenta una estructura glicoproteica transmembranal tipo I, que en base a su considerable homología en la región citoplasmática pertenecen a la superfamilia de los receptores de interleucina 1 (IL-1R). Presentan dos regiones, una extracelular con repeticiones ricas en leucina (LRR), y un dominio citoplasmático, denominado dominio TIR [9].

En la mayoría de los mamíferos se han identificado entre 10 y 15 TLRs [10]. En la especie humana, hasta la actualidad, se han reconocido 11 subtipos, que han sido subdivididos en cinco subfamilias de acuerdo a su localización en el cromosoma, estructura genómica y secuencia de aminoácidos: TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 y TLR9 [11].

Los TLRs también han sido agrupados para su estudio en dos categorías: la que reconoce PAMPs de tipo bacteriano (TLR1, 2, 4, 5 y 6), localizados principalmente en la superficie celular, y la que reconoce virus (TLR3, 7, 8 y 9) que requiere la internalización de los PAMPs a compartimentos endosomales [12].

TLR2 tiene como función principal el reconocimiento de diferentes productos bacterianos, como por ejemplo lipoproteínas de bacterias Gram negativas, peptidoglicano y ácidos lipoteicoico de bacterias Gram positivas [13-15]. El reconocimiento de una amplia gama de productos microbianos es debido a la formación de heterodímeros en la membrana plasmática con varias proteínas que son o bien estructuralmente relacionadas con TLR2, como TLR1 y TLR6, o no relacionadas, como la dectina-1 [13].

El primer TLR descrito con capacidad de reconocer componentes estructurales de los virus fue TLR3 [16]. Su localización es intracelular, exactamente en la membrana de los endosomas. TLR3 reconoce el ARN viral de doble cadena (ARNds) y promueve la activación de dos factores de transcripción, el NF- $\kappa$ B y el factor 3 regulador que, a su vez, promueven la producción de citocinas, quimiocinas, y otras sustancias de defensa [17].

TLR4 fue el primer miembro identificado en mamíferos de la familia de receptores tipo Toll y también el mejor caracterizado. Se encuentra anclado en la membrana plasmática celular y es capaz de reconocer el lipopolisacárido bacteriano (LPS). El LPS es un componente fundamental de la membrana celular externa de las bacterias Gram negativas que se une al TLR4 en su porción externa, induciendo al dominio TIR a unirse y activar la proteína adaptadora MyD88, activando entonces toda la cascada intracelular [18].

TLR5 se expresa en la membrana plasmática de varios tipos celulares, como monocitos, células dendríticas, epiteliales y mastocitos [19]. En el caso de las células epiteliales intestinales, TLR5 se expresa en la membrana basolateral, pese a que las bacterias son expuestas principalmente por el borde apical. TLR5 es activado fundamentalmente por la flagelina bacteriana, que es una proteína que forman los protofilamentos que constituyen el flagelo bacteriano. Una vez activado, TLR5 desencadena a través de la proteína adaptadora citosólica MyD88 una cascada intracelular que conducirá a la secreción de defensinas, citocinas y quimiocinas dando lugar a una respuesta inflamatoria [20].

La subfamilia de TLR9 está integrada por TLR7, TLR8 y TLR9. De ellos, TLR7 reconoce compuestos sintéticos considerados inmunomoduladores, como los derivados de la imidazoquinolina, además de loxorribina y bropirimina, que tienen capacidad antiviral debido a que inducen la producción de citocinas proinflamatorias, en especial INF- $\gamma$ , aunque su principal función es reconocer ARN viral de cadena sencilla (ARNs). [21]. TLR8 también reconoce ARNs antivirales. Por último, TLR9 se localiza en el retículo endoplasmático unido a la chaperona Unc93B1 en células en reposo [22], y reconoce secuencias de dinucleótidos CpG no metilados, características de microorganismos y que las diferencia de secuencias de ADN de mamíferos. En humanos, TLR9 es expresado por células epiteliales, células dendríticas plasmocitoides y células B, lo que se correlaciona con la capacidad de estas células de responder a la presencia de oligonucleótidos [23], mientras que en ratones, TLR9 se localiza en células dendríticas mieloides, macrófagos y células B [24].

## **2.2. Receptores tipo NOD (NLR)**

Además de la familia de los TLRs, los NLRs también forman parte de los PRRs, siendo una parte fundamental del sistema inmune innato.

Los NLRs se localizan en el citoplasma, y se han descrito 22 tipos en humanos y alrededor de 34 tipos en ratones. Se expresan en gran variedad de células, entre ellas, las células epiteliales intestinales [25].

Presentan una estructura con un dominio carboxilo-terminal LRR que es el encargado de reconocer los PAMPS, un dominio central NACHT fundamental en la activación del NLR, y un dominio amino-terminal donde se produce una interacción proteica que comienza la cascada inflamatoria. Basándose en su estructura, los NLR pueden ser clasificados según su dominio amino-terminal: NLRs que presentan reclutamiento de caspasas (tipo CARDS y NLRCs), aquellos que poseen un dominio PYRIN (tipo NLRPs) y otras proteínas NLR [25] .

A excepción de NOD1 y NOD2, que están involucrados en la activación de genes que expresan sustancias proinflamatorias, la mayoría de NLR participan en la activación de la caspasa-1, y son los denominados inflamasomas [26, 27]

Tanto NOD1 como NOD2 reconocen a sus respectivos ligandos de activación en el extremo carboxilo-terminal. Una vez que lo reconocen, se produce a través del dominio NACHT un cambio conformacional, de manera que, a través del dominio amino-terminal, donde se encuentra el dominio CARD, comienza una cascada de señalización uniéndose al dominio CARD de RIP2 que dará lugar a la activación del factor NF- $\kappa$ B, produciendo finalmente la activación de genes de expresión de citocinas proinflamatorias [28].

La manera en la que los ligandos de los receptores NOD penetran en el interior celular es desconocida. Algunos estudios indican que éstos pueden introducirse en la célula por endocitosis mediante una vía dependiente del pH y además, que estos fragmentos pueden externalizarse al citosol desde los endosomas a través del transportador SLC15A4 [29, 30].

### **2.2.1. NOD1**

NOD1 detecta m-DAP, un aminoácido característico de la mayoría de bacterias Gram negativas y de algunas Gram positivas, como *Listeria monocytogenes* y *Bacillus spp.*[31].

Este receptor, al igual que NOD2, actúa a través de la vía de NF- $\kappa$ B, pero además, recientes estudios sugieren que NOD1 también está implicado en la activación de la vía IFN tipo I, la cual juega un papel vital en la eliminación de patógenos [32].

Otros estudios sugieren que ratones deficientes en el receptor NOD1 parecen ser más susceptibles a infecciones que los ratones deficientes en el receptor NOD2 y además, que NOD1 puede ser activado de una manera independiente a la del peptidoglicano [33].

A pesar de la homología proteica y funcional entre NOD1 y NOD2, la variante genética de NOD1 parece no tener tanta implicación en las patologías intestinales crónicas, como NOD2. Se ha descrito la correlación de un polimorfismo de inserción-delección en el intrón 9 de NOD1, con una mayor susceptibilidad a padecer enfermedades inflamatorias intestinales crónicas (Inflammatory Bowel Diseases, IBD). Esta mutación parece producir un ARNm diferente que codifica una isoforma proteica de NOD1 con una deficiente unión del extremo carboxilo-terminal al ligando de activación [34].

### **2.2.2. NOD2**

NOD2 pertenece a la familia de los NLRCs, ya que presenta dos dominios CARD en el extremo amino-terminal. Este receptor está altamente expresado en células dendríticas, macrófagos, células epiteliales del intestino, boca y pulmones y, sobre todo, en las células de Paneth [35].

NOD2 es capaz de reconocer el muramil dipeptido (MDP), el cual es un componente fundamental de la pared de bacterias, tanto Gram positivas como Gram negativas, pudiendo reconocer una gran variedad de estos microorganismos. Tras la detección del MDP, NOD2 presenta un cambio conformacional que genera una señal en cascada que acaba por activar RIP2. Tras la activación, RIP2 activa el factor NF- $\kappa$ B que promueve la activación de genes que expresan citocinas pro-inflamatorias [36].

Está claramente demostrado el importante papel que juega NOD2 tanto en la defensa intestinal frente a patógenos bacterianos en el intestino, como en el mantenimiento de la homeostasis intestinal. La presencia de NOD2 en las células de

Paneth es fundamental para el establecer un equilibrio bacteriano en el intestino, ya que la inducción de este receptor con MDP produce la secreción de compuestos antibacterianos [37].

Por otro lado, NOD2 es fundamental en la regulación de la carga bacteriana intestinal, sobre todo en la parte del íleon terminal, debido probablemente, a que es en esta parte donde hay mayor cantidad de células de Paneth. Además, no solo regula la carga bacteriana no-patógena, sino que también es capaz de reducir la carga patógena bacteriana. Por otro lado, recientes estudios han demostrado que esta regulación no es unidireccional, sino que también la flora bacteriana es capaz de regular la expresión del NOD2 y del RIP2, ya que ratones libres de gérmenes presentan una menor expresión de ambos [37].

En otros estudios, se muestra que NOD2 parece estar asociado con la enfermedad de Crohn (EC). Tanto los factores genéticos, como los ambientales pueden desencadenar un desequilibrio en la homeostasis bacteriana intestinal, dando lugar a la EC [38]. Existen tres tipos de polimorfismos de NOD2 que han sido identificados como factores de riesgo para desencadenar la EC: una mutación por desplazamiento en la pauta de lectura en la posición 1007 (1007fs), una mutación sustitutiva de arginina por glicina en la posición 908 (G908R), y una mutación sustitutiva de arginina por triptófano en la posición 702 (R702W) [39]. Estas tres mutaciones en NOD2 constituyen el 80% de las mutaciones asociadas a la EC [40].

Aunque no está claro cómo estas mutaciones están implicadas en la patogénesis de la EC, parece ser que las mutaciones de NOD2 disminuyen la función de estos receptores, provocando una deficiente interacción entre éstos y la flora bacteriana, lo cual puede aumentar la susceptibilidad a una inflamación intestinal anómala, que asociada a otros factores genéticos y ambientales pueden desencadenar una EC activa [41].

### **I.3. LAS ENFERMEDADES INFLAMATORIAS INTESTINALES (IBD)**

La inflamación intestinal es una de las causas más frecuentes de patología digestiva. Bajo el nombre de enfermedad inflamatoria intestinal se agrupan principalmente dos enfermedades inflamatorias crónicas y recidivantes, las cuales se clasifican fenotípicamente en colitis ulcerosa (CU) y enfermedad de Crohn (EC). Aunque la etiología de la enfermedad sigue siendo desconocida, numerosos estudios han indicado que una disfunción en el reconocimiento de la microbiota por parte del

sistema inmune de la mucosa intestinal juega un papel muy importante en su patogénesis [42] .

### **3.1. Sintomatología**

Aunque tanto la EC como la CU pertenecen al grupo de enfermedades inflamatorias intestinales crónicas, existen diferencias fenotípicas entre ellas.

La EC puede afectar a cualquier zona del tracto digestivo, desde la boca hasta el ano, aunque las áreas que presentan la enfermedad con mayor frecuencia son el íleon terminal y el ciego, mientras que la CU afecta principalmente al recto, extendiéndose de forma proximal afectando al colon. Con frecuencia la EC no afecta al recto, aspecto diferenciador con la CU, en la que es característica la inflamación de la mucosa del recto. La inflamación que se produce en la EC es en segmentos y asimétrica, identificándose áreas intestinales preservadas de la enfermedad entre los segmentos afectados; mientras que en la CU la alteración es continua y simétrica.

Histológicamente, en la EC se produce una afectación transmural, dañando a todo el espesor de la pared intestinal y puede dar lugar a complicaciones como la aparición de fístulas, abscesos y estenosis; además se caracteriza por el hallazgo en el estudio microscópico de granulomas no caseificantes, además de lesiones discontinuas, fibrosis y agregados linfoides. En la CU no son habituales las complicaciones presentes en la EC, ya que el proceso inflamatorio se limita a la mucosa, donde las lesiones son continuas y aparece una clara distorsión en la arquitectura y atrofia de las criptas, además de observarse una disminución de moco.

## **I.4. LA SEROTONINA**

La serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) es una amina biógena que actúa como neuromodulador y como neurotransmisor. Esta sustancia participa en la actividad del sistema nervioso central, concretamente en la relacionada con la conducta (humor, ansiedad, y sueño) y también con el vómito y el apetito. La 5-HT también contribuye a modular la actividad intestinal. La 5-HT está presente en numerosos seres vivos, como los hongos, los vegetales y los animales vertebrados. En los mamíferos, se localiza en un 95% en el sistema enterocromafín del tracto gastrointestinal, y el resto en plaquetas y en neuronas del sistema nervioso central y el sistema nervioso entérico [43]. En relación

al tracto intestinal, se ha demostrado que la alteración de la actividad serotoninérgica contribuye al inicio y mantenimiento de patologías inflamatorias intestinales crónicas, tales como la CU y la EC, anteriormente descritas, [44], por lo que parece clara su interrelación con el sistema inmune.

#### **4.1. Síntesis y metabolismo.**

La 5-HT se sintetiza a nivel central en los núcleos localizados en el tallo cerebral (células del núcleo del rafe), y principalmente (95%) a nivel periférico, en las células enterocromafines intestinales y en neuronas serotoninérgicas del plexo mientérico.

La síntesis de 5-HT se realiza a partir del triptófano mediante la enzima triptófano-5-hidroxilasa, dando lugar a 5-hidroxitriptófano que posteriormente será descarboxilado por la 5-OH-triptamina descarboxilasa y que dará lugar finalmente a la 5-hidroxitriptamina ó 5-HT. Ésta, una vez sintetizada, se acumula en el interior de la célula a la espera de ser liberada al exterior en respuesta a una determinada señal.

La principal vía de degradación de la 5-HT es mediante la actividad de la monoamino oxidasa (MAO) ubicada en el medio intracelular, que produce el ácido 5-hidroxi-indolacetaldehído, principal metabolito inactivo de la 5-HT. Además, en el aparato digestivo también la 5-HT es degradada a través de transferasas y otros enzimas intracelulares. Los procesos de degradación de la 5-HT requieren que previamente sea captada al interior celular, lo cual es llevado a cabo por un transportador específico de 5-HT [45].

#### **4.2. El transportador de serotonina (SERT)**

El transportador de 5-HT, SERT, es una proteína transportadora localizada en la membrana plasmática de diversas células. La función de SERT es transportar la 5-HT desde el espacio extracelular al intracelular. Para ello, SERT realiza un co-transporte de la 5-HT, junto con un ión  $\text{Na}^+$  y un ión  $\text{Cl}^-$ . Una vez traslocados la 5-HT, el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{Cl}^-$  al interior celular gracias a un cambio conformacional, el transportador vuelve a su situación de origen transportando al exterior celular un ión  $\text{K}^+$ .

SERT está codificado por el gen SLC6A4, que pertenece a la familia de transportadores SLC6, dependientes de  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ , donde también se incluyen varios transportadores de monoaminas, como la dopamina y la noradrenalina. SERT posee 12

dominios transmembrana, con los grupos amino y carboxi-terminal intracelulares. La expresión del transportador SERT presenta una amplia distribución, aunque su estudio se ha focalizado principalmente en el sistema nervioso central y el tracto gastrointestinal.

#### **4.3. Sistema serotoninérgico intestinal**

El sistema serotoninérgico intestinal presenta tres pilares de gran importancia:

1. Las células enterocromafines del epitelio intestinal, que son las encargadas de la síntesis y liberación de 5-HT (tanto por el borde apical como basal) previa estimulación. Esta síntesis y liberación constituyen el mecanismo denominado “**ON**” del sistema serotoninérgico.
2. Los receptores de serotonina, constituidos por 14 tipos diferentes agrupados en 7 familias. Estos receptores reconocen específicamente a la 5-HT y son los responsables de desencadenar los efectos intracelulares de la serotonina. Los receptores de 5-HT se encuentran distribuidos por todo el organismo, y sobre todo en el tracto gastrointestinal.
3. Los enterocitos del epitelio intestinal, encargados de la recaptación e internalización de la serotonina al interior celular a través de SERT, tanto en la membrana apical como en la membrana basolateral de las células. Con la internalización de 5-HT se favorece la terminación de la actividad serotoninérgica, por ello este sistema constituye el sistema “**OFF**”.

El efecto que la 5-HT pueda desarrollar en el organismo depende fundamentalmente de su disponibilidad, que a su vez depende de la actividad de los sistemas “ON y OFF”.

#### **4.4. Implicación del sistema serotoninérgico en la actividad intestinal**

La 5-HT es un neuromodulador que envía información desde la luz intestinal a los plexos nerviosos, la musculatura y el epitelio intestinal. Su liberación se produce tanto a la lámina propia como a la luz intestinal debido a la estimulación química y/o mecánica [46]. De esta forma, la 5-HT produce diferentes efectos dependiendo de la concentración de la misma y del receptor al que se una [47].



El sistema serotoninérgico está implicado en la mayor parte de las funciones intestinales. Así, resultados obtenidos en nuestro laboratorio y por otros autores demuestran que la 5-HT está implicada en la absorción de nutrientes [48, 49], la actividad motora [50, 51] y la secreción de agua y electrolitos [52].

La alteración de este sistema, por tanto, produce la afectación de numerosos procesos en el tracto gastrointestinal. Sin embargo, el papel que desempeña la 5-HT en el desarrollo de patologías inflamatorias crónicas gastrointestinales está siendo muy estudiado.

Existen numerosos estudios que confirman la implicación de la 5-HT en la inflamación intestinal crónica [53] sobre todo en la EC y la CU. En estas patologías se produce un aumento en el número de células enterocromafines [44] y disminución en la transcripción de SERT [54], provocando ambas un aumento de la concentración extracelular de 5-HT.

Por otro lado, se ha demostrado que la 5-HT modula la respuesta inmune intestinal dada la presencia de receptores de 5-HT en células dendríticas, linfocitos, macrófagos, células endoteliales y células epiteliales entéricas [43, 55, 56]. Toman relevancia los estudios que demuestran la activación de linfocitos por parte de la 5-HT, así como la implicación de la misma en la producción de citocinas proinflamatorias [57].

El papel del sistema serotoninérgico y de los PRRs en la función inmune intestinal está perfectamente documentado, no así, la posible relación establecida entre ellos. Estudios realizados previamente en nuestro laboratorio han demostrado que la activación de determinados TLRs influye en la actividad y expresión de SERT en células epiteliales intestinales [58, 59], además de influir en la producción de citocinas y factores proinflamatorios. Es por ello, que el objetivo de este trabajo es estudiar la implicación de otro tipo de PRRs, los NOD (NOD1 y NOD2) en la actividad y expresión de SERT en las células epiteliales intestinales y además, la relación existente entre NOD1 y NOD2 y algunos TLRs, más concretamente TLR2 y TLR4.

## II. OBJETIVOS

El intestino es un órgano complejo en el que, entre otras muchas, la función inmunológica adquiere gran relevancia al ser un órgano que está en continuo contacto con agentes externos.

Los TLRs y NODs son receptores de reconocimiento de patógenos (PRR) que detectan determinados fragmentos de microorganismos (PAMP) y activan la respuesta inmune intestinal, manteniendo la homeostasis del mismo. En situaciones de patología inflamatoria crónica, donde actúa el sistema inmune, se produce asimismo una alteración del sistema serotoninérgico intestinal, donde el transportador de serotonina (SERT) juega un papel fundamental como regulador de la disponibilidad extracelular de 5-HT.

Ante estos antecedentes, el objetivo general de este trabajo se ha centrado en estudiar la relación existente entre la activación de receptores NOD sobre SERT, utilizando como modelo enterocitario, la línea celular Caco-2, que expresa constitutivamente SERT. Por otro lado, y dado que tanto receptores TLR como NOD pertenecen al grupo de PRRs, se ha pretendido estudiar la interacción entre los TLRs y la expresión de los NODs.

Para alcanzar este objetivo general se han planteado los siguientes objetivos parciales:

- Determinar la expresión de NOD1 y NOD2 en células Caco-2.
- Estudiar el efecto de la activación de NOD1 y NOD2 sobre la actividad transportadora de SERT en células Caco-2.
- Estudiar el efecto de la activación de TLR2 sobre la expresión de NOD1 y NOD2 en células Caco-2.
- Analizar las modificaciones en la expresión de NOD1 y NOD2 en intestino delgado y colon de ratones deficientes en determinados TLRs (TLR2<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup> y TLR2,4<sup>-/-</sup>).

### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **III.1. Línea celular Caco-2**

La línea celular Caco-2, clon TC7, ha sido la utilizada como modelo experimental “in vitro” [60]. Estas células, cuando alcanzan la confluencia celular, desarrollan progresivamente y de forma espontánea una diferenciación morfológica y funcional de tipo enterocitario, con fenotipo absortivo.

Para la manipulación de las células y sus medios, se empleó una cabina de flujo laminar recirculante vertical de clase II (TELSTAR AV-100), que protege tanto al manipulador al mismo tiempo que permite unas condiciones de esterilidad adecuadas para la manipulación de los cultivos. Para el recuento celular, se ha utilizado un microscopio de luz invertida (Olympus CK2), que también permite una visión en contraste de fases de las células. Las células fueron mantenidas en cultivo en una estufa de CO<sub>2</sub> (Haeraeus BB16), donde se mantiene constante la temperatura (37°C), una atmósfera humidificada, con un 95% de aire y un 5% de CO<sub>2</sub>. Todo el material utilizado para la manipulación celular y sus medios ha sido de plástico estéril de un único uso (Sarstedt).

El cultivo se inicia a partir de un vial congelado, conservado en nitrógeno líquido, que contiene  $1-3 \times 10^6$  células en un volumen de 1,5 ml de medio de cultivo, con un 30% de SFB y un 10% de glicerol. Las células se descongelan a 37°C, se diluyen en 5 ml de medio de cultivo y se centrifugan a 3.000 rpm durante 5 minutos. Una vez eliminado el sobrenadante, las células son resuspendidas en 5 ml de medio de cultivo y puestas en cultivo, sembradas, en un frasco de 25 cm<sup>2</sup>.

El medio de cultivo utilizado es un Medio Esencial Mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), con alta concentración de glucosa (4,5 g/l), suplementado con un 20% de suero fetal bovino (SFB) previamente descomplementado (30 minutos a 56°C), 1% de penicilina (10000 UI/ml)-estreptomicina (10 mg/ml), 1% de aminoácidos no esenciales 10 mM, y 2% de L-glutamina 200 mM. . El medio de cultivo se conserva en frigorífico a 4°C, y previamente a su uso, es calentado a 37°C en un baño termostático, para evitar un choque térmico sobre las células.

Tras la siembra inicial, el medio se cambia a los 3 días y posteriormente diariamente. Antes de iniciar cualquier experimento, las células sufren dos pasajes, acción que se repetía semanalmente para el mantenimiento de la línea celular. Es decir,

el tapiz celular es tripsinizado una vez a la semana, cuando las células alcanzan casi el 100% de confluencia en cultivo, y de nuevo son sembradas en otros frascos o soportes de cultivo en función de las necesidades o experimentos a realizar.

El protocolo de tripsinización de un frasco de 25 cm<sup>2</sup> es el siguiente:

- 1) Retirar el medio de cultivo y lavar las células 2 veces con 5 ml de PBS.
- 2) Retirar los 5 ml de PBS y añade 1 ml de una solución tripsina 0,25% / EDTA 1 mM, en PBS. Se deja actuar la tripsina durante 5 minutos a 37°C en la estufa de cultivo, con el frasco cerrado.
- 3) Con unos ligeros golpes laterales en el frasco se despegan las células del plástico de cultivo. Se añaden 5 ml de medio de cultivo con 20% de SFB para neutralizar la tripsina, y con ayuda de una pipeta de 5 ml se homogeniza el contenido para individualizar las células con movimientos aspiración y expulsión. La suspensión celular se centrifuga a 3000 rpm durante 5 minutos y el pellet celular es resuspendido en 5 ml de medio de cultivo nuevo.
- 4) Se toma una pequeña muestra de la suspensión celular para realizar el recuento de células utilizando una cámara de Neubauer. La muestra se diluye 1/3 en azul de tripán (dilución 1/3), que permite al mismo tiempo estimar el número de células viables de las no viables. Con la ayuda del microscopio y la cámara de Neubauer, se realiza el recuento de las células en una superficie de 1 mm<sup>2</sup> y se calcula el número de células por ml de suspensión celular.
- 5) Conocida la densidad celular, se procede al cálculo del volumen de suspensión necesario para la siembra, teniendo en cuenta que la densidad celular de siembra normalmente fue de  $1,2 \times 10^6$  células/cm<sup>2</sup>. De esta manera en frascos de 25 y 75 cm<sup>2</sup>, se siembran 300.000 y 900.000 células, respectivamente. En otros soportes, como por ejemplo, en placas de 24 pocillos, cuya superficie de cultivo es de 2 cm<sup>2</sup>, la densidad de siembra fue mayor (40.000 células/pocillo).
- 6) Las placas y frascos fueron depositados en la estufa de cultivo para permitir la adhesión de las células al plástico y el inicio de la división celular. El medio fue cambiado a las 72 h de la siembra, y luego diariamente.

### III.2 Extracción de muestras intestinales de ratones

Los ratones utilizados fueron C57BL10 controles y KO (knock out) para los TLR2 (TLR2<sup>-/-</sup>), TLR4 (TLR4<sup>-/-</sup>) o TLR2 y 4 (TLR2,4<sup>-/-</sup>), cedidos por el Dr Julian Pardo, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Los ratones fueron mantenidos en ciclos de 12 h de luz y oscuridad, a una temperatura constante de 22°C, en atmósfera controlada, con libre acceso al agua y a una dieta estándar de comida, en las instalaciones del animalario del CITA (Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón). Los ratones de 10-12 semanas de vida fueron sacrificados por dislocación cervical, y se procedió a la extracción del intestino delgado y el colon. El protocolo de manejo y uso de estos animales de laboratorio ha seguido la normativa de experimentación animal (Real Decreto 53/2013) y cuenta con el visto bueno del Comité Ético para la experimentación animal de la Universidad de Zaragoza.

Las muestras destinadas a una posterior extracción de ARN se pesaron hasta una cantidad de 15 mg, y se mantuvieron en una solución de RNA-later durante 24 h a 4°C. Pasado este periodo de tiempo, las muestras fueron extraídas de la solución y almacenadas a -20°C hasta su uso.

Las muestras de tejido destinadas a la cuantificación de la expresión proteica por la técnica de western blot, fueron troceadas y congeladas de inmediato en una solución de isopentano en hielo seco. A partir del intestino delgado también se realizaron extracciones de mucosa intestinal, mediante raspado de la misma con un porta esmerilado. La mucosa extraída fue igualmente congelada. Todas las muestras fueron posteriormente almacenadas hasta su uso en un congelador a -80°C hasta su uso.

Para el estudio de la expresión proteica por western blot, las muestras fueron previamente homogenizadas con la ayuda de un ultra-turrax (Yellow Line DI 25 basic) en una solución de Tris-Manitol cuya composición se indica en la siguiente tabla:

COMPONENTES	Volúmenes (ml)
<i>TRIS 2 mM</i>	0,250
<i>Manitol 50 mM</i>	2,500
<i>Azida de sodio</i>	0,025
<i>PMSF</i>	0,025
<i>Benzamidina</i>	0,025
<i>Inhibidor de proteasas</i>	2,000
<i>Agua destilada</i>	20,175
<i>Volumen Final</i>	<i>25,000 ml</i>

### III.3. Cuantificación de proteínas

Se realizó la medición del contenido proteico en muestras de células en cultivo y en muestras de homogenados de intestino delgado y colon de ratón. La determinación de la concentración proteica se realizó mediante el método de Bradford [61]. Este método colorimétrico consiste en añadir un reactivo (colorante azul brillante de Coomassie G250 en solución ácida) que forma un complejo coloreado con las proteínas. Ello permite la valoración cuantitativa de proteínas mediante la medida de absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro. Este valor obtenido es proporcional a la concentración de proteínas en la muestra, según la ley de Lambert-Beer.

La relación entre absorbancia y concentración de proteínas se establece experimentalmente mediante el análisis de distintas concentraciones conocidas y crecientes de una proteína de referencia (recta patrón), en nuestro caso la albúmina sérica bovina (BSA, 1 mg/ml), a las que se les aplica, de forma paralela a las muestras problema, el mismo método analítico. Para la realización de la recta patrón de concentraciones proteicas, se prepararon 5 tubos por duplicado con cantidades de proteínas conocidas de BSA con los siguientes volúmenes, utilizando NaOH o Tris-Manitol como solución diluyente en función del tipo de proteínas que se querían analizar:

Componentes	Volúmenes (en $\mu$ l) para un volumen final de 15 $\mu$ l				
<i>BSA (1 mg/ml)</i>	0	2	5	10	15
<i>NaOH 0,1 N o Tris-Manitol</i>	15	13	10	5	0

Para medir la proteína de nuestra suspensión de células en cultivo, se extraen 10  $\mu$ l de cada pocillo en el caso de los estudios de transporte, y 2  $\mu$ l por triplicado en el caso de muestras de tejido de ratones.

A todos los tubos (muestras y patrones), se le añade 1 ml. de reactivo de Bradford (Bio-Rad) y se deja reaccionar 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se mide la absorbancia en un espectrofotómetro a 595 nm y se calcula su concentración teniendo en cuenta los volúmenes y diluciones indicadas.

### III.4. Estudios de transporte de 5-HT

Esta técnica permite determinar la funcionalidad del transportador SERT mediante la medida de la captación celular de 5-HT, y estudiar las alteraciones que se puedan producir en el transporte de 5-HT en función de los diferentes tratamientos a los que fueron sometidas las células.

Los experimentos se realizaron sobre células Caco-2/TC7 cultivadas en placas de 24 pocillos con una superficie de 2 cm<sup>2</sup>/pocillo. Para evitar interferencias en nuestros estudios con posibles elementos presentes en el SFB (factores de crecimiento, hormonas, etc.), las células fueron incubadas con medio de cultivo DMEM sin SFB durante 6 ó 24 horas, en función del experimento.

Se realizaron experimentos tratando las células con el agonista de NOD1 (C12-iE-DAP) a concentraciones de 0,1, 1 y 10 µg/ml o el agonista de NOD2 (N-Glycolyl-MDP) a concentraciones de 1, 10 y 50 µg/ml, utilizando tres periodos de tratamiento:

- Tratamiento de 24 horas en DMEM sin SFB.
- Tratamiento de 6 horas en DMEM sin SFB
- Tratamiento de 30 minutos, directamente en el Tampón I o medio de lavado.

Para la realización de los experimentos de transporte se prepararon tres medios o tampones: el Tampón I (medio de lavado), el Tampón II (medio de incubación o transporte), y el Tampón III (solución stop).

El tampón I se prepara según los volúmenes y concentraciones indicados en la siguiente tabla, para un volumen final de 1 litro, a partir de una serie de soluciones madre preparadas previamente.

Soluciones madre	Volumen solución madre (ml)	Concentración final (mM)
<i>NaCl 1 M</i>	137,0	137,0
<i>KCl 1 M</i>	4,7	4,7
<i>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 M</i>	2,4	1,2
<i>MgSO<sub>4</sub> 0,2 M</i>	6,0	1,2
<i>CaCl<sub>2</sub> 0,1 M</i>	25,0	2,5
<i>Hepes-Tris. pH 7,2 0,1 M</i>	100,0	10,0
<i>H<sub>2</sub>O destilada</i>	c.s.p. (1000 ml)	

Los tampones II y III se preparan a partir del tampón I, en función del volumen requerido por el experimento, necesitando 0,5 ml/pocillo del tampón II y 2 ml/pocillo del tampón III. Para ello, al volumen requerido del tampón I para la preparación del resto de tampones, se le agrega: glutamina 4 mM, BSA 0,1 mg/ml y ácido ascórbico 1 mM. En este punto, se separan los volúmenes necesarios para el tampón II y III. Al tampón III se le añade 5-HT para una concentración final de 20 µM, mientras que al tampón II se le añade 5-HT para una concentración final de 0,2 µM. Por último, al tampón II, o medio de transporte, se le añade [<sup>3</sup>H]-5-HT a la concentración de 1,5 µCi/ml (actividad específica 20-30 Ci/mmol). Los tampones I y II se mantienen a 37°C y el tampón III se enfría a 4°C, para facilitar su acción de detener el transporte.

Tras el periodo de tratamiento celular en ausencia de suero y en presencia de los agonistas de NOD1 y NOD2, las células fueron incubadas con el tampón I (1 ml/pocillo) durante 30 minutos, también en presencia del correspondiente tratamiento en la estufa a 37°C. Pasados los 30 minutos las células fueron lavadas de nuevo con 2 ml de tampón I.

A continuación se inicia el transporte propiamente dicho, añadiendo 0,5 ml de tampón II, a 37°C, y manteniendo las células en estas condiciones durante 6 minutos. Transcurrido este periodo de tiempo, se detiene la reacción de transporte mediante el lavado de las células con 1 ml de tampón III a 4°C, por dos veces.

Tras el último lavado, se añade 0,5 ml de NaOH 0.1 N al tapiz celular, y se incuba durante 24 horas a 4°C para romper la membrana celular y poder liberar el contenido de la misma. Posteriormente, se homogeneiza el tapiz, y se toman muestras para la medida de la radiactividad incorporada a las células durante el tiempo de transporte, y para calcular la concentración de proteínas.

La medida del transporte se realiza midiendo los valores de radioactividad (cpm) del medio de incubación y del homogenado celular. Para ello, sobre las muestras radioactivas se añade 1,5 ml de líquido de centelleo (GE Healthcare), y se procede a la lectura de los cpm de [<sup>3</sup>H] en un contador beta (Beckman).

Para el cálculo del sustrato acumulado en las células durante los 6 minutos de incubación, se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{pmol 5-HT / mg proteína} = \frac{\text{cpmC} \times V_m \times [5 - \text{HT}]}{\text{cpmM} \times \text{mg proteína}}$$



Donde:

- cmpC: son las cpm de los 200  $\mu$ l del homogenado celular
- Vm: es el volumen del medio de incubación radioactivo (5  $\mu$ l)
- [5-HT]: es la concentración del sustrato en  $\mu$ M (0,2  $\mu$ M)
- cmpM: son las cpm de los 5  $\mu$ l del medio de incubación
- mg proteína: mg de proteína de los 200  $\mu$ l de nuestro homogenado celular

### III.5. Análisis de expresión proteica: western blot

El estudio de la expresión de los receptores NOD1 y NOD2 en las muestras intestinales de ratones se ha realizado utilizando la técnica de western blot, mediante la que las proteínas son separadas por su tamaño por electroforesis en un gel de poliacrilamida con SDS (electroforesis SDS-PAGE), transferidas a una membrana de PVDF, y detectadas mediante el uso de un anticuerpo específico (inmunodetección).

Para la preparación de los geles de acrilamida se ha utilizado el sistema de minigeles de BioRad. El gel era preparado según la composición que se muestra en la siguiente tabla, de manera que el gel separador tiene una concentración de acrilamida del 8%, y el gel concentrador del 3%:

	GEL SEPARADOR (8%)	GEL CONCENTRADOR (3%)
<i>Agua miliQ</i>	4680 $\mu$ l	4240 $\mu$ l
<i>TRIS 1,5 M pH 8,8</i>	2500 $\mu$ l	--
<i>TRIS 0,5 M pH 6,8</i>	--	1900 $\mu$ l
<i>Acrilamida stock (30 %)</i>	2670 $\mu$ l	1250 $\mu$ l
<i>SDS 20%</i>	50 $\mu$ l	40 $\mu$ l
<i>Amonio Persulfato 10%</i>	100 $\mu$ l	70 $\mu$ l
<i>Temed</i>	15 $\mu$ l	4 $\mu$ l

Las muestras utilizadas han sido de homogenado celular de tejido intestinal de ratones y de células Caco-2, cuya concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford. En cada pocillo se cargaban 100  $\mu$ g de proteína. Las proteínas eran previamente desnaturalizadas utilizando un tampón que contiene Tris, SDS, glicerol y azul de bromofenol, e incubándolas durante 1 minuto a 100°C.

Una vez preparado el gel y desnaturalizadas las proteínas, éstas son cargadas en los pocillos del gel de acrilamida para proceder a su electroforesis, para lo cual todo el sistema está bañado en un tampón de electroforesis que contiene Tris 0,125 M, Glicina 0,96 M y SDS 0,5%. Todo el sistema se conecta a una fuente eléctrica con amperaje constante de 20 mA para la separación de las proteínas, y se deja migrar en estas condiciones hasta alcanzar la parte inferior del gel de separación.

A continuación estos geles se disponen en un sistema de electrotransferencia en contacto con una membrana PVDF (previamente activada con metanol), donde van a ser transferidas las proteínas de la muestra. Finalizada la transferencia, las membranas se lavan 5 minutos en PBS-T (PBS + 0,1% Tween 20). La visualización de las proteínas transferidas se realiza mediante una tinción con rojo ponceau, que posteriormente es retirado con lavados con PBS-T.

Para proceder a la detección de la proteína de nuestro interés, la membrana se bloquea con una solución de leche desnatada (4%) y BSA (1%) en PBS-T durante 2 horas a temperatura ambiente, que facilita la ocupación de espacios vacíos de la membrana, y evita la unión no específica del anticuerpo primario a la membrana. Posteriormente se realizan dos lavados de 5 minutos con 15 ml de PBS-T.

Las membranas bloqueadas se ponen en contacto con el anticuerpo primario específico durante dos horas: para NOD1, anti-CARD4 de ratón en conejo (Abcam, 1: 1000) y para NOD2 anti-NLRX1 de ratón en conejo (Abcam, 1: 1000). Tras esta incubación, se realiza un lavado de 15 minutos y tres lavados de 5 minutos con 15 ml de PBS-T. Posteriormente, se añade el anticuerpo secundario específico, que en ambos casos es anti-IgG de conejo (Santa Cruz, 1:5000) unido a la peroxidasa de rabano (HRP) durante una hora, y luego se realiza un lavado de 15 minutos y tres lavados de 5 minutos con 15 ml de PBS-T para terminar de retirar todo resto de anticuerpo sobre la membrana.

Finalmente, se prepara la solución de quimioluminiscencia (ECL Plus, GE Healthcare), con la que las membranas se incuban durante 4 minutos para permitir la reacción con la HRP unida al anticuerpo secundario. Posteriormente, la señal de luminiscencia fue detectada y almacenada utilizando el sistema de imagen VersaDoc™ (BioRad).

Para analizar y cuantificar los posibles cambios observados en la expresión de nuestra proteína se determinó sobre las mismas membranas la expresión de  $\beta$ -actina (Santa Cruz, 1: 10000), después de haber realizado un decapado de la membrana durante 30 minutos a 37°C con una solución de glicina 200 mM, SDS 0,4%, pH 2,5.

La cuantificación de los niveles de expresión se realizó con el programa de análisis Quantity One (Quantity One Analysis Software, BioRad), y calculados sobre la expresión de actina detectada (NOD1 o NOD2/actina).

### **III.6. Extracción de ARN, transcripción reversa, PCR y PCR en tiempo real**

En primer lugar se realizó la extracción de ARN a partir de las muestras de tejido previamente procesado y conservado en RNAlater, utilizando un kit comercial (RNeasy Mini Kit, Quiagen) y siguiendo el protocolo establecido por la casa comercial. La muestra se coloca en una serie de columnas de afinidad en las que al finalizar el proceso se obtiene el RNA total en una solución de agua libre de ARNasas.

Para determinar la concentración y calidad de ARN extraído se tomaron dos muestras. La primera para cuantificar y determinar la calidad del ARN extraído utilizando un espectrofotómetro NanoDrop<sup>TM</sup> 1000 (Termo Scientific). Los valores óptimos poseen un cociente de 260 nm y 280 nm de absorbancia de 1,9-2,0. La segunda muestra se utiliza para determinar la integridad del ARN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, con bromuro de etidio, de manera que en condiciones normales se observará la presencia del ARN ribosomal (28S y 18S) mediante excitación con luz ultravioleta.

Para poder amplificar el ARNm de nuestro interés, utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en primer lugar el ARNm fue transformado en ADNc mediante la técnica de la transcripción reversa (RT). Para ello, se ha utilizado un kit comercial (Life Technologies), siguiendo el protocolo indicado por la casa comercial. En primer lugar se desnaturaliza el ARN, para permitir la separación de las hebras y poder realizar la síntesis de la primera hebra de los ADNc usando Oligo (dT) como cebador y una transcriptasa reversa.

Una vez obtenido el ADNc se realizó la amplificación de fragmentos del ARNm de NOD1 y NOD2, mediante la técnica de la PCR utilizando cebadores sentido y antisentido específicos (Sigma-Aldrich) para cada uno de ellos y una Taq DNA

polimerasa (Biotools). Mediante esta técnica pudimos determinar cualitativamente la expresión del ARN de estos dos receptores.

Las secuencias de los cebadores sentido y antisentido diseñadas fueron las indicadas en la siguiente tabla:

Nombre	Secuencia (5'-3')
<i>NOD1 sentido</i>	CCACTTCACAGCTGGAGACA
<i>NOD1 antisentido</i>	TGAGTGGAAGCAGCATTTTG
<i>NOD2 sentido</i>	GAATGTTGGGCACCTCAAGT
<i>NOD2 antisentido</i>	CAAGGAGCTTAGCCATGGAG

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen de 25  $\mu$ l, mediante los siguientes reactivos:

<i>Agua DEPC</i>	17,9 $\mu$ l
<i>10X High fidelity PCR buffer</i>	2,5 $\mu$ l
<i>50 mM MgCl<sub>2</sub></i>	1,0 $\mu$ l
<i>10 mM dNTP mix</i>	0,5 $\mu$ l
<i>10 <math>\mu</math>M cebador sentido</i>	0,5 $\mu$ l
<i>10 <math>\mu</math>M cebador antisentido</i>	0,5 $\mu$ l
<i>ADNc (10% de la reacción de RT)</i>	2,0 $\mu$ l
<i>ADN polimerasa</i>	0,1 $\mu$ l

La amplificación de NOD1 y NOD 2 se realizó bajo las siguientes condiciones:

- 94°C, 2 minutos
- 30 ciclos de:
  - o 94°C, 30 segundos (desnaturalización)
  - o 60°C, 30 segundos (unión del cebador)
  - o 72°C, 1 minuto (extensión)
- 72°C, 10 minutos (extensión final)

Los productos obtenidos se someten a electroforesis en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio. Una vez migrado se observa en un transiluminador con luz UV para comprobar que la talla de la muestra amplificada se corresponde con la talla de NOD1 y NOD2 esperada.

Para valorar la expresión relativa de NOD1 y NOD2 se utilizó la técnica de PCR en tiempo real (qPCR) a partir del ADNc obtenido por RT. Esta técnica se basa en la monitorización de la PCR usando técnicas de fluorescencia. En nuestro caso hemos usado como marcador fluorescente el SYBR Green que posee la propiedad de unirse al ADN de manera inespecífica, por lo que al aumentar el número de copias de ADN, aumenta la fluorescencia emitida, obteniendo una cuantificación relativa respecto a genes calibradores invariables (housekeeping), los cuales no sufren cambios bajo las condiciones experimentales. En nuestro caso hemos utilizado como calibradores el gen HPRT y el gen GADPH.

Los cebadores específicos utilizados en qPCR SYBR Green para NOD1, NOD2, GADPH y HPRT son:

Nombre	Secuencia (5'-3')
<i>NOD1 sentido</i>	CACAGCGCTCTTCACTTTTG
<i>NOD1 antisentido</i>	GTTAGCCAGCAGGACCAGAG
<i>NOD2 sentido</i>	CTTCATTTGGCTCATCCGTAG
<i>NOD2 antisentido</i>	CTGGAGATGTTGCAGTACAAAG
<i>GADPH sentido</i>	AACGACCCCTTCATTGAC
<i>GADPH antisentido</i>	TCCACGACATACTCAGCAC
<i>HPRT sentido</i>	CTGGTGAAAAGGACCTCTCGAA
<i>HPRT antisentido</i>	CTGAAGTACTCATTATAGTCAAGGGCAT

La expresión del ARNm de NOD1 y NOD2 en cada condición se expresó como  $\Delta Ct$  ( $= Ct_{NOD} - Ct_{calibrador}$ ). A partir de este valor, se calculó la expresión relativa de ARNm como  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{tratamiento} - \Delta Ct_{control}$ . Por último, el nivel relativo de expresión del gen NOD1 o NOD2 se indicó según el valor  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

## IV. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación han sido organizados en cuatro apartados diferentes, en función del objetivo planteado y el diseño experimental:

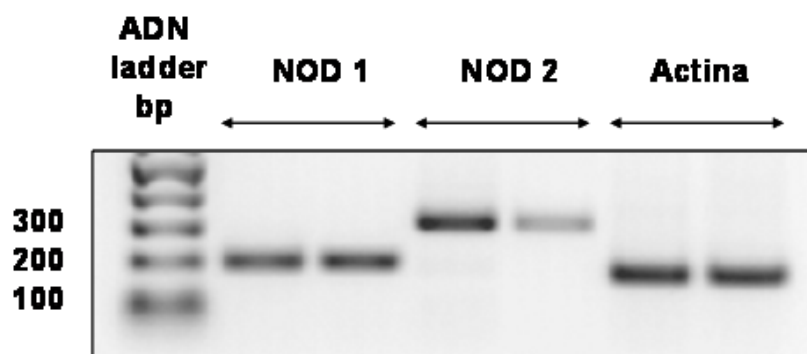
1. Análisis preliminar de la expresión molecular del ARNm y de la proteína de los receptores NOD1 y NOD2 en la línea celular enterocitaria humana Caco-2.
2. Estudio del efecto de la activación de NOD1 o NOD2 sobre la actividad de SERT en células Caco-2.
3. Efecto de la activación del TLR2 sobre la expresión génica de NOD1 y NOD2 en células Caco-2.
4. Análisis de la expresión molecular (ARNm y proteína) de NOD1 y NOD2 en intestino delgado y colon de ratones que no expresan TLR2 (TLR2<sup>-/-</sup>), TLR4 (TLR4<sup>-/-</sup>) o TLR2 y 4 (TLR2,4<sup>-/-</sup>).

### IV.1. Análisis preliminar de la expresión molecular del ARNm y de la proteína de los receptores NOD1 y NOD2 en la línea celular epitelial intestinal humana Caco-2

El primer estudio necesario para el posterior desarrollo del presente trabajo fue determinar la expresión del ARNm y de la proteína de los receptores NOD1 y NOD2 en la línea celular Caco-2. NOD1 y NOD2 participan activamente en la respuesta inflamatoria constituyendo, junto a los TLRs, mecanismos de defensa fundamentales frente a los microorganismos presentes en la luz intestinal. La presencia de ambos receptores ha sido descrita en el epitelio intestinal [62, 63]

Para determinar la expresión del ARNm se extrajo el ARN total de células Caco-2, se realizó la transcripción reversa del ARNm, para posteriormente amplificar por PCR secuencias de NOD1 y NOD2 mediante cebadores específicos diseñados con este fin. La metodología empleada ha sido descrita en el apartado de Material y Métodos.

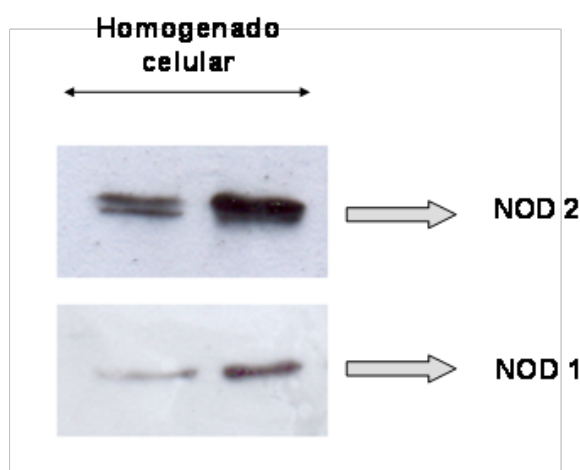
Los resultados obtenidos muestran una amplificación de las secuencias esperadas de NOD1 y NOD2, con un tamaño de 219 y 317 bp, respectivamente. Como control de la RT-PCR se utilizó la  $\beta$ -actina (Figura 1).



**Figura 1.** Expresión de ARNm de NOD1 y NOD2 determinada por RT-PCR en células Caco-2. Se realizó por duplicado a partir de dos cultivos de distinto pasaje.

Tras haber demostrado que las células Caco-2 expresan el ARNm de NOD1 y NOD2, se consideró importante determinar la expresión de la proteína de estos receptores en dichas células, como elemento fundamental para poder desarrollar los otros objetivos planteados en el presente trabajo. Para ello, se aplicó la técnica de electroforesis e inmunodetección (SDS-PAGE) o western blot, a partir de homogenados celulares descrita en el apartado de Material y Métodos.

Los resultados muestran que ambas proteínas se expresan también en la línea celular (Figura 2), con un peso molecular de 108 kDa para ambos receptores.



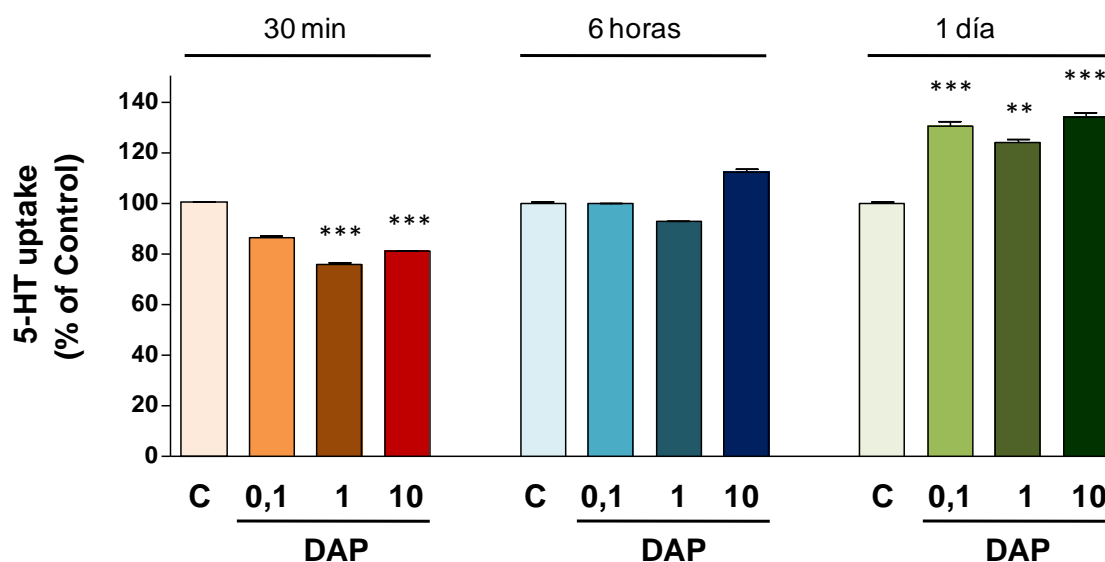
**Figura 2.** Determinación de la expresión de los receptores NOD 1 y NOD2 en células Caco-2 mediante western blot. Se utilizó 100  $\mu$ g de homogenado celular obtenido a partir de dos pasajes distintos de células.

## IV.2. Estudio del efecto de la activación de NOD1 o NOD2 sobre la actividad de SERT en células Caco-2

### 2.1.- Tratamiento con el agonista de NOD1: C12-iE-DAP

El estudio se realizó planteando el análisis de la actividad transportadora de SERT (captación de 5-HT) en células Caco-2, en función de la activación de NOD1 a diferentes tiempos (30 min, 6 h y 1 d) y concentraciones de tratamiento (0,1, 1 y 10  $\mu\text{g/ml}$ ). Los resultados muestran que el tratamiento de las células con C12-iE-DAP (DAP), agonista específico de NOD1, produce un efecto inhibitorio de la captación de 5-HT, especialmente significativo a altas concentraciones (1 y 10  $\mu\text{g/ml}$ ) y a 30 min. Sin embargo, a 1 día de tratamiento y a todas las concentraciones ensayadas, se produce un efecto inverso, resultando un aumento de la captación celular de 5-HT (Figura 3). Estos resultados sugieren un efecto dual de la activación de NOD1 sobre la actividad de SERT.

Curiosamente, los resultados obtenidos a 6 h de tratamiento parecen indicar que la activación de NOD1 no afecta la actividad de SERT, lo cual podría indicar un tránsito en la dualidad de efecto entre corto (30 min) y largo plazo (1 d).



**Figura 3.** Efecto del tratamiento de las células Caco-2 durante 30 min, 6 h y 1 d con DAP a diferentes concentraciones (0,1, 1 y 10  $\mu\text{g/ml}$ ) sobre la captación de 5-HT, medida tras 6 minutos de incubación con 5-HT. \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$  en comparación al control.

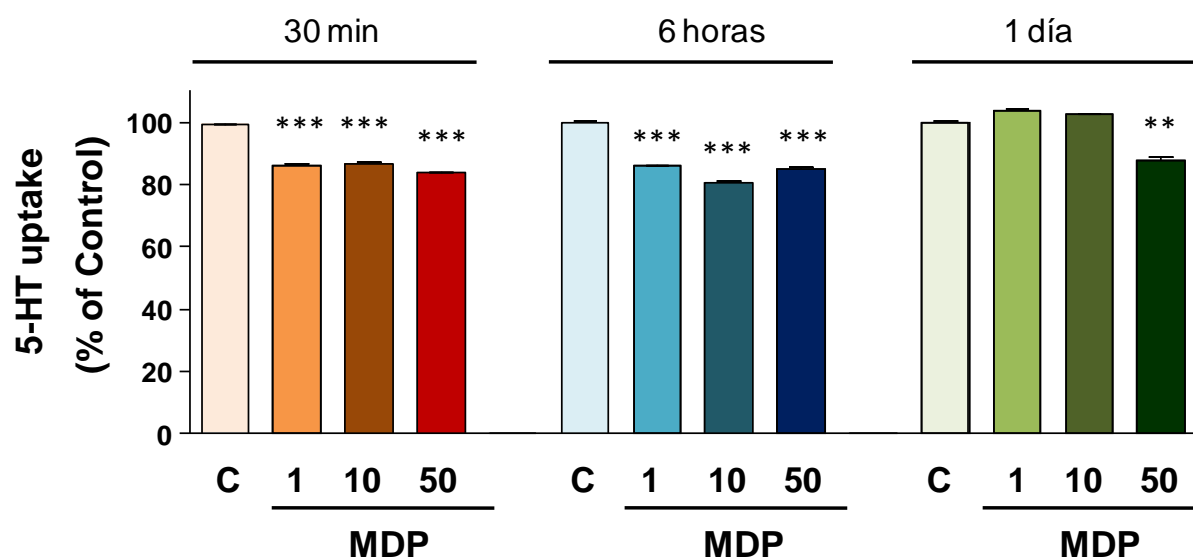


## 2.2.- Tratamiento con el agonista de NOD2: n-glycolyl-MDP

De manera similar a lo indicado en el apartado anterior, también se realizó el estudio de la actividad de SERT, tratando las células con n-glicolil-muramil dipéptido (MDP), agonista específico de NOD2, a distintas concentraciones (1, 10 y 50  $\mu\text{g/ml}$ ) y periodos de tratamiento (30 min, 6 h y 1 d).

Los resultados muestran que el tratamiento durante 30 min y 6 h produjo una inhibición significativa del transportador SERT a todas las concentraciones empleadas. En el caso de tratamiento a 1 d el efecto fue sólo significativo cuando se llevó a cabo con la concentración más alta del agonista (50  $\mu\text{g/ml}$ ) (Figura 4).

Este resultado parece indicar que la activación de NOD2 inhibe la actividad de SERT en células Caco-2, a corto y medio plazo.



**Figura 4.** Efecto del tratamiento de las células Caco-2 durante 30 min, 6 h y 1 d con MDP a diferentes concentraciones (1, 10 y 50  $\mu\text{g/ml}$ ) sobre la captación de 5-HT, medida tras 6 minutos de incubación con 5-HT. \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$  en comparación al control.

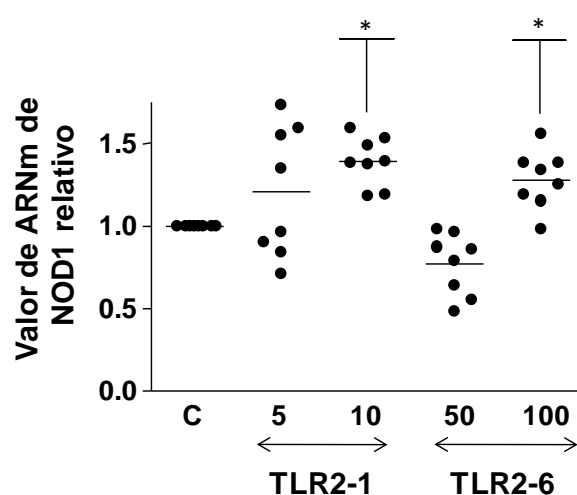
### IV.3. Efecto de la activación del TLR2 sobre la expresión génica de NOD1 y NOD2 en células Caco-2

Debido a que, tanto los receptores NOD1 y NOD2 como los TLRs, forman parte del grupo de receptores PRRs que participan activamente en la respuesta a la microbiota luminal que lleva a cabo el epitelio intestinal mediante la inmunidad innata, otro objetivo planteado en este trabajo fue estudiar la posible interacción entre el TLR2 y los receptores NOD1 y NOD2. Para ello se utilizaron también las células Caco-2, en las que previamente se había determinado la expresión de TLR2. En estas células se activó TLR2 en sus dos formas heterodiméricas, TLR2/1 y TLR2/6, utilizando el agonista de TLR2/1, Pam3CSK4, y el agonista de TLR2/6, Pam2CSK3, y realizándose el tratamiento durante un periodo de 1 día.

#### 3.1.- Expresión de NOD1

Para poder demostrar la relación existente entre TLR2 y NOD1, realizamos un tratamiento a diferentes concentraciones de los agonistas de TLR2/1 y de TLR2/6 y se analizó las posibles modificaciones en la expresión de ARNm de NOD1.

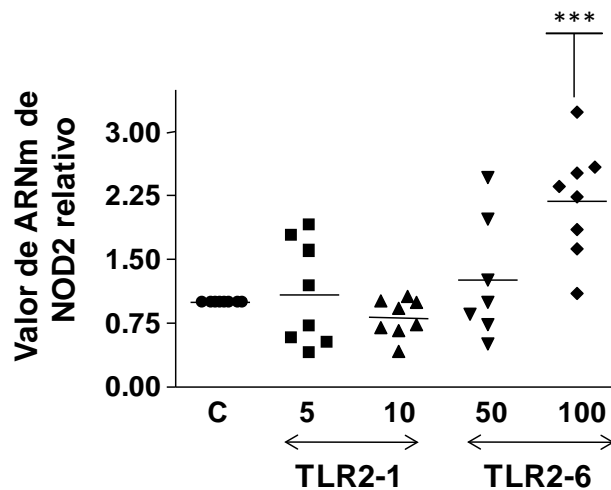
Los resultados mostraron que solo altas concentraciones de los agonistas de TLR2/1 y TLR2/6, 10  $\mu\text{g/ml}$  y 100  $\text{ng/ml}$ , respectivamente, produjeron un pequeño aumento significativo de la expresión de NOD1 (Figura 5).



**Figura 5.** Efecto del tratamiento de las células Caco-2 con el agonista de TLR2/1 y de TLR2/6 durante 1 d, a diferentes concentraciones (5 y 10  $\mu\text{g/ml}$ , 50 y 100  $\text{ng/ml}$ , respectivamente) sobre la expresión de ARNm de NOD1. \* $p < 0.05$  comparado con el control.

### 3.2.- Expresión de NOD2

En el estudio de la expresión de NOD2 tras la activación de TLR2/1 y TLR2/6 con los agonistas específicos indicados, en las mismas condiciones utilizadas en el estudio sobre NOD1 se obtuvieron resultados diferentes (Figura 6). Por un lado la activación de TLR2/1 no indujo ninguna alteración sobre la expresión de NOD2. Sin embargo, altas concentraciones (100 ng/ml) de Pam2CSK3, agonista de TLR2/6, indujeron un fuerte incremento (superior a 2 veces) de la expresión de NOD2.



**Figura 6.** Efecto del tratamiento de las células Caco-2 con el agonista de TLR2/1 y de TLR2/6 durante 1 día a diferentes concentraciones (5 y 10  $\mu$ g/ml, 50 y 100 ng/ml respectivamente) sobre la expresión de ARNm de NOD2. \*\*\* $p < 0.001$  comparado con el control.

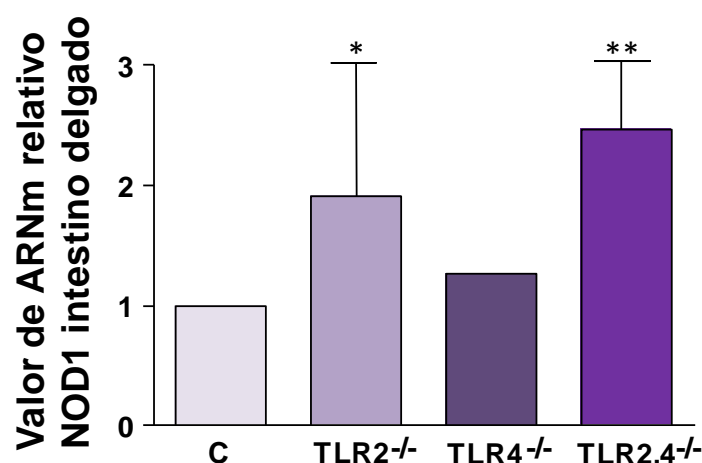
En conjunto, estos resultados sobre la interacción de TLR2 con los receptores NOD parecen sugerir una cierta especificidad de TLR2 sobre la regulación de la expresión de NOD1 y NOD2, aumentando su expresión cuando TLR2 es activado. Sin embargo, existe una clara diferencia en función del heterodímero activado (TLR2/1 o TLR2/6) y del receptor NOD afectado. Así, NOD1 incrementa su expresión ligeramente por la activación de ambos heterodímeros, mientras que NOD2 solo se ve incrementado por la activación de TLR2/6.

#### IV.4. Análisis de la expresión de NOD1 y NOD2 en intestino delgado y colon de ratones TLR2<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup> o TLR2,4<sup>-/-</sup>

Quedando demostrado en el punto anterior la posible modulación de la expresión de los receptores NOD mediada por TLR2, y con el fin de profundizar más en este aspecto, se analizó cuál era el grado de expresión molecular de los receptores NOD en intestino delgado y colon de ratones que no expresan (knockout, KO) los receptores TLR2 (TLR2<sup>-/-</sup>), TLR4 (TLR4<sup>-/-</sup>) y TLR2 y 4 (TLR2,4<sup>-/-</sup>). Para ello, se procedió a medir el nivel de expresión del ARNm de NOD1 y NOD2 mediante la técnica qRT-PCR, y el nivel de expresión proteica de estos receptores NOD1 y NOD2 mediante western blot, ambas técnicas descritas en el apartado de Material y Métodos.

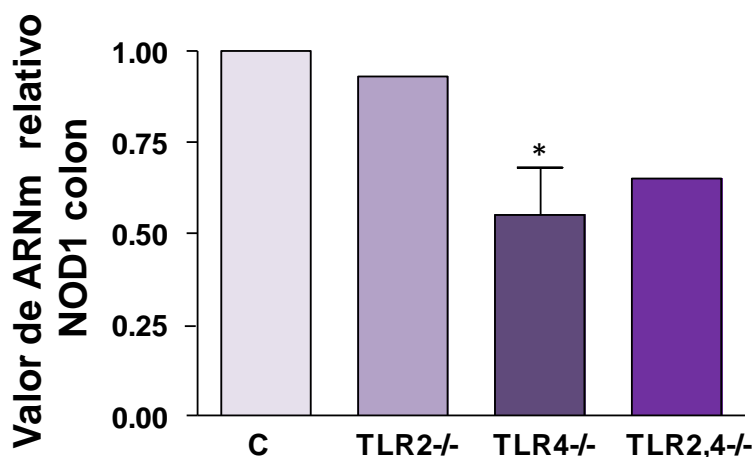
##### 4.1.- Análisis de la expresión de NOD1

El grado de expresión del ARNm de NOD1 en intestino delgado de ratones TLR2<sup>-/-</sup> y TLR2,4<sup>-/-</sup> fue mayor que en ratones control, siendo especialmente significativo en TLR2,4<sup>-/-</sup>. Sin embargo, en ausencia única de TLR4 no hubo modificación del nivel de expresión de ARNm de NOD1 (Figura 7). Este dato parece sugerir que la ausencia de expresión del TLR4 podría contribuir al incremento de las alteraciones de expresión de ARNm de NOD1 generadas por la ausencia de expresión de TLR2.



**Figura 7.** Expresión de ARNm de NOD1 en intestino delgado en de ratones TLR2<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup> y TLR2,4<sup>-/-</sup> determinada por qRT-PCR. \*p<0.05, \*\*p<0.01 comparado con el control.

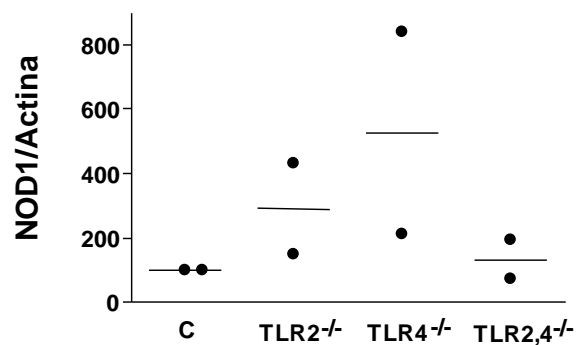
Contrariamente a los resultados obtenidos en intestino delgado, el grado de expresión de ARNm de NOD1 en colon de ratones TLR4<sup>-/-</sup> o TLR2,4<sup>-/-</sup> fue menor que en ratones control, siendo esta disminución significativa solo en el caso de TLR4<sup>-/-</sup> (Figura 8). En colon de ratones TLR2<sup>-/-</sup> no se detectó diferencia en la expresión de NOD1 respecto al control.



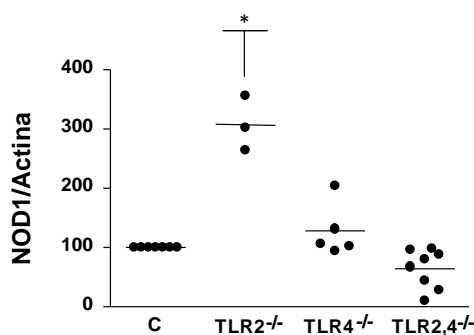
**Figura 8.** Expresión de ARNm de NOD1 en colon de ratones TLR2<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup> y TLR2,4<sup>-/-</sup> determinada por qRT-PCR. \*p<0,05 comparado con el control.

Tras la obtención de estos resultados, se procedió a realizar el estudio de la expresión molecular de la proteína del receptor NOD1, mediante western blot, en intestino delgado y colon de ratones TLR2<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup> y TLR2,4<sup>-/-</sup>.

En intestino delgado se analizaron dos tipos de muestras: muestras con tejido intestinal entero y muestras procedentes únicamente de raspado de mucosa intestinal. Los resultados muestran que, tanto en tejido entero como en mucosa, se produjo un aumento en la expresión proteica del receptor NOD1 en ratones TLR2<sup>-/-</sup> y TLR4<sup>-/-</sup>; siendo sólo significativo en mucosa de ratones TLR2<sup>-/-</sup>. En el caso de tejido completo, hubo una mayor expresión en ausencia de TLR4. Sin embargo, tanto en tejido entero como en raspado de mucosa de ratones TLR2,4<sup>-/-</sup>, los niveles de expresión de NOD1 se mantuvieron similares al control, si bien en ausencia individual (TLR2<sup>-/-</sup> y TLR4<sup>-/-</sup>) se produce un aumento de la expresión (Figuras 9 y 10).



**Figura 9.** Expresión proteica del receptor de NOD1 en muestras de intestino delgado de ratones TLR2<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup> y TLR2,4<sup>-/-</sup>.

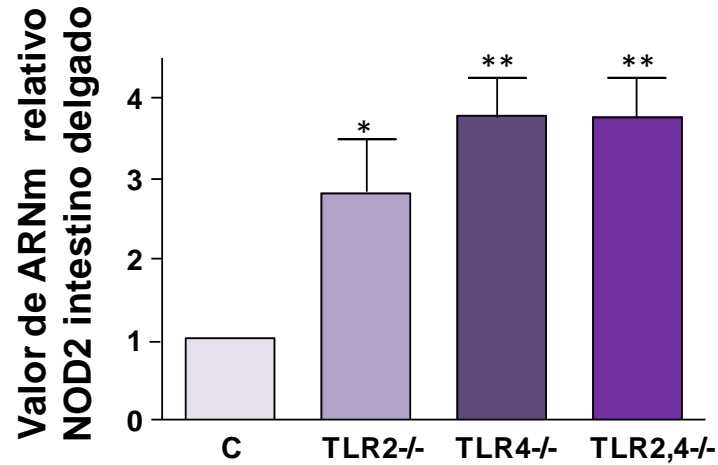


**Figura 10.** Expresión proteica del receptor de NOD1 en muestras de raspado de mucosa del intestino delgado de ratones TLR2<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup> y TLR2,4<sup>-/-</sup>. \*p<0,05 comparado con el control.

#### 4.2. Análisis de la expresión de NOD2

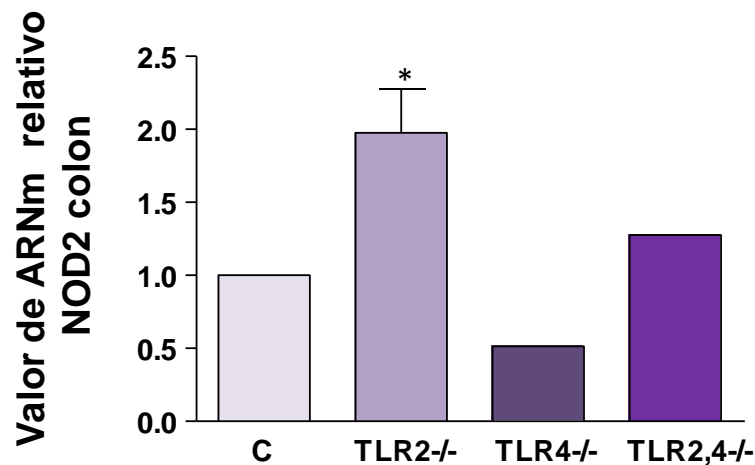
Al igual que con el receptor NOD1, el objetivo de este apartado era conocer el grado de expresión del receptor NOD2 en intestino delgado y colon de ratones TLR2<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup> y TLR2,4<sup>-/-</sup> siguiendo la misma metodología utilizada anteriormente.

El grado de expresión de ARNm de NOD2 en intestino delgado de ratones TLR2<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup> y TLR2,4<sup>-/-</sup> aumentó respecto al control, siendo especialmente significativo TLR4<sup>-/-</sup> y TLR2,4 (Figura 11).



**Figura 11.** Expresión de ARNm de NOD2 en intestino delgado de ratones TLR2<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup> y TLR2,4<sup>-/-</sup> determinada por qRT-PCR. \*p<0,05 y \*\*p<0,01 comparado con el control.

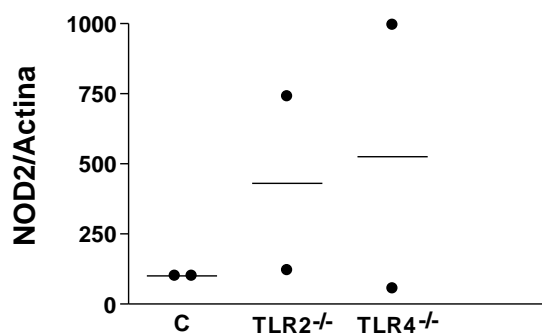
Por el contrario, en el colon, el nivel de expresión de ARNm de NOD2 es mayor en ratones TLR2<sup>-/-</sup>, mientras que en ratones TLR4<sup>-/-</sup> y TLR2,4<sup>-/-</sup> no se observaron cambios significativos (Figura 12).



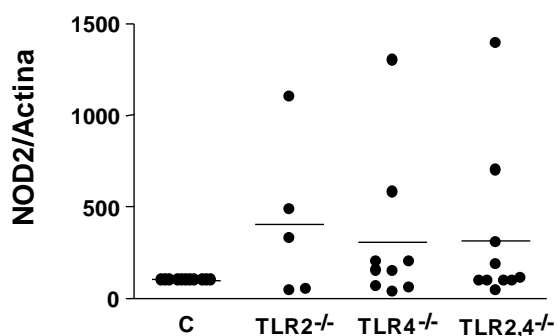
**Figura 12.** Expresión de ARNm de NOD2 en colon de ratones TLR2<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup> y TLR2,4<sup>-/-</sup> determinada por qRT-PCR. \*p<0,05 comparado con el control.

Una vez obtenido el grado de expresión de ARNm de NOD2 en intestino y colon de ratones TLR2<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup> y TLR2,4<sup>-/-</sup> se procedió a realizar el estudio del receptor NOD2 en intestino delgado de estos mismos ratones, por western blot. En este estudio, como se puede observar, la disponibilidad de muestras fue menor y no se pudo analizar el colon, por no disponer de material suficiente. Asimismo, no se dispuso de intestino delgado completo de ratones TLR2,4<sup>-/-</sup>.

En tejido completo (Figura 13) parece producirse un aumento en la expresión proteica del receptor NOD2 en TLR2<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup>. También en la mucosa la expresión del receptor de NOD2 pareció aumentar en TLR2<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup> y TLR2,4<sup>-/-</sup> (Figura 14).



**Figura 13.** Expresión proteica del receptor NOD2 en tejido entero del intestino delgado de ratones TLR2<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup> y TLR2,4<sup>-/-</sup> determinada por western blot.



**Figura 14.** Expresión proteica del receptor NOD2 en raspado de mucosa del intestino delgado de ratones TLR2<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup> y TLR2,4<sup>-/-</sup> determinada por western blot.



## **V. DISCUSIÓN**

El trabajo desarrollado y presentado en la memoria muestra dos partes diferenciadas con un factor común: el análisis de los receptores NOD1 y NOD2 en el intestino. En la primera parte del trabajo se aborda la influencia de la activación de NOD1 y NOD2 sobre la actividad del transportador SERT. En la segunda parte se ha analizado la modulación de la expresión intestinal de NOD1 y NOD2 en función de la expresión de diversos TLRs. Por ello, la discusión va a incluir estos dos apartados, realizando al final un análisis global de todos los resultados en el entorno de la fisiopatología intestinal.

### **V.1. Efecto de la activación de NOD1 y NOD2 sobre la actividad de SERT.**

La serotonina (5-HT) es un neuromodulador muy ligado a la actividad intestinal y a su sistema inmunológico. El transportador SERT es responsable en parte de regular la disponibilidad extracelular de 5-HT, lo cual determina la magnitud y duración de la respuesta serotoninérgica. Numerosos estudios han demostrado que la serotonina está aumentada en situaciones inflamatorias provocando, además, proliferación de linfocitos [64], secreción de interleucinas proinflamatorias [65] e inhibiendo la apoptosis de las células inmunológicas [66]. Asimismo, resultados obtenidos en nuestro laboratorio demuestran que en situación proinflamatoria la actividad de SERT está inhibida [59] y que la IL-10, citocina antiinflamatoria, estimula la actividad de SERT [67]. Recientes estudios muestran que pacientes con enfermedades inflamatorias intestinales crónicas presentan un aumento en el nivel de 5-HT [68] [44].

Dada la clara participación del sistema serotoninérgico en la actividad inmunológica intestinal, se consideró conveniente analizar su relación con los receptores ligados al sistema inmune innato NOD1 y NOD2, pertenecientes a la familia de proteínas receptoras tipo NLR. Estos receptores intracelulares, que se localizan en células epiteliales e inmunológicas, responden a componentes de la microbiota, en concreto, NOD1 y NOD2 detectan muropeptidos derivados de peptidoglicanos, principales componentes de la pared celular de bacterias Gram-positivas.

Estudios anteriores desarrollados en nuestro laboratorio demostraron que la activación de diversos TLRs, receptores también ligados a la actividad inmune innata intestinal, provocan una inhibición en el transportador SERT y por lo tanto pueden

promover la producción de sustancias proinflamatorias [58]. Es por ello que se planteó como objetivo analizar si los receptores NOD1 y NOD2 también podían influir en la actividad de SERT. Para ello se utilizó la línea celular Caco-2 que expresa SERT [69] y que es un excelente modelo experimental reconocido para su estudio.

Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento de células Caco-2 con agonistas específicos de NOD1 y NOD2 modula la actividad del transportador SERT de manera diferente. Así, la activación del receptor NOD2 parece inhibir la actividad del transportador SERT especialmente a corto y medio plazo, lo cual conduciría a un aumento de la disponibilidad de 5-HT en el medio extracelular. Sin embargo, el efecto de la activación de NOD1 sobre el transportador SERT parece ser dual, ya que la activación durante un corto periodo de tiempo parece inhibir la actividad de SERT, mientras que cuando se activa durante tiempo prolongado el efecto es contrario, aumentando la actividad transportadora de SERT. Este tipo de efecto dual sobre la actividad de SERT ya ha sido observado en el caso de la IL-10 [67].

En consecuencia, la activación de NOD2 podría generar una actividad proinflamatoria intestinal favorecida por el aumento de la disponibilidad de 5-HT, lo cual podría corroborar el posible papel de 5-HT en la respuesta inmunológica a la microbiota del intestino. Por otro lado, NOD1 a corto plazo podría aumentar la disponibilidad de 5-HT, contribuyendo a un aumento de 5-HT extracelular y a una acción pro-inflamatoria; sin embargo, la activación a largo plazo de NOD1 reduciría la disponibilidad de 5-HT, pudiendo actuar de modo anti-inflamatorio.

Este efecto diferenciado de NOD1 y NOD2 sobre SERT confirmaría la diversidad y complejidad de las respuestas intestinales a la microbiota.

## **V.2. Efecto de los TLRs sobre la expresión de NOD1 y NOD2**

Los TLRs al igual que los NLRs, son receptores de respuesta a la microbiota que contribuyen a la inmunidad innata intestinal. Diversos trabajos han demostrado que existe una regulación cruzada entre diversos TLRs, especialmente entre el TLR2 y TLR4 [70, 71]. Por ello pareció interesante analizar si TLR2 y TLR4 afectaban la expresión de NOD1 y NOD2.

En el caso del efecto de la activación del TLR2, realizado en células Caco-2, se analizaron los dos heterodímeros (TLR2/1 y TLR2/6), dado que resultados previos de

nuestro laboratorio ya habían mostrado que estas células expresan TLR1, TLR2 y TLR6, y que además existían diferencias en la actividad de estos heterodímeros. Los resultados obtenidos indican que la expresión de ARNm de NOD1 resultó aumentada significativamente al activar TLR2/1 y TLR2/6 con alta concentración de ligando. Sin embargo, en el caso de NOD2, la expresión se ve aumentada únicamente cuando se activa TLR2/6 a alta concentración. Previos estudios han mostrado que la activación de NOD2 puede interferir en la expresión del TLR2/1 de manera negativa, aunque esta relación parece estar condicionada por el tipo celular empleado [72, 73]. De estos resultados podría deducirse una cooperación entre la activación intensa de TLR2 y la expresión génica de los NOD1 y NOD2 en células de tipo enterocitario humano.

Con el fin de profundizar en este resultado, se analizó la expresión génica de NOD1 y NOD2 en tejido intestinal (intestino delgado y colon) de ratones TLR2<sup>-/-</sup>, y se amplió el estudio a intestino de ratones TLR4<sup>-/-</sup> y TLR2,4<sup>-/-</sup>. En este caso se analizó la expresión de ARNm por qRT-PCR, y se determinó la expresión proteica de NOD1 y NOD2 por western blot en intestino delgado.

## **2.1. Análisis de la expresión de NOD1 en intestino delgado y colon de ratones TLR2<sup>-/-</sup> TLR4<sup>-/-</sup> y TLR2,4<sup>-/-</sup>.**

Los resultados obtenidos en intestino delgado muestran que la expresión de ARNm de NOD1 se vio incrementada en ratones TLR2<sup>-/-</sup> TLR4<sup>-/-</sup> y en TLR2,4<sup>-/-</sup>, mientras que la expresión proteica de NOD1 en tejido completo y mucosa de intestino delgado resultó aumentada en ratones TLR2<sup>-/-</sup> y TLR4<sup>-/-</sup> (siendo significativa en ratones TLR2<sup>-/-</sup>), pero no en el doble TLR2,4<sup>-/-</sup>. Estos resultados parecen sugerir que la activación por separado de TLR2 y TLR4 podría reducir la expresión de NOD1 en intestino delgado. Sin embargo, una activación conjunta de ambos TLRs parece no alterar la expresión proteica de NOD1, aunque si su ARNm, existiendo quizás otros mecanismos de regulación implicados en este complejo mecanismo inmunitario.

Respecto al colon, los resultados obtenidos muestran que en ratones TLR4<sup>-/-</sup> y TLR2,4<sup>-/-</sup> disminuye la expresión de ARNm de NOD1.

El análisis del resultado obtenido en el apartado anterior en células Caco-2 (activación intensa del TLR2 aumenta la expresión de NOD1) corrobora parcialmente el resultado obtenido en colon de ratones TLR2,4<sup>-/-</sup>, sin embargo la falta de plena

coincidencia podría entenderse teniendo en cuenta las diferencias entre una monocapa celular enterocitaria y el tejido entero intestinal, así como efectos colaterales que pueden ir asociados a la ausencia de expresión de un gen.

## **2.2. Análisis de la expresión de NOD2 en intestino delgado y colon de ratones TLR2<sup>-/-</sup> TLR4<sup>-/-</sup> y TLR2,4<sup>-/-</sup>.**

Los resultados obtenidos muestran que en intestino delgado la expresión de ARNm de NOD2 aumenta en ratones TLR2<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup> y TLR2,4<sup>-/-</sup>, lo cual se corrobora con la cuantificación de la expresión de proteína NOD2 en tejido completo y mucosa. Estos resultados parecen indicar que la activación de TLR2 y TLR4 podrían actuar inhibiendo también la expresión de NOD2.

Respecto al estudio realizado sobre tejido de colon, la expresión de ARNm de NOD2 únicamente resultó aumentada significativamente en ratones TLR2<sup>-/-</sup>.

Si se comparan estos resultados con los obtenidos en células Caco-2, tal como observamos en el caso del NOD1, se detectan diferencias en los resultados. Sin embargo recientes estudios han mostrado que la activación del TLR2 y TLR4 en el ligamento periodontal producía incremento de la expresión de NOD1 y NOD2, hecho que concuerda con los resultados obtenidos en células Caco-2 y parcialmente con los del colon de animales knockout, ya que en ratones TLR4<sup>-/-</sup> y TLR2,4<sup>-/-</sup> disminuían la expresión de NOD1 y en ratones TLR4<sup>-/-</sup> disminuía la expresión de NOD2. [74]. De nuevo se pone de relieve el hecho de que los resultados obtenidos dependen en gran medida del modelo experimental y del tejido estudiado.

El análisis de la relación existente entre los NLRs y los TLRs está siendo motivo de numerosos estudios, cuyos resultados han resultado muy dispares y contradictorios. Así, mientras unos autores muestran sinergia entre ambos para mejorar la función de barrera intestinal [63] y en situación inflamatoria [75], otros señalan que NLR y TLR presentan una relación inversa, en la que la activación de un tipo de PRRs inactiva al otro [73].

El presente trabajo se enmarca dentro de la investigación de la fisiología intestinal y de las alteraciones conducentes a la inflamación intestinal crónica, y ha tenido como objetivo primordial analizar la actividad de los receptores NOD1 y NOD2 en relación con la fisiología intestinal mediada por el sistema serotoninérgico, y

determinar la modulación de la expresión de NOD1 y NOD2 mediada por algunos TLRs. De un modo global los resultados obtenidos parecen indicar que ambos receptores regulan la disponibilidad de 5-HT de un modo distinto, lo cual podría contribuir a la fisiología intestinal o a la consolidación de un proceso inflamatorio. Asimismo, la actividad de los TLRs modula la expresión de NOD1 y NOD2, lo cual sugiere una coordinación en la respuesta inmune innata generada por la microbiota en el intestino.

En resumen, la activación de receptores NOD en células epiteliales intestinales produce una disminución de la actividad del transportador SERT, hecho que también ha sido observado por la activación directa de determinados TLR y sustancias inflamatorias. Como consecuencia tendríamos un incremento de los niveles de 5-HT disponibles, amplificando así la respuesta inflamatoria intestinal. Este trabajo muestra que, a la ya demostrada interacción TLRs-SERT, se suma la acción existente entre receptores NOD y SERT, así como entre receptores NODs y TLRs, que seguramente tiene como fin modular y controlar la respuesta inflamatoria en función de los agentes causales de la misma. Asimismo, esta interrelación también puede abrir la puerta a posibles explicaciones de reacciones inflamatorias excesivas o no deseadas, cuando estos mecanismos no se ajustan a un correcto control.

## VI. CONCLUSIONES

Como resultado final de este trabajo podemos extraer las siguientes conclusiones:

- La línea celular Caco-2 expresa el ARNm y la proteína de los receptores NOD1 y NOD2.
- El tratamiento con el agonista de NOD1 produce un efecto dual en células Caco-2, disminuyendo la recaptación de 5-HT en tratamientos a corto plazo y altas dosis, y aumentando siempre la recaptación de 5-HT en tratamientos a largo plazo.
- El tratamiento con el agonista de NOD2 produce una disminución en la recaptación de 5-HT en células Caco-2, fundamentalmente a corto y medio plazo.
- La activación de TLR2, a través de sus dos formas heterodiméricas TLR2/1 y TLR2/6 a alta concentración, produce un aumento de la expresión de NOD1.
- La activación a alta concentración de la forma heterodimérica TLR2/6 aumenta la expresión de NOD2.
- En intestino delgado de ratones TLR2<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup> y TLR2,4<sup>-/-</sup>, aumenta la expresión de ARNm y proteína de NOD1. Sin embargo, en colon de ratones TLR4<sup>-/-</sup> y TLR2,4<sup>-/-</sup> disminuye la expresión de ARNm de NOD1.
- En intestino delgado de ratones TLR2<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup> y TLR2,4<sup>-/-</sup>, aumenta la expresión de ARNm y proteína de NOD2. En colon de ratones TLR2<sup>-/-</sup> también se produce un aumento de la expresión de ARNm de NOD2.

Los resultados obtenidos en el trabajo de investigación desarrollado a lo largo del periodo del máster han sido parcialmente presentados como comunicación en el siguiente congreso científico:

4th Symposium on Veterinary Sciences. Toulouse-München-Zaragoza. Toulouse (Francia). 11-13 de abril de 2013. Layunta E, Latorre E, Mesonero JE, Gimeno A, Grasa L, Castro M, Plaza MA, Alcalde AI. Expression of TLR2, NOD1 and NOD2 in intestinal epithelial cells and its effect on serotonin transporter.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tortora, G.J. and B. Derrickson, *Principios de anatomía y fisiología / Principles of Anatomy and Physiology*. 2006: Editorial Medica Panamericana Sa de.
2. Feldman, M., et al., *Sleisenger & Fordtran enfermedades gastrointestinales y hepáticas: fisiopatología, diagnóstico y tratamiento*. 2004: Editorial Medica Panamericana Sa de.
3. Gartner, L.P., J.L. Hiatt, and J.O. Samperio, *Texto atlas de histología*. 2002: McGraw-Hill Interamericana.
4. Tresguerres, J.A.F., *Fisiología humana*. 1999: McGraw-Hill Interamericana de España.
5. Natividad, J.M. and E.F. Verdu, *Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: pathological and therapeutic implications*. *Pharmacol Res*, 2013. **69**(1): p. 42-51.
6. Fagarasan, S. and T. Honjo, *Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences*. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(1): p. 63-72.
7. Aderem, A. and R.J. Ulevitch, *Toll-like receptors in the induction of the innate immune response*. *Nature*, 2000. **406**(6797): p. 782-7.
8. Flo, T.H., et al., *Involvement of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in cell activation by mannuronic acid polymers*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(38): p. 35489-95.
9. Underhill, D.M. and A. Ozinsky, *Toll-like receptors: key mediators of microbe detection*. *Curr Opin Immunol*, 2002. **14**(1): p. 103-10.
10. Pasare, C. and R. Medzhitov, *Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity*. *Microbes Infect*, 2004. **6**(15): p. 1382-7.
11. Sandor, F. and M. Buc, *Toll-like receptors. I. Structure, function and their ligands*. *Folia Biol (Praha)*, 2005. **51**(5): p. 148-57.
12. Roeder, A., et al., *Induction of nuclear factor- kappa B and c-Jun/activator protein-1 via toll-like receptor 2 in macrophages by antimycotic-treated Candida albicans*. *J Infect Dis*, 2004. **190**(7): p. 1318-26.
13. Takeda, K. and S. Akira, *Toll-like receptors in innate immunity*. *Int Immunol*, 2005. **17**(1): p. 1-14.
14. Tanaka, K., *Expression of Toll-like receptors in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease*. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2008. **2**(2): p. 193-6.
15. Armstrong, L., et al., *Differential expression of Toll-like receptor (TLR)-2 and TLR-4 on monocytes in human sepsis*. *Clin Exp Immunol*, 2004. **136**(2): p. 312-9.
16. Alexopoulou, L., et al., *Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3*. *Nature*, 2001. **413**(6857): p. 732-8.
17. Zhang, G. and S. Ghosh, *Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity*. *J Clin Invest*, 2001. **107**(1): p. 13-9.
18. Hoshino, K., et al., *Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product*. *J Immunol*, 1999. **162**(7): p. 3749-52.
19. Applequist, S.E., R.P. Wallin, and H.G. Ljunggren, *Variable expression of Toll-like receptor in murine innate and adaptive immune cell lines*. *Int Immunol*, 2002. **14**(9): p. 1065-74.

20. Pasare, C. and R. Medzhitov, *Toll-like receptors: balancing host resistance with immune tolerance*. Curr Opin Immunol, 2003. **15**(6): p. 677-82.
21. Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira, *Toll-like receptors*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 335-76.
22. Tabeta, K., et al., *The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9*. Nat Immunol, 2006. **7**(2): p. 156-64.
23. Hornung, V., et al., *Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides*. J Immunol, 2002. **168**(9): p. 4531-7.
24. Hemmi, H., et al., *A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA*. Nature, 2000. **408**(6813): p. 740-5.
25. Ting, J.P., et al., *The NLR gene family: a standard nomenclature*. Immunity, 2008. **28**(3): p. 285-7.
26. Elinav, E., et al., *Regulation of the antimicrobial response by NLR proteins*. Immunity, 2011. **34**(5): p. 665-79.
27. Martinon, F., K. Burns, and J. Tschopp, *The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta*. Mol Cell, 2002. **10**(2): p. 417-26.
28. Correa, R.G., S. Milutinovic, and J.C. Reed, *Roles of NOD1 (NLRC1) and NOD2 (NLRC2) in innate immunity and inflammatory diseases*. Biosci Rep, 2012. **32**(6): p. 597-608.
29. Marina-Garcia, N., et al., *Clathrin- and dynamin-dependent endocytic pathway regulates muramyl dipeptide internalization and NOD2 activation*. J Immunol, 2009. **182**(7): p. 4321-7.
30. Lee, J., et al., *pH-dependent internalization of muramyl peptides from early endosomes enables Nod1 and Nod2 signaling*. J Biol Chem, 2009. **284**(35): p. 23818-29.
31. Viala, J., P. Sansonetti, and D.J. Philpott, *Nods and 'intracellular' innate immunity*. C R Biol, 2004. **327**(6): p. 551-5.
32. Watanabe, T., et al., *NOD1 contributes to mouse host defense against Helicobacter pylori via induction of type I IFN and activation of the ISGF3 signaling pathway*. J Clin Invest, 2010. **120**(5): p. 1645-62.
33. Silva, G.K., et al., *Cutting edge: nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent responses account for murine resistance against Trypanosoma cruzi infection*. J Immunol, 2010. **184**(3): p. 1148-52.
34. Carneiro, L.A., et al., *Nod-like proteins in inflammation and disease*. J Pathol, 2008. **214**(2): p. 136-48.
35. Voss, E., et al., *NOD2/CARD15 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin-2*. J Biol Chem, 2006. **281**(4): p. 2005-11.
36. Kobayashi, K.S., et al., *Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract*. Science, 2005. **307**(5710): p. 731-4.
37. Petnicki-Ocwieja, T., et al., *Nod2 is required for the regulation of commensal microbiota in the intestine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(37): p. 15813-8.
38. Podolsky, D.K., *Inflammatory bowel disease*. N Engl J Med, 2002. **347**(6): p. 417-29.
39. Hugot, J.P., et al., *Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease*. Nature, 2001. **411**(6837): p. 599-603.



40. Rescigno, M. and E.E. Nieuwenhuis, *The role of altered microbial signaling via mutant NODs in intestinal inflammation*. Curr Opin Gastroenterol, 2007. **23**(1): p. 21-6.
41. Biswas, A., T. Petnicki-Ocwieja, and K.S. Kobayashi, *Nod2: a key regulator linking microbiota to intestinal mucosal immunity*. J Mol Med (Berl), 2012. **90**(1): p. 15-24.
42. Xavier, R.J. and D.K. Podolsky, *Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease*. Nature, 2007. **448**(7152): p. 427-34.
43. Gershon, M.D., *Review article: serotonin receptors and transporters -- roles in normal and abnormal gastrointestinal motility*. Aliment Pharmacol Ther, 2004. **20 Suppl 7**: p. 3-14.
44. Coates, M.D., et al., *Molecular defects in mucosal serotonin content and decreased serotonin reuptake transporter in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome*. Gastroenterology, 2004. **126**(7): p. 1657-64.
45. Gershon, M.D., et al., *5-HT receptor subtypes outside the central nervous system. Roles in the physiology of the gut*. Neuropsychopharmacology, 1990. **3**(5-6): p. 385-95.
46. Hansen, M.B. and A.B. Witte, *The role of serotonin in intestinal luminal sensing and secretion*. Acta Physiol (Oxf), 2008. **193**(4): p. 311-23.
47. Hoyer, D., J.P. Hannon, and G.R. Martin, *Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors*. Pharmacol Biochem Behav, 2002. **71**(4): p. 533-54.
48. Salvador, M.T., et al., *5-HT receptor subtypes involved in the serotonin-induced inhibition of L-leucine absorption in rabbit jejunum*. Life Sci, 1997. **61**(3): p. 309-18.
49. Arruebo, M.P., et al., *Effect of serotonin on D-galactose transport across the rabbit jejunum*. Reprod Nutr Dev, 1989. **29**(4): p. 441-8.
50. Plaza, M.A., M.P. Arruebo, and M.D. Murillo, *Evidence for the involvement of 5-HT<sub>4</sub> receptors in the 5-hydroxytryptamine-induced pattern of migrating myoelectric complex in sheep*. Br J Pharmacol, 1997. **120**(6): p. 1144-50.
51. Plaza, M.A., M.P. Arruebo, and M.D. Murillo, *Involvement of somatostatin, bombesin and serotonin in the origin of the migrating myoelectric complex in sheep*. Life Sci, 1996. **58**(23): p. 2155-65.
52. Gill, R.K., et al., *Serotonin inhibits Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange activity via 5-HT<sub>4</sub> receptors and activation of PKC alpha in human intestinal epithelial cells*. Gastroenterology, 2005. **128**(4): p. 962-74.
53. Beattie, D.T. and J.A. Smith, *Serotonin pharmacology in the gastrointestinal tract: a review*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2008. **377**(3): p. 181-203.
54. Costedio, M.M., et al., *Serotonin signaling in diverticular disease*. Journal of Gastrointestinal Surgery, 2008. **12**(8): p. 1439-45.
55. Idzko, M., et al., *The serotonergic receptors of human dendritic cells: identification and coupling to cytokine release*. J Immunol, 2004. **172**(10): p. 6011-9.
56. McDuffie, J.E., et al., *5-hydroxytryptamine stimulates phosphorylation of p44/p42 mitogen-activated protein kinase activation in bovine aortic endothelial cell cultures*. J Cardiovasc Pharmacol, 2000. **35**(3): p. 398-402.
57. Young, M.R. and J.P. Matthews, *Serotonin regulation of T-cell subpopulations and of macrophage accessory function*. Immunology, 1995. **84**(1): p. 148-52.

58. Mendoza, C., et al., *Toll-like receptor 3 activation affects serotonin transporter activity and expression in human enterocyte-like Caco-2 cells*. Cell Physiol Biochem, 2012. **30**(1): p. 187-98.
59. Mendoza, C., et al., *Lipopolysaccharide induces alteration of serotonin transporter in human intestinal epithelial cells*. Innate Immun, 2009. **15**(4): p. 243-50.
60. Chantret, I., et al., *Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: evidence for glucose-dependent negative regulation*. J Cell Sci, 1994. **107** ( Pt 1): p. 213-25.
61. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
62. Kim, J.G., S.J. Lee, and M.F. Kagnoff, *Nod1 is an essential signal transducer in intestinal epithelial cells infected with bacteria that avoid recognition by toll-like receptors*. Infect Immun, 2004. **72**(3): p. 1487-95.
63. Hiemstra, I.H., et al., *Nod2 improves barrier function of intestinal epithelial cells via enhancement of TLR responses*. Mol Immunol, 2012. **52**(3-4): p. 264-72.
64. Stefulj, J., et al., *Serotonin and immune response: effect of the amine on in vitro proliferation of rat lymphocytes*. Neuroimmunomodulation, 2001. **9**(2): p. 103-8.
65. Ghia, J.E., et al., *Serotonin has a key role in pathogenesis of experimental colitis*. Gastroenterology, 2009. **137**(5): p. 1649-60.
66. Soga, F., et al., *Serotonin activates human monocytes and prevents apoptosis*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(8): p. 1947-55.
67. Latorre, E., et al., *IL-10 modulates serotonin transporter activity and molecular expression in intestinal epithelial cells*. Cytokine, 2013. **61**(3): p. 778-84.
68. Belai, A., et al., *Neurochemical coding in the small intestine of patients with Crohn's disease*. Gut, 1997. **40**(6): p. 767-74.
69. Iceta, R., et al., *Molecular characterization and intracellular regulation of the human serotonin transporter in Caco-2 cells*. J Physiol Pharmacol, 2006. **57**(1): p. 119-30.
70. Cario, E., G. Gerken, and D.K. Podolsky, *Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function*. Gastroenterology, 2007. **132**(4): p. 1359-74.
71. Santaolalla, R. and M.T. Abreu, *Innate immunity in the small intestine*. Curr Opin Gastroenterol, 2012. **28**(2): p. 124-9.
72. Dahiya, Y., R.K. Pandey, and A. Sodhi, *Nod2 downregulates TLR2/1 mediated IL1beta gene expression in mouse peritoneal macrophages*. PLoS One, 2011. **6**(11): p. e27828.
73. Watanabe, T., et al., *NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses*. Nat Immunol, 2004. **5**(8): p. 800-8.
74. Jeon, D.I., et al., *NOD1 and NOD2 stimulation triggers innate immune responses of human periodontal ligament cells*. Int J Mol Med, 2012. **29**(4): p. 699-703.
75. van Heel, D.A., et al., *Synergistic enhancement of Toll-like receptor responses by NOD1 activation*. Eur J Immunol, 2005. **35**(8): p. 2471-6.