



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE UN AMBIENTE  
ENRIQUECIDO SOBRE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE IL-18 EN  
UN MODELO MURINO DE COLITIS**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:**

Biol. Victor Emmanuel Osio Becerro

**TUTOR PRINCIPAL**

Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva (IBT-UNAM)

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

Dr. Fernando R. Esquivel Guadarrama  
(Facultad medicina-UAEM)

Dr. José Luis Puente García (IBT-UNAM)

Cuernavaca, Morelos. Febrero, 2020.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



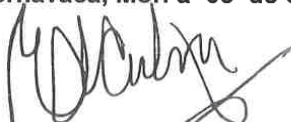
**VICTOR EMMANUEL OSIO BECERRO**

Por medio del presente me permito informar a usted que en la reunión del día 05 de noviembre del 2019 el Subcomité Académico acordó nombrar el siguiente jurado para Examen de Maestría en Ciencias, con **No.de cuenta 517013478** con la tesis titulada, "**Caracterización del efecto de un ambiente enriquecido sobre los niveles de expresión de IL-18 en un modelo murino de colitis**" dirigida por el **Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva**.

<b>Presidente</b>	<b>Dra.</b>	<b>Yvonne Jane Rosenstein Azoulay</b>
<b>Secretario</b>	<b>Dra.</b>	<b>Isabel Gómez Gómez</b>
<b>Vocal</b>	<b>Dra.</b>	<b>María Angélica Santana Calderón</b>
<b>Vocal</b>	<b>Dra.</b>	<b>Vanessa López Guerrero</b>
<b>Vocal</b>	<b>Dr.</b>	<b>Tomas David López Díaz</b>

Sin más por el momento me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cuernavaca, Mor. a 05 de octubre de 2019



**Dr. Edmundo Calva Mercado**  
Coordinador de Docencia

En un plazo máximo de tres semanas, contados a partir del momento en que el sinodal designado oficialmente reciba la tesis, éste deberá dar su voto fundamentado por escrito, el cual será comunicado al comité académico. Si considera que le será imposible cumplir con esta obligación deberá indicarlo al alumno para ser sustituido de inmediato

---

## DEDICATORIA...

Agradezco a Jehová dios por haberme permitido llegar hasta este punto de mi vida, por las experiencias, por la oportunidad de interactuar con diferentes personas y aprender de ellas únicamente las cosas buenas omitiendo los defectos que todos llegamos a tener, así como las cosas que he tenido hasta este punto de existencia. Principalmente, agradezco infinitamente el haber cuidado y bedecido a mi familia y amigos durante todo este tiempo, así como permitir que puedan acompañarme en la culminación de este proceso.

Este trabajo es dedicado a dos increíbles personas, mis padres Verónica Becerro Barrera y Víctor Osío Bonola, por estar conmigo a lo largo de este proceso, por enseñarme que a pesar de que la situación se torne complicada se puede solucionar, por sus consejos, por sus charlas y sabiduría que me guiaron para finalizar este capítulo en mi desarrollo académico y personal. Así mismo, quiero agradecer a mis hermanos Zuriel Osío y Saúl Osío por sus pláticas y tiempo prestado a lo largo de este período, que siempre estuvieron ahí para motivarme cuando lo necesité e impulsarme para tratar de ser un ejemplo para ellos.

---

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo fue desarrollado en el laboratorio de Neuroinmunobiología, del departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología bajo la dirección del Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva y fue apoyado por los donativos IN212316 y AI202316 de la Dirección General de Asuntos del personal Académico, DGAPA, UNAM y de la beca de Maestría (450599) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT.

Agradezco al Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva por aceptarme en su equipo de trabajo y permitirme incursionar en un proyecto de investigación relacionado a las áreas de inmunología y neurobiología. Así mismo, estoy muy agradecido con el Dr. Gustavo por el tiempo, paciencia y guía brindados durante este proceso, así como, los consejos que me brindó en los seminarios de grupo con el fin de mejorar.

A la Dra. Leonor Pérez Martínez por ser una persona con una excelente calidad moral, y por los comentarios y sugerencias que me hizo durante los seminarios de grupo con el objetivo de mejorar el trabajo de investigación.

A la Dra. María Martha Pedraza Escalona por siempre tener tiempo y buena disposición para ayudar cuando se requería, y por los consejos que agilizaron el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Tomás Villaseñor Toledo por su tiempo y apoyo técnico para realizar este trabajo.

A la M.V.z. Graciela Margarita Cabeza Pérez por su tiempo y por el apoyo técnico para realizar este trabajo.

A la Q.B. Geny del Socorro Fierroz Sárate por su tiempo para ayudarme cuando se requería, por su apoyo, amistad, por los buenos consejos, así como momentos de alegría durante el tiempo que pudimos charlar.

A Carmelita por su tiempo y apoyo, por su amistad y buenos consejos, así como momentos de alegría.

## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b> .....	1
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	2
2.1 Ambiente enriquecido.....	2
2.2 Efectos del AE sobre el sistema nervioso central y la periferia.....	3
2.3 Influencia del AE sobre el sistema inmunológico.....	5
2.4 Enfermedades inflamatorias del intestino.....	6
2.5 Etiología de las IBD.....	8
2.5.1 Factores ambientales asociados al desarrollo de IBD.....	8
2.5.2 Variaciones genéticas en el sistema inmunológico relacionadas al desarrollo de IBD.....	9
2.5.3 Factores inmunológicos involucrados en el desarrollo de IBD.....	11
2.6 Familia de IL-1.....	13
2.7 IL-18.....	15
<b>3. ANTECEDENTES/JUSTIFICACIÓN</b> .....	18
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	20
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	20
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	20
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	21
<b>6. RESULTADOS</b> .....	25
6.1 La exposición al AE previene un incremento en el nivel de activación de IL-18 en ratones C57BL/6 y Balb/C durante la inducción de colitis.....	25
6.2 La exposición a condiciones de enriquecimiento modifica los niveles proteicos de procaspasa 1 y caspasa 1 en ratones C57BL/6 y Balb/C.....	29
6.3 La exposición al AE previene la disminución de células calciformes en ratones C57BL/6 y Balb/C.....	32
6.4 La exposición al AE induce un incremento en el nivel de proteína de KLF4 en ratones C57BL/6 y Balb/C.....	36
<b>7. DISCUSIÓN</b> .....	39
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	48
<b>9. PERSPECTIVAS</b> .....	49

<b>10. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>51</b>
------------------------------	-----------



## 1.RESUMEN

El ambiente enriquecido (AE), se define como condiciones habitacionales que promueven una estimulación sensorial, visual, cognitiva, motora y social. Individuos sanos sometidos al AE muestran efectos benéficos a nivel celular y funcional. EL AE promueve la neurogénesis y sinaptogénesis en el hipotálamo, además de prevenir la pérdida de memoria relacionada al envejecimiento y mejora de las capacidades motrices. La influencia del AE se ha estudiado en modelos murinos de distintas neuropatologías, entre las cuales se incluyen: lesiones en el cerebro, síndrome de Down, enfermedad de Huntington, Parkinson y Alzheimer, observándose una mejoría en los síntomas de estas enfermedades. De igual modo, se ha evaluado la influencia del ambiente enriquecido en el desarrollo de enfermedades de la periferia, mostrándose que el AE previene el desarrollo de obesidad y cáncer. Estas patologías poseen un componente en común, el desarrollo de un proceso inflamatorio; proceso característico de otras enfermedades de la periferia corporal, tal es el caso de las enfermedades inflamatorias del intestino, (IBD, por sus siglas en inglés). Las IBD están conformadas por la Enfermedad de Crohn (EC) y la Colitis Ulcerativa (CU), trastornos caracterizados por la pérdida de peso, dolor abdominal, sangrado, diarrea, causadas por el desarrollo de un exacerbado proceso inflamatorio en el tracto gastrointestinal, caracterizado por incremento desregulado de citocinas inflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-18. Datos de nuestro grupo de investigación sugieren el AE es capaz de revertir las alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad a través de la reducción del proceso inflamatorio en el tejido adiposo y en el hipotálamo. Asimismo, mostramos que el AE disminuye el daño al epitelio intestinal y reduce la expresión de IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  en dos modelos murinos de colitis. En el presente trabajo mostramos que el AE previene el incremento de IL-18, resultado de la inducción de colitis con DSS (Sulfato de Dextrano Sódico) o TNBS (ácido trinitrobenceno sulfónico), que simulan la CU o la EC, respectivamente. Adicionalmente, la exposición al AE previene el incremento del nivel de caspasa 1 activa, enzima que promueve la activación de IL-18 en ratones con colitis. Por otra parte, el AE reduce la pérdida de células caliciformes en el colon proximal en ambos modelos de colitis. Congruente con eso, encontramos que el AE modifica la expresión de KLF4, uno de los principales factores transcripcionales asociados a la maduración de células caliciformes, involucradas en el mantenimiento de la homeostasis intestinal. En conjunto estos datos indican que la exposición al AE atenúa el proceso inflamatorio en el colon mediante la modulación en el nivel de activación de caspasa 1 previniendo el incremento en el nivel de IL-18 y de esta manera disminuir la pérdida de células caliciformes relacionada a elevados niveles de IL-18, en dos modelos murinos de colitis.

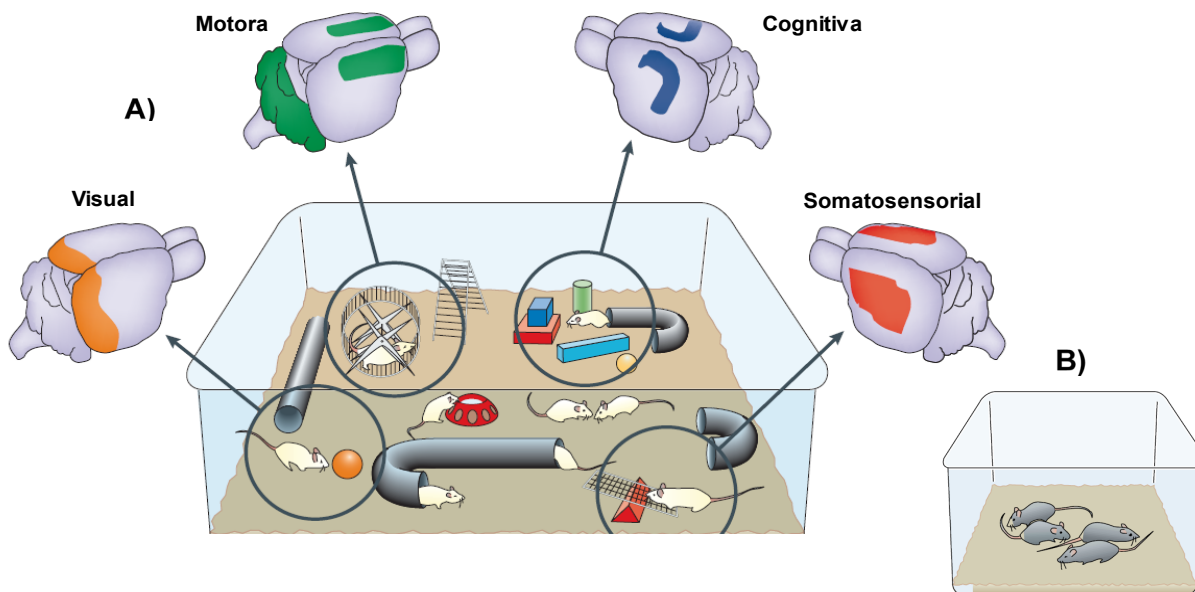
## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Ambiente enriquecido

El cerebro de los mamíferos se genera mediante complejos programas genéticos los cuales aseguran que las células y áreas estructurales se desarrollen adecuadamente en el embrión. Sin embargo, la estimulación sensorial, cognitiva, motora y la interacción con el medio ambiente desde el nacimiento hasta la vejez desempeñan un papel clave en el desarrollo de los circuitos neuronales necesarios para el funcionamiento normal del cerebro. Del mismo modo en que se sumaron esfuerzos para explorar la influencia de factores genéticos y farmacológicos en la anatomía y fisiología cerebral, ha comenzado la búsqueda de modelos de estudio que permitan evaluar los efectos del medio ambiente sobre la función y la disfunción cerebral, ejemplo de esto es el paradigma del ambiente enriquecido.

El paradigma experimental del Ambiente Enriquecido (AE) fue descrito por primera vez por Donald Hebb en 1947. Hebb comparó dos grupos de ratas: ratas a las que se les permitió deambular libremente en el interior de su casa (sometidas a cambios ambientales), contrastándolas con ratas que habían permanecido en jaulas de laboratorio. Hebb, observó que las ratas que habían sido sometidas a cambios ambientales desarrollaron una mejora en la memoria y una mejor capacidad para resolver problemas, en comparación con el grupo que permaneció en jaulas (Hebb, 1947). Posteriormente, Rosenzweig y colaboradores sugirieron que cambios en la complejidad del entorno y la interacción en ese entorno ambiental tienen un impacto en el sistema nervioso central, aumentando el peso y el tamaño del cerebro de ratones expuestos al enriquecimiento ambiental (Rosenzweig, 1962).

El AE se define como las condiciones físicas de un determinado entorno, las cuales promueven en el individuo una estimulación sensorial, visual, cognitiva, motora y social a diferencia de las condiciones de una habitación normal, la cual carece de estos estímulos (Nithianantharajah *et al.*, 2006). El AE involucra cambios en las cajas habitacionales proporcionando oportunidad para la interacción social, percepción de estímulos, ejercicio voluntario y el desarrollo de capacidades cognitivas (Shono *et al.*, 2011) mediante la introducción de objetos que varían en forma, tamaño, textura, olor y color. Ejemplo de los objetos utilizados son: pelotas, ruedas para ejercicio, plataformas de equilibrio y aparatos para escalar. El arreglo de estos objetos se cambia continuamente para mantener el concepto de novedad y complejidad (Reynolds *et al.*, 2010) (Fig. 1). Dado que los elementos que integran el AE promueven una amplia variedad de estímulos en comparación con las condiciones de habitación estándar, se ha tratado de dilucidar si la novedad ambiental: lograda al cambiar periódicamente la ubicación de los objetos introducidos al medio; complejidad ambiental: generada por los objetos que permiten la estimulación visual, olfativa y somatosensorial o la estimulación motora: inducida por un aumento en de las dimensiones de la caja habitacional del AE, es responsable de mediar los efectos benéficos del AE. Debido a que el efecto de cada elemento no se puede aislar fácilmente, se piensa que la interacción de los factores en conjunto es lo que produce los efectos del AE sobre el individuo y no un elemento individual en específico (van Praag *et al.*, 2000; Nithianantharajah *et al.*, 2006).



**Figura 1. Condiciones habitacionales del Ambiente Enriquecido (AE) vs Ambiente normal (AN).** A) Representación esquemática del AE con introducción de objetos que varían en forma, tamaño, textura, olor y color (cuyo ordenamiento se cambia continuamente para mantener el concepto de novedad y complejidad) que promueven una estimulación sensorial, visual, cognitiva, motora y social. B) Condiciones de habitación normal. Tomado y modificado de van Praag *et al.*, 2000 y Nithianantharajah *et al.*, 2006

## 2.2 Efectos del AE sobre el sistema nervioso central y la periferia

La evidencia experimental sugiere que el AE induce diversos efectos en ratones silvestres a nivel del sistema nervioso, desde el nivel celular hasta el nivel conductual (van Praag *et al.*, 2000). A nivel celular, la exposición al AE aumenta la ramificación y la longitud de las dendritas (Connor *et al.*, 1982; Faherty *et al.*, 2003; Leggio *et al.*, 2005), el número de espinas dendríticas y el tamaño de las sinapsis en algunas poblaciones neuronales (Rampon *et al.*, 2000), además de aumentar la neurogénesis del hipocampo y la integración de las células recién formadas a circuitos funcionales (Kempermann *et al.*, 1997 and 2002; Bruel-Jungerman *et al.*, 2005). Adicionalmente, se ha observado que ratones expuestos al AE tienen un aumento en el peso y tamaño del cerebro (Rosenzweig *et al.*, 1962). Respecto al comportamiento conductual, el AE mejora la capacidad de aprendizaje y la memoria (Tang *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003), reduce la pérdida de memoria en animales de edad avanzada (Bennett *et al.*, 2006), además de disminuir la ansiedad e incrementar la actividad exploratoria de ratones expuestos al AE (Schrijver *et al.*, 2002).

Diferentes grupos de investigación han evaluado si la influencia del AE está restringida únicamente a ratones sanos, estudiando los efectos del AE en ratas y en modelos murinos de patologías asociadas al sistema nervioso. Por ejemplo, en un modelo murino de isquemia cerebral, la exposición de ratas con isquemia al AE induce una mayor recuperación de las habilidades motoras en comparación con las ratas con isquemia que habitaron el AN (Ohlsson *et al.*, 1995). De igual modo, ratas a las que se les indujo convulsiones y habitaron en condiciones de enriquecimiento tienen una disminución del nivel de apoptosis en el hipotálamo, un aumento del comportamiento exploratorio y un incremento en la capacidad de aprendizaje (Young *et al.*, 1999). Por otra parte, la exposición al AE reduce la pérdida del volumen cerebral y el número de neuronas así como retrasar el inicio y progresión de la enfermedad de Huntington en modelos murinos de dicha enfermedad (van Dellen *et al.*, 2000). Además, ratones con la enfermedad de Alzheimer sometidos al AE tienen una disminución en los niveles de péptidos  $\beta$  amiloide y un incremento en la actividad de presinilina así como una mejora en la capacidad de aprendizaje y memoria (Jankowsky *et al.*, 2005; Lazarov *et al.*, 2005).

Se ha propuesto que los efectos benéficos del AE sobre el funcionamiento del sistema nervioso central tanto en animales sanos como en animales afectados por patologías asociadas al componente neuronal es mediado por factores neurotróficos. El AE promueve un incremento en los niveles de neurotrofinas como el Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF) y el Factor de Crecimiento Nervioso (NGF) encargados de regular genes relacionados con la proliferación, diferenciación, mantenimiento, plasticidad, supervivencia y función de las neuronas en el sistema nervioso central (Praag *et al.*, 2000; Rampon *et al.*, 2000). Por ejemplo, ratones transgénicos que recapitulan la enfermedad de Huntington y que habitaron en condiciones estándar, los niveles de BDNF disminuyen (aproximadamente un 30%) en comparación con ratones silvestres que también habitaron en condiciones de habitación normal. Sin embargo, la exposición al AE tanto de ratones control como de ratones transgénicos, no solo previene la disminución del nivel de BDNF, sino que aumenta el nivel de BDNF en ratones transgénicos como en ratones control, en comparación con el nivel de BDNF de ratones expuestos a un ambiente estándar (Spires *et al.*, 2004). Por otra parte, Bezard *et al.*, 2003, utilizando un modelo murino de la enfermedad de Parkinson, mediante la administración de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), demostraron que el AE previene la pérdida de neuronas inducida por la administración de MPTP lo cual correlacionaba con un aumento del RNAm de BDNF, en contraste con ratones tratados con MPTP sometidos a condiciones estándar. Adicionalmente, Nahagara *et al.*, 2013, sugieren la importancia de BDNF en el desarrollo de enfermedades asociadas al sistema nervioso. Mediante la administración en la corteza cerebral de un lentivirus que sobreexpresa BDNF en ratones que recapitulan la enfermedad de Alzheimer, observaron una reducción en la pérdida de neuronas además de mejorar la capacidad de aprendizaje y memoria en ratones tratados con el lentivirus en contraste con ratones control, sugiriendo a

BDNF como un candidato para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (Nagahara *et al.*, 2013).

Tomando en cuenta que el AE tiene un impacto benéfico sobre ratones sanos o ratones con enfermedades relacionadas al sistema nervioso central, actualmente la atención se ha centrado en dilucidar si el AE es capaz de ejercer efectos benéficos en otros órganos o sistemas de la periferia corporal. La influencia del AE ha sido evaluada en distintas patologías como cáncer, diabetes y obesidad, reportándose que el AE previene el crecimiento de tumores en modelos murinos de cáncer de colon y melanoma (Cao *et al.*, 2010), así como cáncer de páncreas en donde actúa disminuyendo la expresión de genes involucrados en el funcionamiento de la mitocondria de células tumorales de ratones sometidos al AE (Li *et al.*, 2015). Por otra parte, ratones sometidos al AE aumentan la expresión de genes característicos del tejido adiposo pardo que promueven el cambio de tejido adiposo blanco a tejido pardo el cual disipa el exceso de energía, generando calor, previniendo así la formación y acumulación de tejido adiposo blanco (Cao *et al.*, 2011). Adicionalmente, ratones obesos que presentaban alteraciones en el metabolismo de glucosa y eran sometidos a condiciones de enriquecimiento, la exposición al AE revertía las alteraciones en el metabolismo de la glucosa disminuyendo los niveles de glucosa basal, intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina además de disminuir el proceso inflamatorio dependiente de las vías de JNK e IKK en el tejido adiposo visceral y en el hipotálamo (Díaz de León *et al.*, 2013)

### **2.3 Influencia del AE sobre el sistema inmunológico**

La evidencia sugiere que el sistema nervioso se comunica y regula el sistema inmune a través de la innervación de los órganos linfoides. Así mismo, las células del sistema inmune cuentan con receptores para un amplio conjunto de neurotransmisores producidos por el sistema nervioso. A través de estas moléculas, el sistema nervioso central puede influenciar la respuesta inmune y el proceso inflamatorio (Steinman *et al.*, 2004; Sternberg *et al.*, 2006; de Jonge, 2013; Matteoli *et al.*, 2013). Dado que la influencia del AE promueve diversos cambios en el sistema nervioso y que el sistema nervioso puede modular el sistema inmune, se ha evaluado si la influencia benéfica del AE está restringida únicamente al sistema nervioso o, de igual forma, genera efectos benéficos sobre el sistema inmunológico.

Manteniendo un enfoque inmunológico-neuronal, se evaluó el impacto del AE sobre la microglía (células del sistema inmune localizadas en el cerebro) presente en el hipocampo de ratas, al inducir inflamación mediante la inyección intraperitoneal de LPS. Los resultados sugieren que el grupo de ratas expuestas al AE mostraban una reducción del proceso inflamatorio en respuesta a LPS, específicamente, la expresión de quimiocinas y citocinas (CCL2, CCL3, CXCL2, TNF e IL1 $\beta$ ) disminuyó significativamente en comparación con el grupo de ratas sometidas a condiciones de habitación normal (Williamson *et al.*, 2012). Adicionalmente, Xu *et al.*, 2016, utilizando un modelo murino de la enfermedad de Alzheimer, mostraron el impacto del AE sobre la neuroinflamación generada por la microglía en respuesta a la

inyección intracerebroventricular de péptido amiloide  $\beta$  (principal componente de las placas amiloides en la enfermedad de Alzheimer), sugiriendo que el AE modifica la respuesta de la microglía en el giro dentado del hipocampo disminuyendo la expresión de CCL3, CCL4 y TNF.

Los efectos del AE sobre el sistema inmunológico no están restringidos a células inmunes presentes en el cerebro. Estudios recientes señalan que el AE es capaz de estimular en leucocitos de la periferia la producción de exosomas con elevadas cantidades de miRNAs, en particular el miR-219. La exposición de cultivos celulares de hipocampo a exosomas con elevados niveles de miR-219 generaron un aumento en la concentración de MBP (Myelin Basic Protein), proteína componente de la mielina, importante en la transmisión de los impulsos nerviosos. Lo anterior sugiere que la influencia del AE no está restringida a células inmunes localizadas dentro del sistema nervioso, sino que su influencia puede extenderse más allá del cerebro (Pusic *et al.*, 2016). Por otra parte, Benaroya *et al.*, 2004 demostraron que el AE potencia significativamente la actividad citotóxica de células asesinas naturales (NK, del inglés Natural Killer) fundamentales en la erradicación de células tumorales o infectadas por virus. Consistente con lo anterior, Cao *et al.*, 2010, evidenciaron un incremento en la capacidad citotóxica de células NK y linfocitos T CD8<sup>+</sup> de ratones sometidos al AE contra células de cáncer de melanoma y cáncer de colon, lo que correlaciona con una disminución del volumen del tumor en contraste con ratones expuestos a condiciones de habitación estándar. Lo anterior indica el efecto del AE sobre dos de los sistemas más importantes que conforman al organismo, el sistema nervioso y el sistema inmune, observándose que el efecto del AE no está restringido al componente neuronal, sino que el AE también influye a nivel celular el sistema inmunológico.

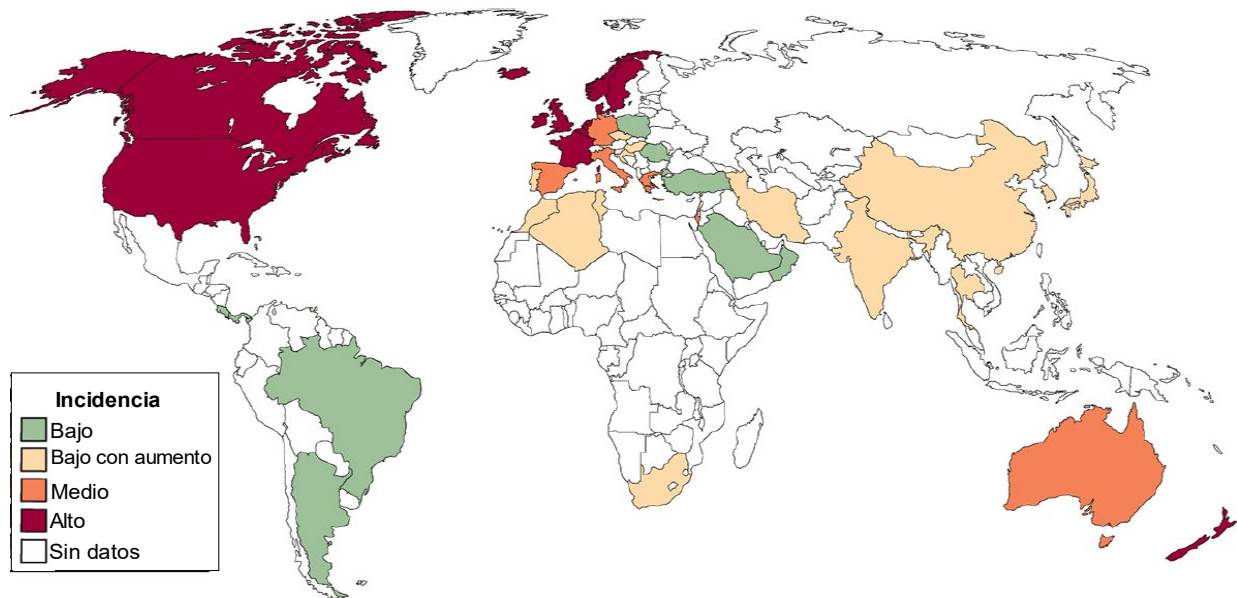
## **2.4 Enfermedades inflamatorias del intestino**

El tracto gastrointestinal de los mamíferos está continuamente expuesto a la microbiota comensal y a microorganismos patógenos siendo vulnerable a diversas enfermedades, entre las que se encuentran las Enfermedades Inflamatorias del Intestino, por sus siglas en inglés (IBD). Las IBD son enfermedades que comienzan entre los 20 y 40 años y se mantienen durante toda la vida, caracterizándose por períodos de remisión y recaída, progresión de la enfermedad, hospitalizaciones y cirugía (Langholz *et al.*, 1997; Abraham *et al.*, 2009; Rigoli *et al.*, 2014). Las IBD están conformadas por dos patologías, la Enfermedad de Crohn (EC) y la Colitis Ulcerativa (CU) las cuales afectan el tracto gastrointestinal y la mucosa del colon.

Durante el desarrollo de las IBD hay una respuesta inmune exacerbada a la microbiota presente en la mucosa intestinal y a componentes estructurales de las células que forman el intestino del hospedero. La EC y CU poseen características similares, comparten una respuesta inmune hiperactiva, sangrado gastrointestinal, pérdida de peso, dolor abdominal y diarrea, pero difieren en el sitio de la patología inflamatoria. La EC se caracteriza por una inflamación discontinua, una inflamación superficial que se extiende a la profundidad de la submucosa intestinal y puede

localizarse en cualquier zona del tracto gastrointestinal. En contraste, la CU se distingue por desarrollar una inflamación continua en la mucosa del intestino grueso en regiones del intestino densamente colonizadas por bacterias, y se localiza sobre la superficie de la mucosa sin afectar la submucosa intestinal (Podolsky., 2002).

La EC y CU son enfermedades de una sociedad moderna, su frecuencia en los países subdesarrollados y desarrollados ha ido en aumento debido a cambios en la dieta y el estilo de vida asociados con la modernización. La incidencia y prevalencia de la CU y EC varía de acuerdo a la región estudiada, observándose de forma general una mayor incidencia y prevalencia de CU que la EC. Reportes recientes han indicado un incremento a nivel global en el número de casos de IBD donde la mayor incidencia y prevalencia se registra en Europa y América del Norte, en contraste, la menor incidencia y prevalencia se registra en el continente asiático (Figura 2) (Rubin *et al.*, 2000; Loftus, 2004; Bernstein *et al.*, 2006; Kappelman *et al.*, 2007; Thia *et al.*, 2008; Molodecky *et al.*, 2012). En el caso de Latinoamérica, se ha registrado un aumento de la incidencia y prevalencia de las IBD en países como Brasil, Uruguay, Puerto Rico y México. En México, un estudio que abarco del año 1987-2006 demostró un aumento en el número de pacientes con CU en la última década, con 76 pacientes diagnosticados por año comparada con la década anterior, con promedio de 28 pacientes por año (Loftus *et al.*, 2004; Yamamoto *et al.*, 2009; Bosques *et al.*, 2011; Farrukh *et al.*, 2014).



**Figura 2. Incidencia de las IBD alrededor del mundo.**

Las barras de color presentan la frecuencia de las IBD a nivel mundial. Tomado y modificado de Cosnes *et al.*, 2011.

## 2.5 Etiología de las IBD

A pesar de que la EC y la CU poseen una amplia distribución, poco se conoce acerca de los factores que predisponen a la susceptibilidad de dichas enfermedades. Las IBD son consideradas como enfermedades multifactoriales en las que participan factores ambientales, variaciones genéticas relacionadas a la respuesta inmune, factores inmunológicos y recientemente factores microbianos.

### 2.5.1 Factores ambientales asociados al desarrollo de IBD

Los factores ambientales están involucrados en el desarrollo de IBD y su creciente incidencia alrededor del mundo. Estudios epidemiológicos, experimentales y clínicos sugieren una asociación entre las IBD y factores ambientales que incluyen el tabaquismo, la dieta y el estrés (Danese *et al.*, 2004). Diversos estudios sugieren al tabaquismo como el factor de riesgo más fuertemente vinculado al desarrollo de IBD (Rubin *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2000). Curiosamente, el tabaquismo ejerce un efecto opuesto en la EC y CU. El hábito de fumar aumenta la susceptibilidad a la EC, sin embargo, la interrupción en la frecuencia de fumar mejora el curso de la enfermedad. En contraste, las personas que desarrollan CU suelen ser no fumadores y abandonar el hábito de fumar aumenta el riesgo de desarrollar CU (Parkes *et al.*, 2014). Diversos estudios sugieren que el tabaquismo modifica la síntesis de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias (Hagiwara *et al.*, 2001; Meuronen *et al.*, 2008, Gonçalves *et al.*, 2011). Estudios en modelos murinos han revelado que la nicotina puede agravar la colitis en un modelo de inducción de colitis con TNBS (ácido trinitrobenceno sulfónico) con un aumento del porcentaje de células Th17 (Galitovskiy *et al.*, 2011). En contraste, la exposición al humo de cigarro en dos modelos de inducción de CU (Sulfato de Dextrano Sódico, DSS, y oxazolona) disminuye la inflamación en el colon, asociado a la reducción en la expresión de citocinas tipo Th1 y Th17, entre las cuales encuentran TNF, IFN- $\gamma$  e IL-17 (Montbarbon *et al.*, 2013).

Otro factor relacionado con la susceptibilidad a las IBD son los hábitos alimenticios (Hou *et al.*, 2011). Una elevada ingesta de azúcar refinada, carnes rojas (Jantchou *et al.*, 2010; Le Leu *et al.*, 2013) y grasas (Ananthakrishnan *et al.*, 2013) (conocida como dieta occidental) se asocia con la susceptibilidad a la EC o CU. En cambio, el consumo de frutas, fibra y verduras disminuyen el riesgo de padecer IBD (Sonnenberg., 1988; Reif *et al.*, 1997). La dieta occidental promueve un aumento de la inflamación intestinal al causar disbiosis (alteraciones del microbioma intestinal) (Devkota *et al.*, 2012) acompañada de una disfunción de la barrera intestinal (Martínez-Medina *et al.*, 2013). Por ejemplo, una dieta basada en proteínas de origen animal y ácidos grasos poliinsaturados promueve el desarrollo de CU al favorecer un aumento en las poblaciones de *Bacteroides sp.* y una reducción de las poblaciones de *Prevotella sp.*, sugiriendo la importancia de la dieta en la configuración de la microbiota intestinal y su influencia en el desarrollo de enfermedades asociadas al tracto gastrointestinal (Tjonneland *et al.*, 2009; Wu *et al.* 2011; De Silva *et al.*, 2014).



Adicionalmente, la exposición durante un periodo prolongado de tiempo al estrés induce el desarrollo y exacerbación de CU al inducir alteraciones en el eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA) promoviendo una supresión de la respuesta inmune. Asimismo, otras afectaciones debido al estrés crónico y su impacto en la respuesta inmune ha sido el desarrollo de cáncer. La exposición a estrés crónico reduce la actividad inmunológica de células de origen mieloide e incrementa la expresión de catecolaminas que estimulan un microambiente favorable para el desarrollo de tumores (Levenstein *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2015). A pesar de que los factores mencionados anteriormente tienen poca relación entre sí, un factor se encuentra presente en todos ellos: el establecimiento de un ambiente inflamatorio, sugiriendo que se requiere una fina modulación del sistema inmunológico para lograr una homeostasis e impedir el desarrollo de diferentes patologías a nivel del sistema gastrointestinal.

### **2.5.2 Variaciones genéticas en el sistema inmunológico relacionadas al desarrollo de IBD**

La primera observación de un componente genético involucrado en el desarrollo de IBD proviene del estudio de una familia con IBD, los hijos de madres afectadas por IBD tienen mayor probabilidad a desarrollar la enfermedad, lo que indica que factores de herencia genética están relacionados con las IBD (Akolkar *et al.*, 1997). Los estudios de asociación de genoma (GWAS) han sido útiles para identificar variantes genéticas asociadas a la EC o CU. Por ejemplo, un estudio de GWAS que evaluó aproximadamente 75,000 pacientes con EC y UC identificó loci de riesgo para el desarrollo de ambas enfermedades, de los cuales específicamente 23 están relacionados con CU y 30 para la EC (Jostins *et al.*, 2012). Los loci de riesgo participan en el mantenimiento de la función de la barrera intestinal, la detección de patógenos, la respuesta al estrés oxidativo, la apoptosis, la autofagia, la vía de señalización de IL-23 y la diferenciación de células T helper 1 y 17 (Th1 y Th17) (McGovern *et al.*, 2010; Anderson *et al.*, 2011).

Desde el punto de vista inmunológico, las asociaciones genéticas involucradas en la susceptibilidad a las IBD se pueden dividir en genes que contribuyen a la respuesta inmune innata y respuesta inmune adaptativa. En la inmunidad innata, se ha asociado a la EC con polimorfismos en *NOD2* y los genes *ATG16L1* y *IRGM*, relacionados con el proceso de autofagia. Las alteraciones en el gen *NOD2* (que codifica la proteína 2 del dominio de oligomerización de unión a nucleótidos o también conocida como *CARD15*) fue de los primeros factores de riesgo identificados para la EC (Cho., 2008). Esto fue gracias a múltiples estudios que analizaron poblaciones de ascendencia europea con elevada incidencia y prevalencia de IBD, observándose que modificaciones de *NOD2* en la población europea están ausentes en la población africana o asiática, sugiriendo que algunos genes de susceptibilidad a las IBD se comparten entre las poblaciones mientras que otros no (Croucher *et al.*, 2003; Leong *et al.*, 2003; Kugathasan *et al.*, 2005).

NOD2 es un receptor de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos que funciona como un sensor intracelular para peptidoglicano bacteriano y muramil dipéptido (MDP) que culmina en la activación del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (Inohara *et al.*, 2003; Kobayashi *et al.*, 2005). Se han descrito tres polimorfismos en *NOD2* (Arg702Trp, Gly908Arg y Leu1007fsinsC) asociados con la susceptibilidad a la EC, estos polimorfismos se encuentran dentro o cerca de la zona de repeticiones ricas en leucina de la proteína NOD2, dominio encargado de detectar ligandos bacterianos (Hugot *et al.*, 2001; Leong *et al.*, 2003). Los polimorfismos en *NOD2* y su asociación con la EC han sugerido que el desarrollo de la EC se debe a que el hospedero tiene una respuesta inmune desregulada a las bacterias presentes en el intestino. El mecanismo preciso generado por las variaciones de NOD2 y la susceptibilidad a la EC sigue bajo investigación. Sin embargo, se han postulado diversos mecanismos, por ejemplo, alteraciones en la tolerancia hacia la estimulación bacteriana. En individuos sanos el intestino está expuesto constantemente a bacterias, a pesar de esta exposición no se genera una hiperactivación de la vía de señalización de NOD2. En contraste, en individuos con mutaciones en *NOD2* hay un aumento en la señalización mediada por NF- $\kappa$ B lo que promueve un entorno inflamatorio mediado por células Th1, propiciando condiciones para el desarrollo de colitis (Hedl *et al.*, 2007). Otro mecanismo sugerido es la deficiencia de NOD2 para controlar el incremento en la población de patógenos, ya que la inoculación de bacterias vía oral a ratones *NOD2*<sup>-/-</sup> (por ejemplo, *Listeria monocytogenes*) resultó en un aumento en la carga bacteriana en el bazo e hígado en ratones *NOD2*<sup>-/-</sup> con respecto a la carga bacteriana en ratones silvestres (Kobayashi *et al.*, 2005). De la misma manera estudios *in vitro* con células Caco2 transfectadas con un plásmido que codifica para una variante no funcional de NOD2 muestran un aumento en la carga bacteriana, en contraste con células Caco2 transfectadas con el plásmido que contiene el gen *NOD2* funcional, lo que demuestra la importancia de NOD2 en la eliminación de bacterias intracelulares (Hisamatsu *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2008). Finalmente, estudios en ratones *NOD2*<sup>-/-</sup> sugieren que NOD2 es necesario para mantener un nivel basal en la síntesis de  $\alpha$ -defensinas por las células de Paneth y así prevenir el desarrollo de la EC, ya que pacientes con la EC presentan un aumento en la abundancia de *E. coli* enteroadherente debido a la disminución en las concentraciones de  $\alpha$ -defensinas, principalmente  $\alpha$ -defensina 5 y 6 (Ogura *et al.*, 2003; Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004; Wehkamp *et al.*, 2004; Wehkamp *et al.*, 2005; Simms *et al.*, 2008; Zelinkova *et al.*, 2008).

A demás de NOD2 se han identificado genes relacionados con el proceso de autofagia como *ATG16L1* (autophagy related 16-like 1) e *IRGM* (immunity-related GTPase family M), relacionados a la susceptibilidad de la EC. La presencia de polimorfismos identificados mediante GWAS en *ATG16L1* e *IRGM* se asocian a susceptibilidad a la EC. *ATG16L1* se expresa ampliamente en células del epitelio intestinal, células presentadoras de antígenos y células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, asociándose a funciones relacionadas al procesamiento de antígenos y degradación de patógenos intracelulares (Hampe *et al.*, 2006; Parkes *et al.*, 2007). La autofagia participa en el reciclaje de orgánulos, proteínas dañadas y en la restricción del crecimiento de microorganismos patógenos. Mutaciones en

*ATG16L1* e *IRGM* reducen el nivel de eliminación y promueven condiciones para el crecimiento intracelular de patógenos bacterianos (Amano *et al.*, 2006). Por ejemplo, estudios en células epiteliales del intestino indican que la desactivación de *ATG16L1* o *IRGM* anula la capacidad de eliminar patógenos intracelulares como *Salmonella typhimurium* (Rioux *et al.*, 2007) o *Mycobacterium tuberculosis* (Singh *et al.*, 2006), respectivamente. La presencia de mutaciones en *NOD2*, *ATG16L1* e *IRGM* indican que alteraciones en el procesamiento intracelular de bacterias promueven el establecimiento de la EC.

Por otro lado, el proceso de autofagia puede regular la activación del inflamasoma (complejo multiproteico encargado de la activación de procaspasa 1, enzima involucrada en la activación de IL-1 $\beta$  e IL-18), dando inicio a una respuesta inflamatoria a patógenos y/o activadores endógenos, induciendo una forma proinflamatoria de muerte celular llamada piroptosis (Miao *et al.*, 2011). Saitoh *et al.*, sugieren que la autofagia regula negativamente la activación del inflamasoma. Experimentos en ratones *Atg16L1*<sup>-/-</sup> indican que la ausencia de *ATG16L1* incrementa la activación de procaspasa 1, induciendo una mayor producción de IL-1 $\beta$  e IL-18 en macrófagos posterior a la exposición de LPS. De igual forma, haciendo uso de 3MA (3-methyladenine) inhibidor químico de la autofagia, la síntesis de IL-1 $\beta$  es significativamente mayor en macrófagos expuestos a LPS/3MA en comparación con el nivel de IL-1 $\beta$  de macrófagos expuestos únicamente a LPS; indicando que la autofagia limita la activación del inflamasoma y a su vez la producción de IL-1 $\beta$  (Saitoh *et al.*, 2008). Otro mecanismo relacionado el control de la activación del inflamasoma por la autofagia es la eliminación de componentes del inflamasoma mediante la ubiquitinación. La ubiquitinación de ASC (Inflammasome Adaptor Protein Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing CARD) mediada por p62, moviliza a ASC al proteosoma para su degradación (Shi *et al.*, 2012). Asimismo, Zhou *et al.*, proponen que la eliminación de mitocondrias dañadas y por ende la liberación de ROS (ReactiveOxygen Species) y ADN mitocondrial al citoplasma disminuye la activación del inflamasoma NLRP3 y la producción de IL-1 $\beta$  e IL-18, con ello previniendo el inicio de un proceso inflamatorio (Zhou *et al.*, 2010).

### **2.5.3 Factores inmunológicos involucrados en el desarrollo de IBD**

Alteraciones de la respuesta inmune, específicamente una desregulación en la producción de citocinas por células Th1, Th2 y Th17 como TNF, IFN, IL-12; IL-4, IL-10, IL-13; IL-17 e IL-23 respectivamente, intervienen en la susceptibilidad a las IBD (Neurath *et al.*, 2002; Yen *et al.*, 2006; Neuman *et al.*, 2007). En condiciones normales, la mucosa intestinal se encuentra en un estado de inflamación controlada. Sin embargo, durante el desarrollo de un proceso inflamatorio hay un aumento en los niveles de TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12, IL-17 e IL-18, que de no ser controlado, aumenta el nivel de infiltración de neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, células NK, células B y células T las cuales producen quimiocinas y citocinas que perpetúan la respuesta inflamatoria (Jump *et al.*, 2004; Strober *et al.*, 2007).

Estudios clínicos indican la participación de TNF en el desarrollo de IBD (Olesen *et al.*, 2016). TNF es producido por monocitos y macrófagos activados, mastocitos, células NK, linfocitos T, neutrófilos y células del endotelio (Bradley *et al.*, 2008). TNF ejerce efectos proinflamatorios mediante la interacción con los receptores TNFR1 y TNFR2, promoviendo el aumento de IL-1, IL-6 e IFN- $\gamma$ , debilitamiento de la barrera del intestino e induciendo apoptosis en células epiteliales del intestino en pacientes con IBD (Spoetl *et al.*, 2007; Koch *et al.*, 2012). Pacientes con EC tratados con infliximab (anticuerpos anti-TNF) tienen una disminución en la patología de la enfermedad, relacionado al aumento en la actividad de células Treg y una reducción en los niveles de citocinas inflamatorias (Rutgeerts *et al.*, 2005; Ford *et al.*, 2011; Guide *et al.*, 2013). Adicionalmente, estudios en ratones Tnf  $\Delta^{ARE}$  (generan un exceso de TNF) desarrollan inflamación intestinal transmural característica de la EC (Kontoyiannis *et al.*, 1999), indicando que ratones que albergan un transgen de TNF desarrollan una exacerbación de la patología asociada a colitis (Armaka *et al.*, 2008).

Otra citocina reportada con elevadas concentraciones en pacientes con IBD es IL-6. La IL-6 regula la respuesta de fase aguda, diferenciación de monocitos a macrófagos, proliferación y resistencia a apoptosis de células T (Kishimoto, 2005). En modelos animales de colitis experimental, la IL-6 es principalmente producida por macrófagos y células T CD4<sup>+</sup> de la lámina propia, participando en la inducción de células Th17 e inhibición en la diferenciación de células Treg (Diehl *et al.*, 2002; Naugler *et al.*, 2008). Estudios en modelos murinos de la EC en donde utilizaron anticuerpos anti-IL-6R (receptor de IL-6) para bloquear la señalización de IL-6, reducen el proceso inflamatorio en el intestino inducido por la administración de TNBS. El efecto antiinflamatorio asociado al uso de anti-TNF se relaciona con el incremento del nivel de apoptosis de células mononucleares y células T de la lámina propia productoras de IFN- $\gamma$ , TNF e IL 1 $\beta$  que contribuyen a la perpetuación de la inflamación intestinal (Atreya *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2009; Yamamoto *et al.*, 2012).

La participación de IL-12 también ha sido relacionada en la fisiopatología de la EC. Diversos estudios reportan un incremento de IL-12 en la mucosa de pacientes con EC, asimismo macrófagos aislados de pacientes con la EC producen mayores cantidades de IL-12 *ex vivo*, sugiriendo la participación de IL-12 en la perpetuación de la inflamación intestinal en la EC (Monteleone *et al.*, 1997). El incremento en el nivel de IL-12 no solo ha sido reportado en estudios clínicos, en modelos murinos de inducción de colitis se ha mostrado un incremento en el nivel de IL-12 en ratones administrados con TNBS en comparación con los ratones control. Consistente con lo anterior, en este modelo, el uso de anticuerpos anti-IL-12p40 reduce la respuesta inflamatoria intestinal debido a la disminución en la respuesta mediada por células T, generando menores niveles de citocinas Th1, principalmente IFN- $\gamma$  (Grohmann *et al.*, 2001). Aunado a lo anterior, estudios clínicos que emplearon anticuerpos anti-IL-12 p40 mostraron una reducción de la patología en la EC, debido a la disminución en la síntesis de TNF e IFN- $\gamma$  en células T CD4<sup>+</sup> de lámina propia (Neurath *et al.*, 1995; Mannon *et al.*, 2004).

Por otro lado, la participación de IL-23 e IL-23R ha sido sugerida en la patogénesis de enfermedades mediadas por el sistema inmunitario, incluidas las IBD (Duerr *et al.*, 2006; Rivas *et al.*, 2011). IL-23 se compone de las subunidades p19 (IL23A) y p40 (IL12B), es secretada por células dendríticas intestinales y promueve la expansión de células TH17 (Tang *et al.*, 2012; Eken *et al.*, 2014). Estudios clínicos muestran un aumento de IL-23 e IL-17 en pacientes con la EC en contraste con pacientes control. En modelos murinos la sobreexpresión de IL-23A resulta en la inflamación intestinal (Wiekowski *et al.*, 2001; Hue *et al.*, 2006). Otro ejemplo de la participación de IL-23 se observa en ratones deficientes en IL-10 que desarrollan inflamación intestinal espontánea la cual disminuye al administrar anticuerpos anti-IL-23 (Elson *et al.*, 2007).

Adicionalmente se ha mostrado que la IL-17 juega un papel importante en la patogénesis de las IBD. La detección de IL-17 no es frecuente en el colon de personas sanas, en contraste, pacientes con la EC tienen un nivel significativamente más elevado de IL-17 (Fujino *et al.*, 2003). En adición, la ausencia del receptor de IL-17, la neutralización de IL-17 o la eliminación de los factores de transcripción que promueven la generación de células Th17 (como ROR $\gamma$ t y Stat3) genera resistencia al desarrollo de CU o EC en modelos murinos de colitis (Zhang *et al.*, 2006; Durant *et al.*, 2010). Finalmente, estudios de GWAS han demostrado que polimorfismos en genes implicados en la regulación de células Th17, por ejemplo, IL6, STAT3, ROR $\gamma$ t e IL23R promueven el desarrollo de IBD (Song *et al.*, 2016; Kuwabara *et al.*, 2017).

## 2.6 Familia de IL-1

A pesar de que las citocinas mencionadas previamente han sido relacionadas con el establecimiento de un proceso inflamatorio característico de las IBD, diversos reportes señalan la contribución de miembros de la familia de IL-1, particularmente IL-18 e IL-1, involucradas en el desarrollo de la patogénesis de la EC y CU. IL-1 pertenece a una super familia de citocinas, que lleva su nombre, estas citocinas ejercen efectos biológicos asociados con infección, inflamación y autoinmunidad. La super familia IL-1 está integrada por IL-1 (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), IL-18, IL-33, IL-36 e IL-37. Estas citocinas están relacionadas entre sí por su origen, la estructura del receptor y transducción de señales (Arend *et al.*, 2008; Dinarello *et al.*, 2010). Los receptores de esta familia comparten una arquitectura similar, compuesta por tres dominios similares a inmunoglobulina en sus dominios externos y un dominio intracelular Toll/IL-1R (TIR). El inicio de la vía de señalización de estas citocinas requiere dos receptores, un receptor específico primario y un receptor accesorio. El receptor primario es responsable de la unión específica a la citocina mientras que el receptor accesorio, no se une a la citocina, sino que se asocia con los complejos binarios preensamblados (la citocina y el receptor primario) (O'Neill *et al.*, 2008). La unión de las citocinas a sus respectivos receptores da como resultado un complejo ternario de señalización que conduce a la dimerización de los dominios TIR de los dos receptores, iniciando la señalización intracelular, activando las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) y NF- $\kappa$ B lo cual induce la expresión de otras citocinas inflamatorias (Dinarello *et al.*, 2009).

Para que las citocinas de la familia IL-1 puedan unirse a sus receptores e iniciar sus vías de señalización deben de pasar por un proceso de activación para ser biológicamente funcionales, tal es el caso de IL-1 e IL-18, las cuales son activadas por el complejo multiproteico conocido como inflamasoma. Los inflamasomas son complejos citosólicos conformados por una molécula receptora, un receptor NOD (NLR), también puede ser un receptor de AIM2, ALR (AIM-Like Receptor, AIM: Absent in Melanoma); una molécula adaptadora conocida como proteína asociada a la apoptosis (Apoptotic-Associated Speck-like Protein, ASC) la cual contiene un dominio de activación y reclutamiento de caspasas (CARD); y una molécula efectora, procaspasa 1 que se procesa autocatalíticamente a caspasa 1 que actúa como molécula efectora (Martinon *et al.*, 2002; Rathinam *et al.*, 2012).

La activación de la inflamación es desencadenada por diversas señales las cuales inducen la escisión autocatalítica de procaspasa 1 en su forma activa, caspasa 1, responsable de la activación y secreción de IL-1 $\beta$  e IL-18 (Schroder *et al.*, 2010). Los productos generados por la actividad de la caspasa 1 son potentes citocinas proinflamatorias con diversas actividades en células inmunes y no inmunes. Por ejemplo, inducen la expresión de moléculas de adhesión celular, la síntesis de óxido nítrico y la producción de quimiocinas que reclutan y activan a células fagocíticas. De este modo, los inflamasomas activados desencadenan un inicio rápido de la respuesta inflamatoria (Strowig *et al.*, 2012). Adicionalmente, caspasa 1 induce una forma de muerte celular denominada piroptosis, proceso que limita la replicación de patógenos intracelulares e induce la liberación de IL-1 $\beta$  e IL-18 atrayendo a células fagocíticas para atacar a los patógenos liberados (Miao *et al.*, 2011).

La IL-1 $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  son codificadas por diferentes genes, pero son funcionalmente similares. Ambas citocinas se unen al receptor de IL-1 tipo I (IL-1RI), lo que conduce al reclutamiento de la proteína accesoria IL-1R (IL-1RAcP) y la formación del complejo IL-1/ IL-1RI/ IL-1RAcP. Enseguida se agrega la proteína adaptadora MyD88 al dominio TIR para culminar en la activación de NF- $\kappa$ B, el cual trasloca al núcleo activando diversos genes con actividad inflamatoria (Sims *et al.*, 2010). Aunque IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  exhiben actividades biológicas similares, difieren en algunas características como: IL-1 $\alpha$  se localiza generalmente en el citosol, pudiendo también secretarse al medio extracelular. En contraste, IL-1 $\beta$  primero necesita ser activada y posteriormente se secreta al medio extracelular (Keller *et al.*, 2008). Una vez secretada IL-1 $\beta$  regula las respuestas sistémicas y locales a las infecciones, generando fiebre, activando linfocitos y promoviendo la transmigración de leucocitos a los sitios de lesión o infección, induciendo la proliferación y supervivencia de células T y B, así como inducir en macrófagos, neutrófilos, fibroblastos y células de músculo liso la síntesis de prostaglandinas, proteasas y otras citocinas inflamatorias (Ben- Sasson *et al.*, 2009; Dinarello *et al.*, 2009).

Los efectos biológicos de la IL-1 están regulados por inhibidores, entre los cuales se encuentra el receptor antagonista de IL-1 (IL-1Ra) que se une al IL-1RI y previene la actividad de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Arend *et al.*, 1994; Burger *et al.*, 1995). Otro receptor antagonista de la actividad de IL-1 $\beta$  es el receptor de IL-1 tipo II (IL-1RII), el cual funciona como un receptor señuelo atrayendo a IL-1 $\beta$  previniendo la señalización generada por IL-1 $\beta$ . debido a la ausencia de un dominio citoplásmico por lo que el

reclutamiento de MyD88 no se produce (Symons *et al.*, 1991 y 1995). Adicionalmente, existe el receptor accesorio de IL-1 (IL-1RAc) que tiene la capacidad de asociarse a IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , actuando como un potente inhibidor de IL-1 (Smith *et al.*, 2003). Por lo tanto, es necesario mantener un equilibrio entre el nivel de producción de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  y la cantidad de antagonistas para prevenir enfermedades asociadas al componente inflamatorio (Ligumsky *et al.*, 1990). Diversos reportes sugieren que IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  participan activamente en la generación de inflamación intestinal, observándose un aumento en la producción de IL-1 por células mononucleares aisladas de la lámina propia, principalmente macrófagos, de pacientes con IBD correlacionando un elevado nivel de IL-1 con un mayor grado de inflamación y necrosis de la mucosa intestinal (Mahida *et al.*, 1989).

Por otra parte, estudios enfocados en la influencia del IL-1Ra en las IBD muestran un desbalance en la proporción IL-1Ra/IL-1 en pacientes con EC y CU en comparación con los sujetos control, sugiriendo que una disminución en la producción de IL-1Ra puede contribuir con la gravedad de la enfermedad (Casini-Raggi *et al.*, 1995). Asimismo, se ha demostrado la influencia de IL-1 en la generación de colitis en modelos animales. Cominelli *et al.*, 1990 indican que niveles elevados de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  correlacionaban con el grado de inflamación en la mucosa intestinal de conejos a los cuales se les había inducido colitis y que el bloqueo de los receptores de IL-1 reducen la respuesta inflamatoria asociada a colitis experimental. Adicionalmente, Cominelli *et al.*, 1992 señalan la importancia de los antagonistas de IL-1 en la reducción de inflamación intestinal al administrar de forma exógena IL-1R, resultando en la disminución de la patología asociada a colitis. Finalmente, la eliminación genética de caspasa 1, enzima involucrada en el procesamiento de IL-1 $\beta$ , disminuye el daño generado por la administración de DSS, señalando la participación de IL-1 en la inflamación intestinal.

## 2.7 IL-18

La IL-18, fue inicialmente conocida como el factor inductor de IFN $\gamma$  en modelos de infección con *Propionibacterium acnes* al observar su influencia sobre los niveles de IFN $\gamma$  (Okamura *et al.*, 1995). Esta interleucina se expresa en todos los linajes celulares, tanto hematopoyéticos como no hematopoyéticos (células de la microglía (Prinz *et al.*, 1999), células dendríticas (Stoll *et al.*, 1998) células de Kupffer, células de la corteza suprarrenal (Conti *et al.*, 1997), células sinoviales, macrófagos, queratinocitos (Stoll *et al.*, 1997), osteoblastos (Udagawa *et al.*, 1997), y fibroblastos); en el intestino IL-18 es producida principalmente por el epitelio intestinal, macrófagos y células dendríticas (Gracie *et al.*, 2003).

La IL-18 se une al complejo IL-18R (expresado en macrófagos, neutrófilos, linfocitos T y B, células NK y células endoteliales) (BoLeung *et al.*, 2001), heterodímero conformado por una cadena  $\alpha$  (IL-18R $\alpha$ ) responsable de la unión extracelular de IL-18; y una cadena  $\beta$  (IL-18R $\beta$ ) encargada de transducción de señales (Torigoe *et al.*, 1997; Born *et al.*, 1998; Hoshino *et al.*, 1999), finalizando en la activación de NF- $\kappa$ B induciendo la producción de IFN $\gamma$  en células T y NK, y activación de la actividad

microbicida en macrófagos debido a la producción de óxido nítrico (Nakanishi *et al.*, 2001). Aunado a esto, IL-18 promueve la secreción de perforinas, TNF, IL-1 $\beta$ , IL-8 y GM-CS, induciendo un incremento en la expansión, migración y activación de neutrófilos durante las infecciones (Hyodo *et al.*, 1999; Hoshino *et al.*, 2001).

Similar a IL-1, los efectos biológicos de IL-18 están regulados por inhibidores, principalmente por la proteína de unión a IL-18 (IL-18BP), previniendo la interacción de IL-18 con su receptor (Novick *et al.*, 1999). IL-18BP humana es producida por macrófagos y células endoteliales del intestino en 4 isoformas distintas (IL-18BPa, IL-18BPb, IL-18BPc e IL-18BPd) derivadas de splicing alternativo, siendo las isoformas IL18BPa e IL18BPc las únicas con capacidad de neutralizar la actividad biológica de IL-18, previniendo la interacción con su receptor, inhibiendo la señalización mediada por IL-18 (Kim *et al.*, 2000; Corbaz *et al.*, 2002).

Diversos estudios señalan la participación de IL-18 en la patogénesis de la EC y CU (Monteleone *et al.*, 1999). La evidencia sugiere que polimorfismos en los promotores de IL-18 (Takagawa *et al.*, 2005) e IL-18R o un desequilibrio entre los niveles IL-18 e IL 18BP están fuertemente asociados con la susceptibilidad a IBD (Tamura *et al.*, 2002; Zhernakova *et al.*, 2008). Estudios clínicos reportan elevados niveles de IL-18 en el suero de pacientes con EC (Leach *et al.*, 2008). Asimismo, estudios inmunohistoquímicos en biopsias del colon de pacientes sanos y con IBD exhiben un contrastante cambio en la expresión de IL-18, observándose mayor expresión de IL-18 en la mucosa intestinal de pacientes con EC (Pizarro *et al.*, 1999). Los modelos animales que recapitulan la patología de las IBD han sugerido la participación de IL-18 en la patogénesis de estas enfermedades, exhibiendo el efecto deletéreo asociado a IL-18 (Maerten *et al.*, 2004). Estudios en ratones en los cuales se genera colitis al administrar agentes químicos como TNBS o DSS tienen un incremento significativo en los niveles de IL-18 en contraste con los ratones control (Pizarro *et al.*, 1999; Sivakumar *et al.*, 20002; Nowarsky *et al.*, 2015). Por otra parte, en ratones transgénicos en los que se induce la sobreexpresión de IL-18 desarrollan una exacerbada inflamación, acompañado de un aumento en la infiltración de macrófagos a la mucosa intestinal (Ishikura *et al.*, 2003). Debido a que el desarrollo de colitis está relacionado con la sobreexpresión de IL-18, se han generado modelos en los cuales se pretende regular negativamente la producción de esta citocina. Por ejemplo, en ratones Balb/C deficientes de caspasa 1 disminuye la susceptibilidad a colitis inducida por DSS así como el deterioro del epitelio intestinal, en comparación con ratones silvestres (Siegmund *et al.*, 2001; Ten Hove *et al.*, 20001). Adicionalmente, en un modelo de transferencia de linfocitos T a ratones inmunodeficientes a los cuales se les había administrado un adenovirus que expresaba un ARNm anti sentido para IL-18, se detectó una resistencia al desarrollo de inflamación exacerbada, en contraste con los ratones control (Wirtz *et al.*, 2002), sugiriendo que la neutralización o la eliminación génica de IL-18 contribuye a una disminución en la gravedad de la enfermedad.

A pesar de que la evidencia señala a IL-18 como un factor importante en la patogénesis asociada a colitis, estudios recientes sugieren la posibilidad de un efecto dual para IL18, ya que IL-18 ejerce un papel protector, facilitando la reparación del tejido y promoviendo la homeostasis intestinal en condiciones



normales (Siegmond *et al.*, 2010). El efecto benéfico generado por IL-18 en la mucosa intestinal se demostró usando ratones deficientes de IL-18 o IL-18R, los cuales exhiben mayor susceptibilidad a colitis inducida por DSS comparado con los ratones WT. Estudios adicionales refuerzan la función benéfica de IL-18, ratones deficientes en los componentes del inflamasoma, Nlrp3<sup>-/-</sup>, Nlrp6<sup>-/-</sup> Pycard<sup>-/-</sup> y Casp1<sup>-/-</sup> mostraron niveles bajos de IL-18 en el colon, asociándose con un incremento a la susceptibilidad a la enfermedad en contraste con ratones silvestres (Zaki *et al.*, 2010; Elinav *et al.*, 2011; Hirota *et al.*, 2011). Aunque la ausencia de los componentes del inflamasoma impacta en la producción de IL-1 $\beta$  como de IL-18, el mecanismo asociado al incremento en la inflamación se relaciona con la disminución en la producción de IL-18, debido a que la administración exógena de IL-18 recombinante fue suficiente para disminuir el proceso inflamatorio generado por la colitis (Dupaul-Chicoine *et al.*, 2010). Por otra parte, Levy *et al.*, 2015 sugieren que IL-18 participa en la protección de la mucosa intestinal, al actuar como un factor involucrado en la síntesis de péptidos antimicrobianos, elementos del sistema inmune innato encargados de la protección frente a un infiltrado masivo de microbiota hacia la lámina propia. En conjunto estos datos resaltan la importancia de IL-18, desempeñando funciones diferentes durante un proceso inflamatorio, así como su influencia en condiciones normales promoviendo la homeostasis intestinal.

### 3. ANTECEDENTES/JUSTIFICACIÓN

Como se mencionó anteriormente, el AE genera efectos benéficos a nivel celular (Connor *et al.*, 1982; Kempermann *et al.*, 1997; Kempermann *et al.*, 2002; Faherty *et al.*, 2003; Bruel-Jungerman *et al.*, 2005; Leggio *et al.*, 2005) y conductual en el sistema nervioso de ratones (Rosenzweig *et al.*, 1962; Tang *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003; Bennett *et al.*, 2006). Los efectos del AE no están restringidos a ratones sanos ya que modelos murinos que recapitulan patologías del sistema nervioso como enfermedad de Huntington (van Dellen *et al.*, 2000; Spires *et al.*, 2004), Parkinson (Bezard *et al.*, 2003), Alzheimer (Jankowsky *et al.*, 2005; Lazarov *et al.*, 2005; Nagahara *et al.*, 2013) y lesiones en el cerebro (Onlsson *et al.*, 1995; Young *et al.*, 1999) exhiben mejoría en animales expuestos al AE. Adicionalmente, la exposición al AE ejerce efectos benéficos en los órganos o sistemas de la periferia corporal al disminuir el crecimiento de tumores en modelos murinos de cáncer de colon, melanoma (Cao *et al.*, 2010) y páncreas (Li *et al.*, 2015). Asimismo, el AE induce la expresión de genes relacionados al cambio de tejido adiposo blanco a tejido adiposo pardo, evitando la acumulación de grasa y con ello generando resistencia al desarrollo de obesidad (Cao *et al.*, 2011).

Tomando en cuenta los efectos benéficos del AE, nuestro grupo de investigación evaluó la influencia del AE en un modelo murino de la enfermedad de diabetes mellitus, mostrando que el AE reduce el proceso inflamatorio en el tejido adiposo visceral e hipotálamo, así como revertir las alteraciones relacionadas al metabolismo de glucosa (Díaz de León *et al.*, 2013). Del mismo modo, Villaseñor y colaboradores (en preparación), evaluaron la influencia del AE en dos modelos murinos de colitis experimental (DSS y TNBS), mostrando que el AE reduce la pérdida de peso, disminuye la reducción de la longitud del colon, aminora el daño al epitelio intestinal y disminuye los niveles de TNF e IL-1 $\beta$ , importantes en el establecimiento de un proceso inflamatorio.

Diversos estudios han investigado la participación de IL-18 en el desarrollo de las IBD. En condiciones de homeostasis IL-18 tiene un efecto protector, sin embargo, durante la presencia de inflamación IL-18 ejerce un papel deletéreo (Siegmund *et al.*, 2010). La ausencia de IL-18 o ratones deficientes en algún componente del inflammasoma (Nlrp3<sup>-/-</sup>, Nlrp6<sup>-/-</sup>, Pycard<sup>-/-</sup> y Casp1<sup>-/-</sup>) desarrollan un incremento en la susceptibilidad a las IBD (Zaki *et al.*, 2010; Elinav *et al.*, 2011; Hirota *et al.*, 2011). Así mismo, la administración exógena de IL-18 recombinante es suficiente para disminuir el proceso inflamatorio asociado a colitis (Dupaul-Chicoine *et al.*, 2010). Finalmente, Levy *et al.*, 2015 señalan que IL-18 promueve la síntesis de péptidos antimicrobianos contribuyendo al reforzamiento de la barrera intestinal, reduciendo el infiltrado de microbiota a la lámina propia con ello disminuyendo el inicio de un proceso inflamatorio.

El papel nocivo de IL-18 ha sido demostrado en modelos murinos de colitis con DSS (Sivakumar *et al.*, 2002; Nowarsky *et al.*, 2015), ratones KO de caspasa 1 (Siegmund *et al.*, 2001), ratones que sobreexpresan IL-18 (Ishikura *et al.*, 2003) o ratones que expresan un ARNm anti sentido para IL-18 (Wirtz *et al.*, 2002), mostrando que elevados niveles de IL-18 inducen una exacerbación de la

inflamación intestinal. Finalmente, modelos en los que se neutraliza o elimina IL-18 indican que la disminución de IL-18 promueve una mejora de la enfermedad (Siegmond *et al.*, 2001; Ten Hove *et al.*, 2001) indicando la participación de IL-18 en el desarrollo de la enfermedad.

Tomando en cuenta que, a) la exposición al AE tiene efectos benéficos a nivel del sistema nervioso en individuos sanos e induce una mejoría en modelos murinos de patologías asociadas al cerebro; b) el habitar condiciones de enriquecimiento reduce el desarrollo de cáncer, obesidad, reversión de las complicaciones asociadas a diabetes y reducción de la inflamación en tejido visceral; así como aminorar el daño relacionado a colitis en 2 modelos murinos de IBD al prevenir el incremento en el nivel de IL-1, TNF e IFN- $\gamma$  y reducir el daño al epitelio intestinal; el mecanismo mediante el cual el AE regula el proceso inflamatorio en la mucosa intestinal aún se desconoce; y c) dado que IL-18 tiene efectos benéficos en la mucosa intestinal en condiciones de homeostasis pero durante un proceso inflamatorio actúa como un promotor de daño. Proponemos que el AE mediante, la regulación de la producción de IL-18 atenuará el proceso inflamatorio y el daño al epitelio intestinal, contribuyendo al restablecimiento de la homeostasis intestinal.

## **4. HIPÓTESIS**

El ambiente enriquecido mediante la regulación del nivel de IL-18 atenuará el daño al epitelio intestinal en dos murinos de colitis experimental, DSS y TNBS.

### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

Demostrar que la exposición al ambiente enriquecido modifica el nivel de IL-18 y con ello reduce el daño en la mucosa intestinal, resultante de la inducción de colitis con DSS y TNBS.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Evaluar si el AE modula los niveles de IL-18 durante el desarrollo de colitis.
- 2) Determinar si el AE atenúa el daño al epitelio intestinal asociado al desarrollo de colitis.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### Condiciones de alojamiento, ambiente estándar (AN) y ambiente enriquecido (AE).

Los animales se alojaron durante dos meses en jaulas estándar [(AN), jaulas de policarbonato de 31.0 cm de largo x 23.0 cm de ancho x 16.0 cm de altura], alojando 5 ratones por caja (2 grupos de 5 animales cada uno); o jaulas de ambiente enriquecido [(AE), jaulas de plástico de 87.9 cm de largo x 47.6 m de ancho x 32.1 cm de altura], alojando a 12 animales por jaula. Al principio de cada semana los ratones fueron colocados en jaulas limpias, ya sea en condiciones estándar o condiciones de enriquecimiento. En el caso del AE al iniciar cada semana, diferentes objetos fueron agregados para generar las condiciones de enriquecimiento, incluyendo ruedas para hacer ejercicio, túneles, juguetes de plástico con diversas formas y tamaño ubicados en posiciones totalmente diferentes para mantener el componente de novedad y complejidad. En cambio, a las cajas del AN no se agregó ningún objeto.

### Cepas de ratón utilizadas en este trabajo.

Se utilizaron 44 ratones machos, 22 ratones de la cepa C57BL/6N y 22 ratones de la cepa Balb/C, de ocho semanas de edad. Los animales tenían acceso a alimentos y agua *ad libitum*, así mismo se alojaron en condiciones controladas de temperatura y humedad, manteniendo un ciclo luz-oscuridad de doce horas. Los ratones se mantuvieron en el bioterio siguiendo las reglas establecidas por el Comité de Bioética del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

### Inducción de colitis.

Se generó colitis añadiendo DSS al agua para beber, a una concentración de 2.5% para animales del AN y una concentración de 0.83% para animales del AE, debido a que estos animales ingieren tres veces más líquidos que los animales del AN (Villaseñor *et al.*, en preparación), durante siete días. Los animales control del AE o AN bebieron agua sin DSS. En el caso de la cepa Balb/C, la inducción de colitis se efectuó mediante la administración intrarectal de 2 mg de TNBS disueltos en 100  $\mu$ l de etanol al 40% (v/v), a los ratones del grupo control se les administró PBS diluido en 100  $\mu$ l de etanol al 40%. Una vez administrado el TNBS o PBS, cada grupo de animales fue devuelto a sus respectivas condiciones de alojamiento, ya sea AN o AE. Después de siete días, se realizó el sacrificio de los animales a través de la exposición a CO<sub>2</sub>. Se extrajo el intestino grueso, el cual se lavó tres veces con PBS suplementado con antibiótico y antimicótico. Una vez eliminada la materia fecal se realizaron tres lavados adicionales y finalmente se colectó la región correspondiente al colon proximal, depositándola en tubos Eppendorf (1 mL) los cuales fueron almacenados a una temperatura de -70°C hasta el día del procesamiento.

## **Puntuación de actividad de la enfermedad (Disease Activity Score, DAS).**

Posterior a la inducción de colitis, durante siete días se monitorearon diferentes parámetros que reflejan la progresión de la enfermedad. Entre los parámetros analizados se encuentran el peso corporal, apariencia del pelaje (0: normal, 1: alterada), consistencia de heces (0: normal, 1: heces blandas con forma, 2: heces sin consistencia y presencia de sangre) y presencia de sangre en la zona perianal (0: sin rastro de sangre, 1: trazas de sangre en la región perianal, 2: abundante sangre en la región perianal). El DAS y los cambios en el peso corporal se calcularon al final de los 7 días de tratamiento.

## **Extracción de proteína total.**

Para la extracción de proteína total del colon proximal de ratones expuestos a las distintas condiciones experimentales; los fragmentos de intestino previamente colectados se colocaron en hielo y se agregó 350  $\mu$ l de buffer de lisis TLB (20 mM Tris pH 7.4, 137 mM NaCl, 25 mM  $\beta$ -glicerofosfato, 2 mM PPINa, 2 mM EDTA pH 7.4, 1% Triton X-100, 10% glicerol) o RIPA (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 1% Triton X-100, 0.1% Deoxicolato de sodio, 0.1% SDS, 140 mM NaCl) suplementados con inhibidores de proteasas (Antipain 5  $\mu$ g/ $\mu$ l, Leupeptina 5  $\mu$ g/ $\mu$ l, Pepstatina 5  $\mu$ g/ $\mu$ l, PMSF 1 mM), inhibidor de fosfatasa ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1 mM) y un agente reductor (DTT 0.5 mM) y se incubaron 10 min a 4° C. Posterior a los 10 min de incubación las muestras se sonicaron usando ciclos de 10 seg-ON y 30 seg-OFF con una amplitud de onda del 80%, repitiendo el proceso tres veces. Posterior al lisado las muestras se centrifugaron a 14 500 rpm/10 min/ 4°C, finalizado el tiempo de centrifugación se colectó el sobrenadante, se colocó en tubos Eppendorf (1 mL) y se almacenaron a -70°C hasta el día del procesamiento.

## **Western Blot.**

La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford. Se tomaron 30  $\mu$ g de proteína de los extractos totales para cada condición experimental, se agregó 5  $\mu$ l de buffer de carga (4x Tris/SDS, pH: 6.8, glicerol, SDS, DTT, Azul de bromofenol) y se aforó a un volumen final de 30  $\mu$ l agregando H<sub>2</sub>O destilada, finalmente se desnaturalizaron las proteínas por ebullición durante 5 min. Los 30  $\mu$ g de proteína desnaturalizada fueron resueltos en geles de acrilamida (SDS-PAGE) al 12.5% o 15% usando 30 mA por gel. Una vez separadas las proteínas por peso molecular se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham Hybond ECL Nitrocellulose Membrane- GE Healthcare) usando el buffer de transferencia (200mM glicina, 25 mM Tris, 0.1% SDS, 20% MeOH) durante 45 minutos usando 100 V por membrana. AL finalizar la transferencia de proteínas a la membrana de nitrocelulosa, las membranas se tiñeron con rojo de Ponceau (Sigma) para visualizar el patrón de bandeado proteico, se lavó la membrana con H<sub>2</sub>O destilada para eliminar el exceso de colorante. La membrana se bloqueó con leche descremada al 5% o 1.2 % diluida en TBS/Tween 20 (TBS/T-0.1%) (TBS 10 mM Tris pH: 7.5, 150 mM NaCl y Tween 20 al 0.1 %) durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente se agregó el anticuerpo primario (AcP) diluido en TBS/T-0.1%

de acuerdo con las especificaciones del proveedor (Tabla 1) y se incubó una noche en agitación constante a 4 °C.

Transcurrido el tiempo de incubación con el AcP, se eliminó el exceso de AcP y se procedió a realizar una serie de lavados, 2 lavados de 10 min con TBS/T-0.1%, 1 lavado de 5 min con TBS/T-0.1% alto en NaCl (500 mM) y 1 lavado de 5 min con en TBS/T-0.1%. Posteriormente se agregó el anticuerpo secundario (AcS) (el cual depende del AcP utilizado) diluido en TBS/T-0.1% y se incubó 1 hora a temperatura ambiente con agitación constante. Finalizado el tiempo de incubación, se inició una serie de lavados semejantes a los descritos para el AcP.

Para detectar la presencia de la proteína blanco, las membranas se revelaron utilizando el sustrato Western Lightning Plus-ECL (PerkinElmer Inc.) que genera quimioluminiscencia al interactuar con el AcS, dicha señal fue detectada por el equipo C-DiGit® Blot Scanner de LI-COR biosciences con el software Image Studio Lite Software. El mismo software fue utilizado para obtener los valores densitométricos de cada Western Blot generado.

**Tabla 1. Anticuerpos usados en este trabajo.**

Anticuerpo	Marca	# catálogo	Diluyente
IL-18 (H-173)	Santa Cruz Biotechnology	sc-7954	TBS/T-0.1% + leche 5%
ERK2 (C-14)	Santa Cruz Biotechnology	sc-154	TBS/T-0.1%
GKLF (T-16)	Santa Cruz Biotechnology	sc-12538	TBS/T-0.1% + BSA 5%
Caspase-1 p-10 (M-20)	Santa Cruz Biotechnology	sc-514	TBS/T-0.1% + leche 1.2%

Los anticuerpos utilizados se diluyeron en leche al 1.2% o 5% o BSA (Bovine Serum Albumin) 5% en TBS/T-0.1%. Se emplearon AcS acoplados a peroxidasa de rábano (HRP) anti-goat, anti-rabbit y anti-chicken (el AcS usado depende del AcP utilizado).

### **Análisis histológico.**

Después de la eutanasia, se colectaron piezas de 1.0 cm de longitud del colon proximal, se lavaron con PBS 1x y después se fijaron en paraformaldehído al 4%. Los tejidos fijados en paraformaldehído se embebieron en parafina, con ayuda de un micrótopo se cortaron en secciones transversales de 5 µm de grosor y se tiñeron con PAS (Periodic Acid Schiff)/Alcian azul. Posteriormente se obtuvieron aproximadamente 45 fotografías (en un microscopio Invertido NIKON ECLIPSE TE 300), correspondientes a 45 zonas de cada condición evaluada en dos experimentos independientes, con un aumento de 40x para ratones de la cepa C57BL/6N. Para el caso de los ratones Balb/C se obtuvieron aproximadamente 4-

10 fotografías, correspondientes a zonas de cada condición evaluada en un único experimento, con un aumento de 40x. Las fotografías fueron analizadas con el programa FIJI, calculando el área correspondiente a células caliciformes (zonas azules) dividiendo el valor anterior entre al área total de la zona fotografiada. Las imágenes representativas de cada condición se generaron con el microscopio Nikon ECLIPSE E600 con el objetivo 20x, utilizando la cámara digital Nikon DXM1200.

### **Análisis estadístico.**

Los valores obtenidos de los diferentes experimentos fueron reportados como medias  $\pm$  Error Estándar de la Media (SEM). Para determinar si los datos tenían significancia estadística se realizaron análisis de ANOVA de una vía seguida por prueba de Tukey, con el programa GraphPad Prism Software versión 6.0 (GraphPad Software). Los valores fueron normalizados con respecto a las condiciones control de cada experimento, se considera estadísticamente significativas aquellas pruebas con un valor de \*p <0.05, \*\*p <0.01, \*\*\*p <0.001, \*\*\*\*p <0.0001

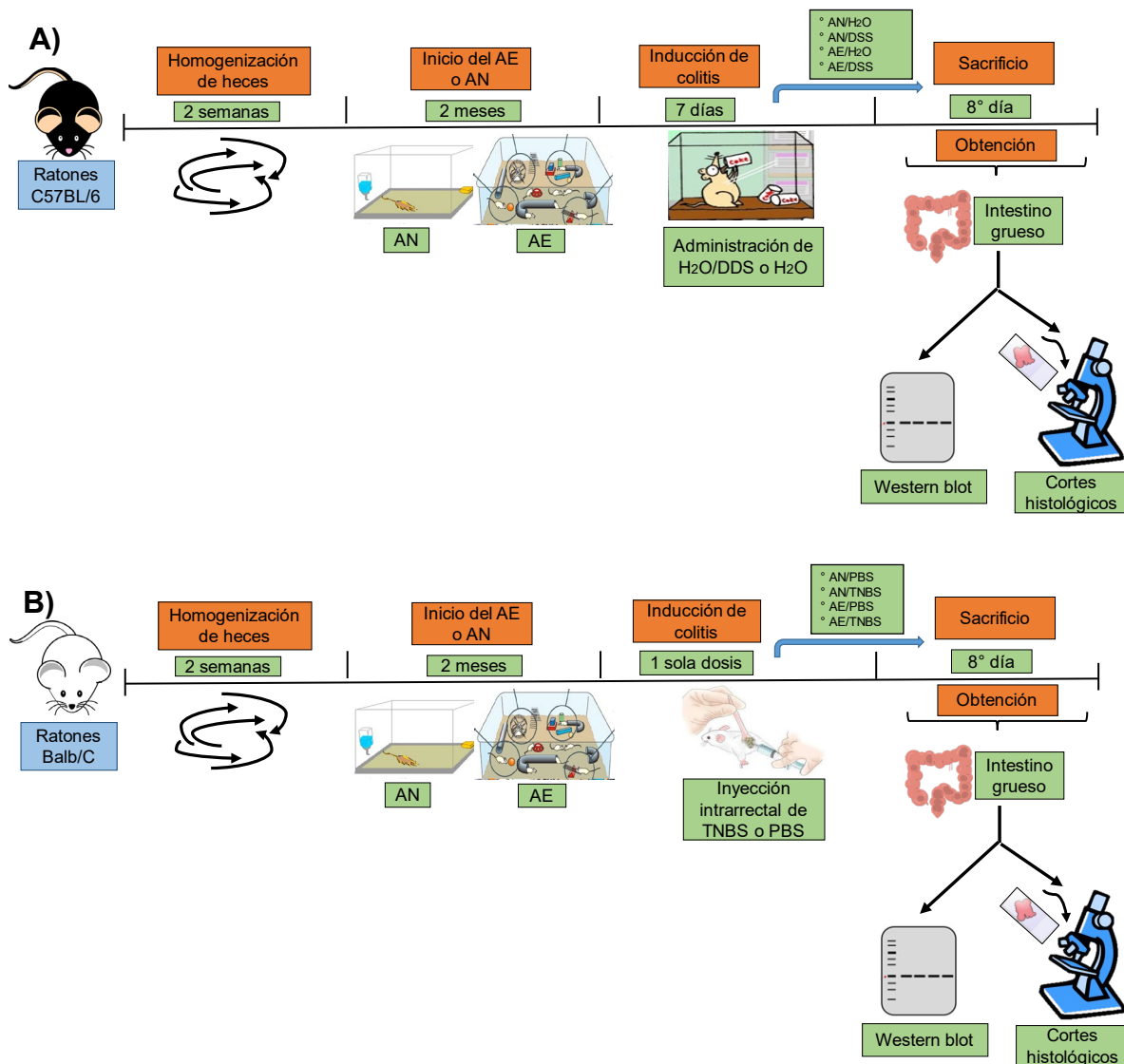


## 6.RESULTADOS

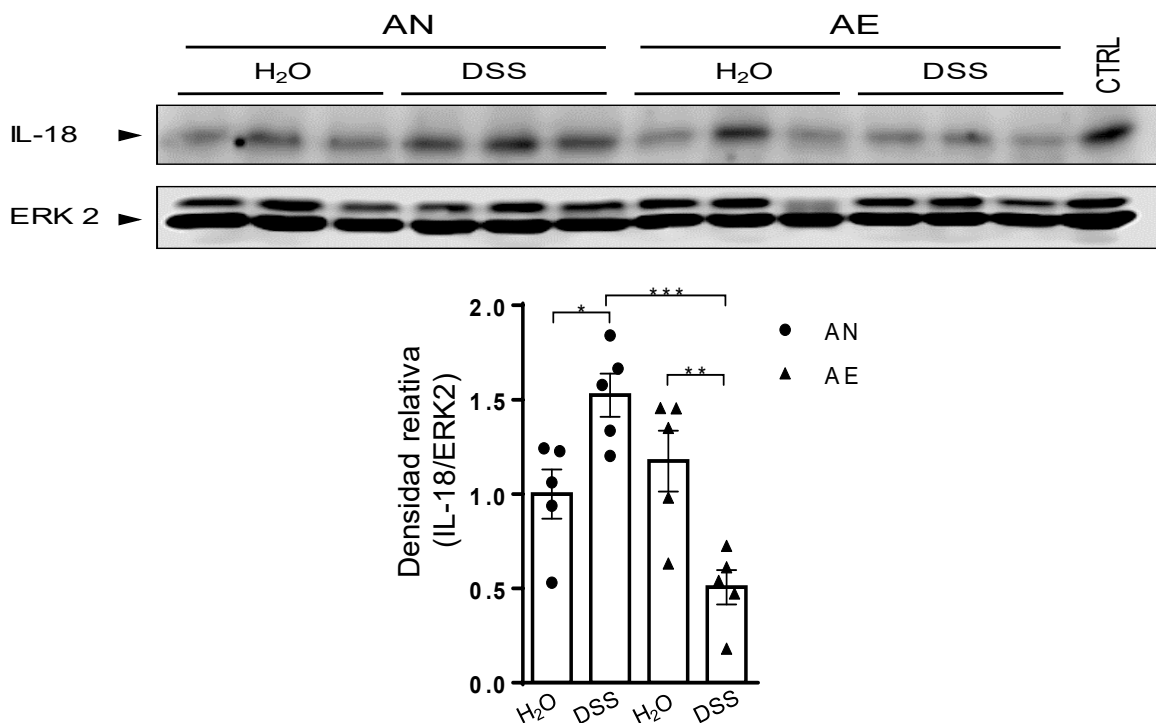
### 6.1 La exposición al AE previene un incremento en el nivel de activación de IL-18 en ratones C57BL/6 y Balb/C durante la inducción de colitis.

Estudios previos del laboratorio mostraron que la exposición a condiciones de enriquecimiento atenúa el daño producido al epitelio intestinal, así como la producción de TNF e IL-1 $\beta$  en dos modelos murinos de colitis (Villaseñor *et al.*, en preparación). Debido a que el AE reduce los niveles de TNF e IL-1 $\beta$  en animales con colitis, evaluamos el efecto del AE sobre el nivel de otras citocinas inflamatorias y/o poblaciones de células caliciformes en el intestino grueso de ratones con colitis. Para ello, ratones de la cepa C57BL/6 y Balb/C fueron sometidos al paradigma del AE o AN durante un periodo de dos meses, posteriormente se indujo colitis a través de la administración de DSS a ratones C56BL/6 o TNBS a ratones Balb/C y se evaluaron los niveles de IL-18, procaspasa 1, caspasa 1 y KLF4 mediante análisis de Western Blot. Asimismo, se obtuvieron cortes histológicos del intestino grueso para evaluar el daño en el intestino causado por la colitis (Fig. 3A y Fig. 3B).

La IL-18 juega un papel importante en el desarrollo de colitis, reportándose un aumento de IL-18 en estudios clínicos (Monteleone *et al.*, 1999; Pizarro *et al.*, 1999; Kanai *et al.*, 2000; Leach *et al.*, 2008) como en modelos animales de las IBD (Kanai *et al.*, 20001; Siegmund *et al.*, 2001; Ten Hove *et al.*, 20001; Sivakumar *et al.*, 20002; Wirtz *et al.*, 2002; Ishikura *et al.*, 2003; Nowarsky *et al.*, 2015), indicando que un exceso en el nivel de IL-18 está relacionado a un mayor daño en el intestino. Como se había reportado previamente (Sivakumar *et al.*, 2002; Nowarsky *et al.*, 2015), observamos un incremento significativo en el nivel de IL-18, aproximadamente de 0.5 veces, en el colon de animales que habitaron al AN y se les administró DSS (AN/DSS) al compararse con los niveles de IL-18 de ratones control (AN/H<sub>2</sub>O) (Fig. 4). En cambio, el AE no modifica los niveles de IL-18 en ausencia de un insulto ya que los niveles de IL-18 fueron similares entre los animales expuestos al AN o al AE que bebieron únicamente H<sub>2</sub>O (Fig. 4). Sin embargo, la exposición al EA previno el aumento en el nivel de IL-18, inducidos por la administración de DSS. De hecho, los niveles de IL-18 en los animales sometidos al AE con administración de DSS (AE/DSS) fueron significativamente menores en comparación con animales del AE que bebieron H<sub>2</sub>O (AE/H<sub>2</sub>O) (Fig 4). Así mismo, el nivel de IL-18 en animales expuestos al AE con DSS (AE/DSS) disminuyó significativamente al contrastarse con el nivel de IL-18 de ratones expuestos al AN con DSS (AN/DSS) (Fig 4). Estos resultados indican que el AE es capaz de modular la producción de IL-18 inducida durante la inflamación causada por la administración de DSS en ratones C57BL/6.

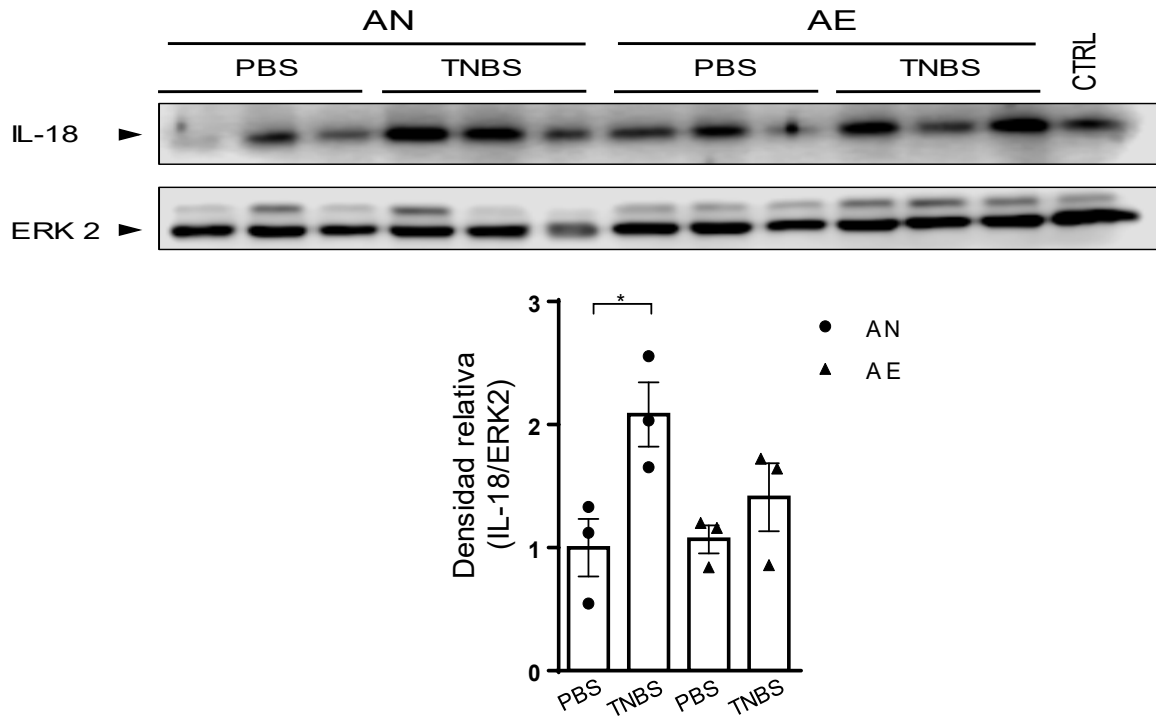


**Figura 3. Diseño experimental para estudiar el efecto del ambiente enriquecido sobre dos modelos murinos de colitis.** A) Representación esquemática del modelo murino de inducción de colitis con DSS. Ratones machos C57BL/6 se alojaron dos semanas en condiciones estándar, durante ese tiempo las heces fecales se mezclaron entre ellos para homogenizar la microbiota entre los ratones. Posteriormente, los animales se alojaron dos meses en condiciones de enriquecimiento ambiental (AE) o condiciones de habitación estándar (AN). Al final de los dos meses se indujo colitis a los ratones del AE y AN mediante la administración de DSS en el agua que bebían los ratones (durante 7 días), generándose los grupos de ratones con inducción de colitis (AN/DSS y AE/DSS) y los grupos control (AN/H<sub>2</sub>O y AE/H<sub>2</sub>O). En el octavo día, posterior al último día de administración de DSS, los ratones se sacrificaron y se colectó la región proximal del intestino grueso, a partir del intestino se obtuvieron cortes histológicos o se extrajo proteína total para la elaboración de western blot. B) Representación esquemática del modelo murino de inducción de colitis con TNBS. En el caso de los ratones Balb/C, el protocolo de homogenización de heces fecales y el alojamiento en el AN o AE fue similar a lo descrito para ratones C57BL/6. Sin embargo, la inducción de colitis se realizó mediante la administración de una dosis única de TNBS o PBS vía intrarrectal, generándose los grupos de ratones con inducción de colitis (AN/TNBS y AE/TNBS) y los grupos control (AN/PBS y AE/PBS). Similar a ratones C57BL/6, en el octavo día, siete días después de la inyección de TNBS o PBS, los ratones se sacrificaron, se colectó la región proximal del intestino grueso y se obtuvieron cortes histológicos o proteína total para la elaboración de western blot.



**Figura 4. La exposición al AE modula los niveles de IL-18 en ratones de la cepa C57BL/6.** Se obtuvieron extractos proteicos totales de segmentos del colon proximal de ratones C57BL/6 expuestos a condiciones de enriquecimiento (AE) o condiciones estándar (AN) durante dos meses y sometidos a la inducción de colitis con DSS. Se utilizaron 30 microgramos de extracto proteico para análisis de Western Blot, empleando anticuerpos específicos contra IL-18 o ERK2. Los niveles de ERK2 se utilizaron como control de carga. En la gráfica se muestran los valores de densitometría correspondientes al nivel de IL-18 (Dividiendo el valor de IL-18 entre el valor de ERK2) así como el SEM (Error Estándar de la Media) de dos experimentos independientes, con una N total de 5 animales. Para el análisis estadístico se realizaron pruebas de ANOVA de una vía seguida por prueba de Tukey. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

Para confirmar el efecto modulador del AE sobre el nivel de IL-18, utilizamos un segundo modelo murino de inducción de colitis, el cual recapitula la patología asociada a la EC. Consistente con lo reportado por Ten Hove *et al.*, 2001, los valores de IL-18 en el colon de animales expuestos al AN tratados con TNBS (AN/TNBS) incrementaron significativamente, alrededor de dos veces con respecto a los niveles de IL-18 observados en los animales control (AN/PBS) (Fig. 5). En contraste, la exposición al AE previno el incremento en los niveles de IL-18 inducidos por TNBS (AE/TNBS), no significativo, en relación con el nivel de IL-18 de ratones expuestos al AN con inducción de colitis (AN/TNBS) (Fig. 5). De igual forma que en ratones C57BL/6 (AE/H<sub>2</sub>O), el AE no ejerce algún efecto sobre el nivel de IL-18 en ratones Balb/C en ausencia de insulto (AE/PBS) (Fig. 5). Esto indica que el AE puede prevenir el incremento de IL-18 durante el desarrollo de colitis generada por la administración de TNBS en ratones Balb/C.



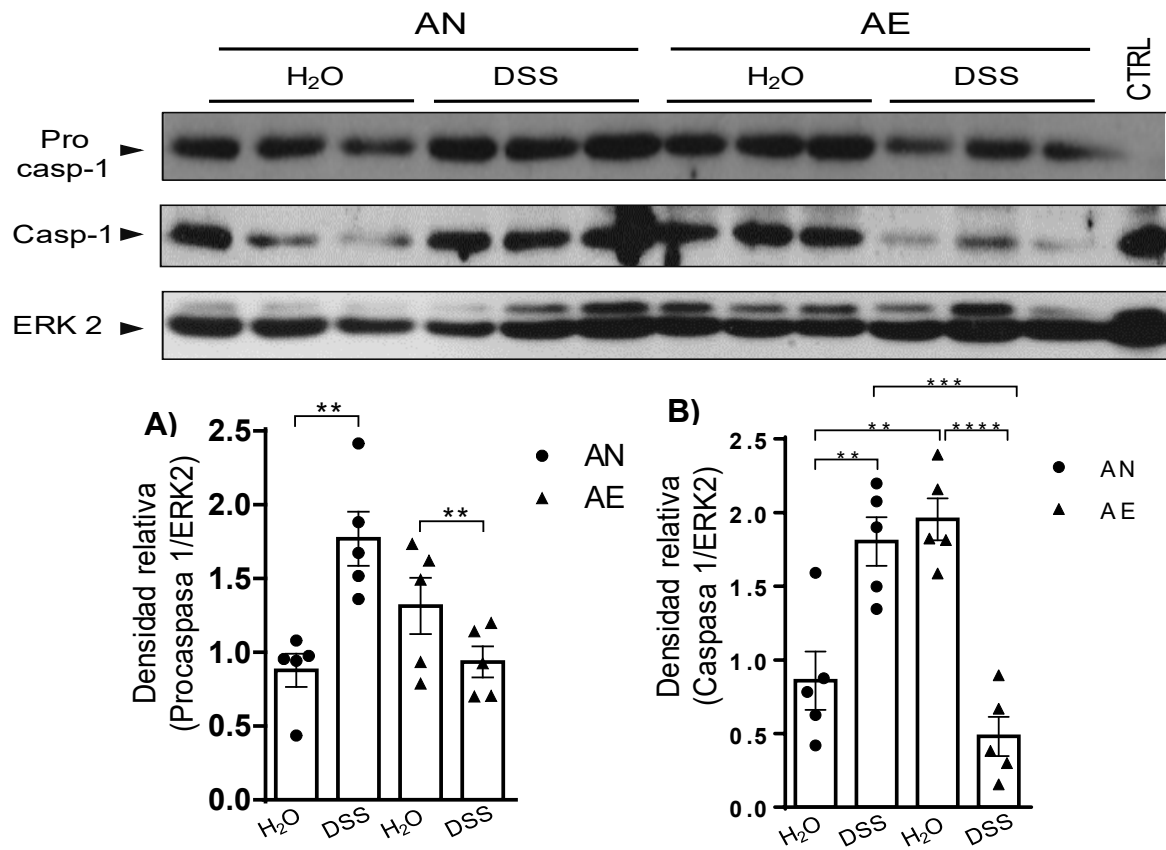
**Figura 5. La exposición al AE modula los niveles de IL-18 en ratones de la cepa Balb/C.** Se obtuvieron extractos proteicos totales de segmentos del colon proximal de ratones Balb/C expuestos a condiciones de enriquecimiento (AE) o condiciones estándar (AN) durante dos meses y sometidos a la inducción de colitis con TNBS. Se utilizaron 30 microgramos de extracto proteico para análisis de Western Blot, empleando anticuerpos específicos contra IL-18 o ERK2. Los niveles de ERK2 se utilizaron como control de carga. En la gráfica se muestran los valores de densitometría correspondientes al nivel de IL-18 (Dividiendo el valor de IL-18 entre el valor de ERK2) así como el SEM (Error Estándar de la Media) de un experimento, con una N total de 3 animales. Para el análisis estadístico se realizaron pruebas de ANOVA de una vía seguida por prueba de Tukey. \* $p < 0.05$ .

En conjunto estos resultados indican que el AE puede modular la producción de IL-18 en dos modelos de colitis experimental. Por lo cual, el siguiente paso fue determinar si la modulación de los niveles de IL-18 se lleva a cabo mediante el control en la activación de caspasa 1, principal enzima involucrada en el procesamiento y activación de IL-18.

## **6.2 La exposición a condiciones de enriquecimiento modifica los niveles proteicos de procaspasa 1 y caspasa 1 en ratones C57BL/6 y Balb/C.**

La evidencia anterior sugiere que el AE promueve una reducción en los niveles de IL-18 en ratones a los que se les indujo colitis, con DSS o TNBS, sometidos al AE en comparación con ratones expuestos al AN con colitis. Para determinar si el impacto del AE sobre el nivel de IL-18 se relaciona con la regulación de su procesamiento, evaluamos el efecto del AE sobre los niveles (a nivel de proteína) de procaspasa 1 y caspasa 1, enzima encargada de la activación de IL-18, mediante análisis de Western Blot.

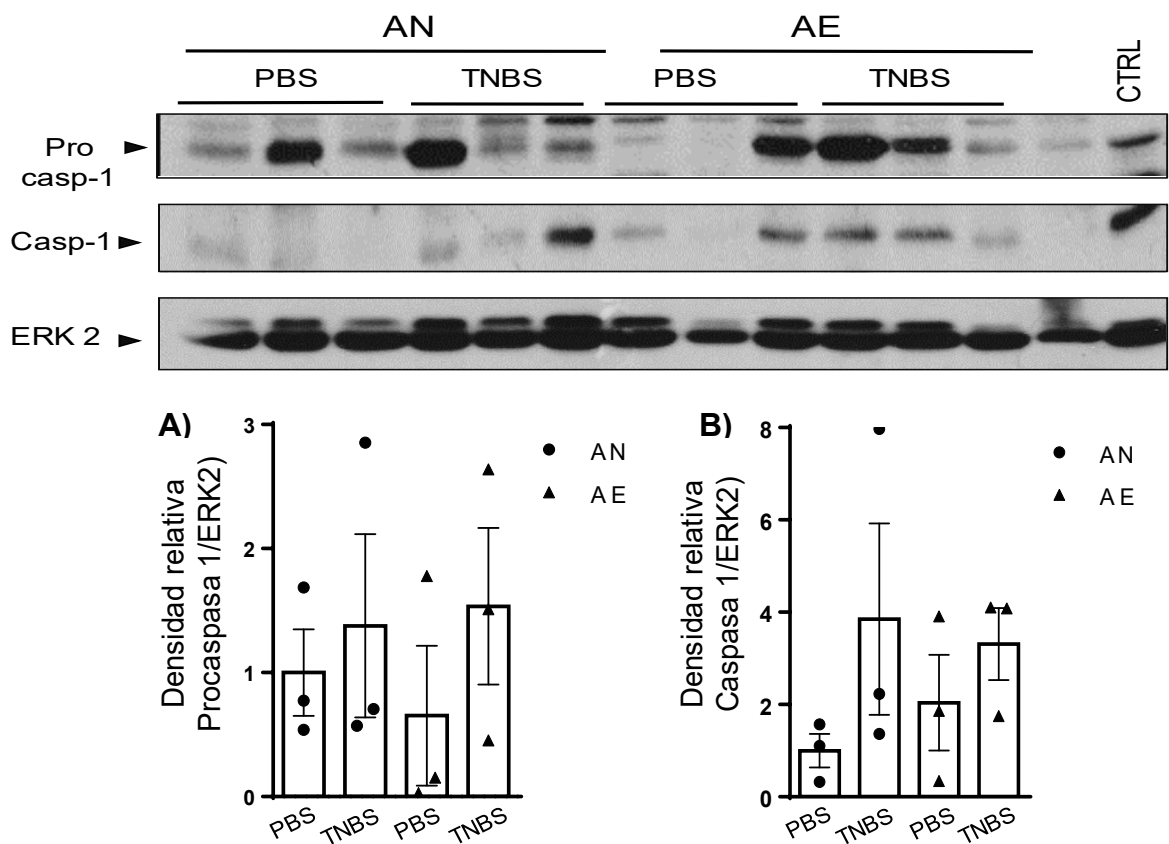
Consistente con el incremento en el nivel de IL-18 de animales sometidos al AN con inducción de colitis (AN/DSS) comparados con el nivel de IL-18 de ratones control (AN/H<sub>2</sub>O) (Fig. 4), observamos que ratones C57BL/6 expuestos al AN con colitis (AN/DSS) el nivel de procaspasa 1 aumenta significativamente, aproximadamente más de 0.5 veces, en relación con el valor de procaspasa 1 en la condición AN/H<sub>2</sub>O (Fig. 6A). Así mismo, los niveles de caspasa 1 madura son significativamente más elevados en ratones sometidos al AN con colitis (AN/DSS) en comparación con los animales control (AN/H<sub>2</sub>O) (Fig. 6B). En el caso de animales expuestos al AE que bebieron H<sub>2</sub>O (AE/H<sub>2</sub>O) se aprecia un ligero incremento (no significativo) en los niveles de procaspasa 1 en comparación con los animales que habitaron en condiciones normales (AN/H<sub>2</sub>O) (Fig. 6A). Similar a lo anterior, el nivel de caspasa 1 madura de ratones sometidos al AE y que bebieron H<sub>2</sub>O (AE/H<sub>2</sub>O) incrementa significativamente, aproximadamente dos veces, en comparación con el nivel de caspasa 1 madura observada en los animales que habitaron el AN y bebieron H<sub>2</sub>O (AN/H<sub>2</sub>O) (Fig. 6B). De hecho, los niveles de caspasa 1 madura en la condición AE/H<sub>2</sub>O fueron similares a los observados en los animales del AN con colitis (AN/DSS) (Fig. 6B). Sin embargo, al comparar el nivel de procaspasa 1 y caspasa 1 madura de ratones expuestos al AE con colitis (AE/DSS) con los niveles de procaspasa 1 y caspasa 1 de ratones expuestos al AN con colitis (AN/DSS), observamos que la exposición al AE disminuye significativamente la activación de caspasa 1 así como reducir la síntesis de procaspasa 1 (dato no significativo) durante el desarrollo de un proceso inflamatorio (Fig. 6A y 6B). En conjunto, los datos anteriores sugieren que la exposición al AE modifica los niveles de procaspasa 1 y caspasa 1 en ausencia o en presencia de un insulto. Observándose que el AE disminuye los niveles de expresión de procaspasa 1 y caspasa 1 inducidos por la administración de DSS (AE/DSS) en comparación con ratones sometidos al AN/DSS, correlacionando con la disminución del nivel de IL-18 en ratones C57BL/6 expuestos a las mismas condiciones.



**Figura 6. La exposición al AE modifica los niveles de procaspasa 1 y caspasa 1 en ratones C57BL/6.** Se obtuvieron extractos proteicos totales de segmentos del colon proximal de ratones C57BL/6 expuestos a condiciones de enriquecimiento (AE) o condiciones estándar (AN) durante dos meses y sometidos a la inducción de colitis con DSS. Se utilizaron 30 microgramos de extracto proteico para análisis de Western Blot, empleando anticuerpos específicos contra caspasa 1 y ERK2. Los niveles de ERK2 se utilizaron como control de carga. En la gráfica se muestran los valores de densitometría correspondientes al nivel de procaspasa 1 (6A) o caspasa 1 (6B) (dividiendo el valor de procaspasa 1 o caspasa 1 entre el valor de ERK2) así como el SEM (Error Estándar de la Media) de dos experimentos independientes, con una N total de 5 animales. Para el análisis estadístico se realizaron pruebas de ANOVA de una vía seguida por prueba de Tukey. \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001.

Similar a lo que ocurre en ratones C57BL/6, la inducción de colitis en ratones Balb/C que habitaron en condiciones estándar (AN/TNBS), mostraron un incremento no significativo en los niveles de procaspasa 1 y caspasa 1 en el colon, comparándolos con los niveles de estas proteínas en los animales control (AN/PBS) (Fig. 7A y 7B). En cambio, ratones expuestos al AE con administración de PBS (AE/PBS) exhiben una disminución, no significativa, en el nivel de procaspasa 1; en contraste, en la misma condición, se observa una tendencia hacia el incremento en el nivel de caspasa 1 en comparación con los niveles observados en ratones que habitaron el AN sin inducción de colitis (AN/PBS) (Fig. 7A y 7B). Finalmente, ratones expuestos al AE con colitis (AE/TNBS) muestran una tendencia hacia el incremento en el nivel de procaspasa 1 y caspasa 1 en comparación con ratones sometidos al AE/PBS (Fig. 7A y 7B).

Por otra parte, los niveles de caspasa 1 de ratones que habitaron en el AE y que se les administró TNBS (AE/TNBS) presentan una disminución en el nivel de caspasa 1 comparado con los niveles de caspasa 1 en ratones expuestos al AN con colitis (AN/TNBS) (Fig. 7B). Por el contrario, el nivel de procaspasa 1 de ratones sometidos al AE con colitis (AE/TNBS) exhibe un ligero incremento en relación con el nivel de procaspasa 1 de ratones que habitaron el AN con inducción de colitis (AN/TNBS) (Fig. 7A). Sin embargo, ninguno de estos cambios fue estadísticamente significativo. No obstante, las tendencias mostradas sugieren que semejante a lo que ocurre en ratones C57BL/6, la exposición de ratones Balb/C al AE puede disminuir la activación de caspasa 1 y subsecuentemente el nivel de IL-18 durante el desarrollo de colitis inducida por TNBS.



**Figura 7. La exposición al AE modifica los niveles de procaspasa 1 y casasa 1 en ratones Balb/C.**

Se obtuvieron extractos proteicos totales de segmentos del colon proximal de ratones Balb/C expuestos a condiciones de enriquecimiento (AE) o condiciones estándar (AN) durante dos meses y sometidos a la inducción de colitis con TNBS. Se utilizaron 30 microgramos de extracto proteico para análisis de Western Blot, empleando anticuerpos específicos contra caspasa 1 y ERK2. Los niveles de ERK2 se utilizaron como control de carga. En la gráfica se muestran los valores de densitometría correspondientes al nivel de procaspasa 1 (7A) o caspasa 1 (7B) (dividiendo el valor de procaspasa 1 o caspasa 1 entre el valor de ERK2) así como el SEM (Error Estándar de la Media) de un experimento, con una N total de 3 animales. Para el análisis estadístico se realizaron pruebas de ANOVA de una vía seguida por prueba de Tukey.

En conjunto, los resultados anteriores sugieren que mediante la regulación de la expresión de procaspasa 1 y caspasa 1, el AE previene el incremento del nivel de IL-18 en dos modelos murinos de colitis, y probablemente el daño ocasionado al intestino durante un proceso inflamatorio. Debido a lo anterior, el siguiente paso fue determinar si el decremento en el nivel de IL-18 reduce el daño en la mucosa asociado al proceso inflamatorio en el intestino.

### **6.3 La exposición al AE previene la disminución de células caliciformes en ratones C57BL/6 y Balb/C.**

El AE previene el incremento de citocinas como TNF e IL-1 $\beta$  (Villaseñor *et al.*, en preparación), reduce la síntesis y activación de procaspasa 1 y caspasa 1, y con ello, disminuye el nivel de activación de IL-18. Asimismo, los reportes indican que un incremento de IL-18 contribuye con la exacerbación del daño en la estructura del epitelio intestinal (Siegmond *et al.*, 2001; Ten Hove *et al.*, 2001; Sivakumar *et al.*, 2002; Wirtz *et al.*, 2002; Ishikura *et al.*, 2003) promoviendo la disminución del número de células caliciformes (Nowarsky *et al.*, 2015) (principales productoras del moco que recubre el interior del intestino). Debido a lo anterior, nos preguntamos si la disminución del nivel de IL-18 en animales con colitis expuestos al AE reduciría el daño causado al epitelio intestinal, específicamente, previniendo la disminución de células caliciformes.

Para contestar esta pregunta, ratones C57BL/6 o Balb/C fueron expuestos al AN o AE durante dos meses y posteriormente se indujo colitis mediante la administración de DSS o TNBS, respectivamente. Después de siete días los animales se sacrificaron, se colectó la región proximal del intestino grueso y se realizaron cortes histológicos los cuales fueron teñidos con la tinción PAS (Periodic Acid Schiff)/Alcian azul, específica para la detección de mucinas, principal producto generado por células caliciformes. Posteriormente se obtuvieron fotografías de diferentes regiones de los cortes histológicos, se estableció una escala y se determinó el área correspondiente a células caliciformes (áreas teñidas) y el valor resultante se dividió entre el área total, que comprende el área de la zona fotografiada.

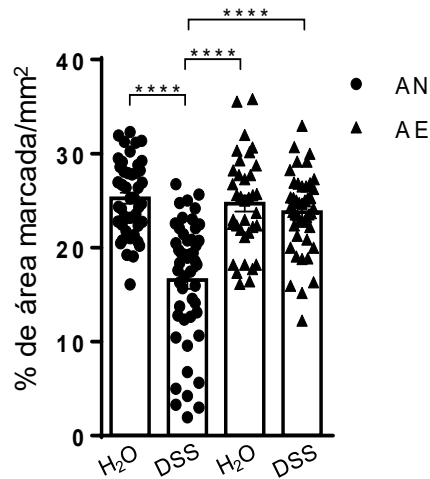
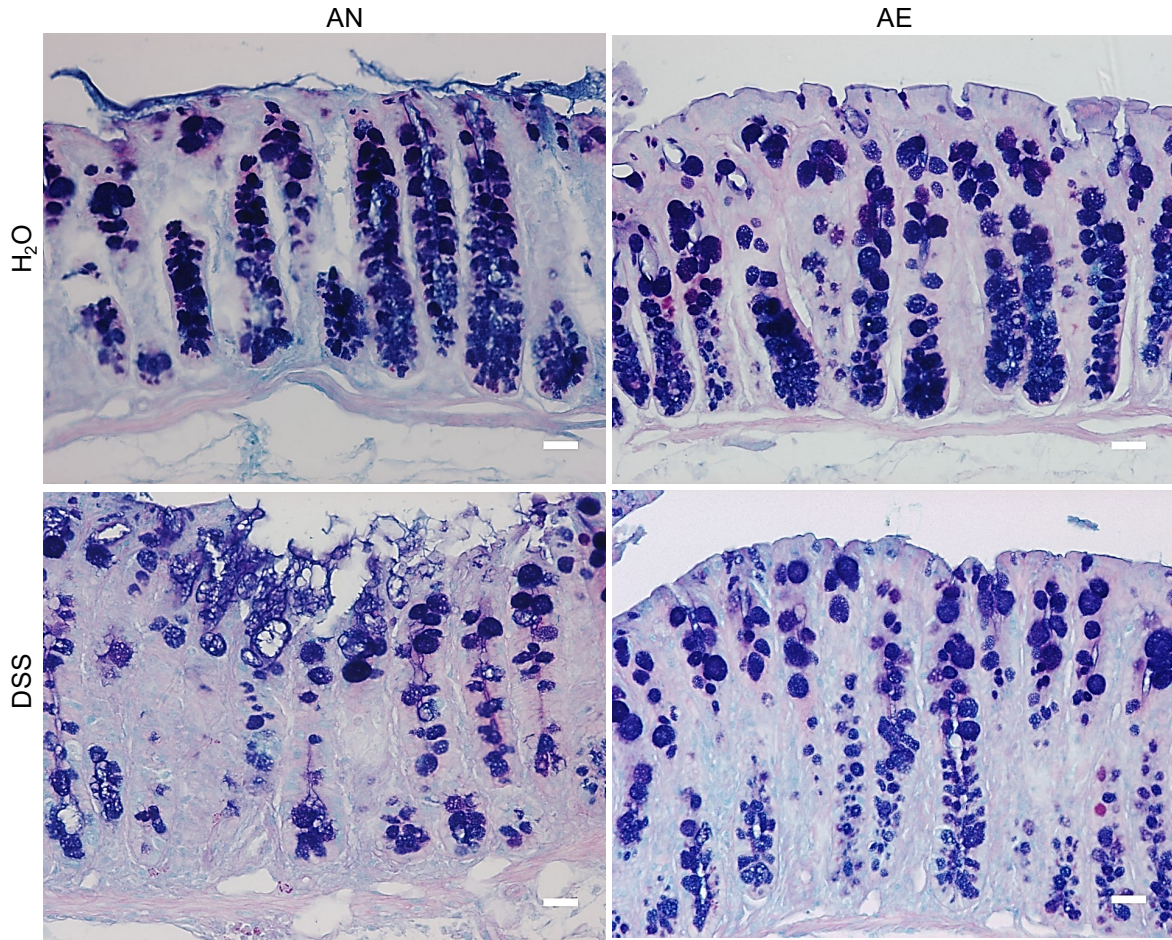
En concordancia a lo reportado por Nowarsky *et al.*, 2015, la administración de DSS a ratones que habitaron el AN (AN/DSS) genera un incremento de IL-18 que correlaciona con la disminución significativa del área de células caliciformes, en comparación con ratones expuestos al AN que no recibieron DSS (AN/H<sub>2</sub>O), determinada como una reducción en el área ocupada por las células caliciformes (Fig. 8). Similar a los niveles de IL-18 madura observados en el colon de ratones que habitaron en el AN o en el AE y bebieron H<sub>2</sub>O (Fig. 4), el área ocupada por células caliciformes en el colon de ratones expuestos al AE (AE/H<sub>2</sub>O), fue similar a la de ratones expuestos al AN con H<sub>2</sub>O (AN/H<sub>2</sub>O) (Fig. 8). Finalmente, el AE previno la pérdida de células caliciformes debido a la inducción de colitis con DSS, ya que el área del colon ocupada por células caliciformes en los animales del AE que bebieron DSS (AE/DSS) fue similar al área de los animales que solo bebieron H<sub>2</sub>O (AN/H<sub>2</sub>O y AE/H<sub>2</sub>O) y significativamente mayor al área ocupada por células



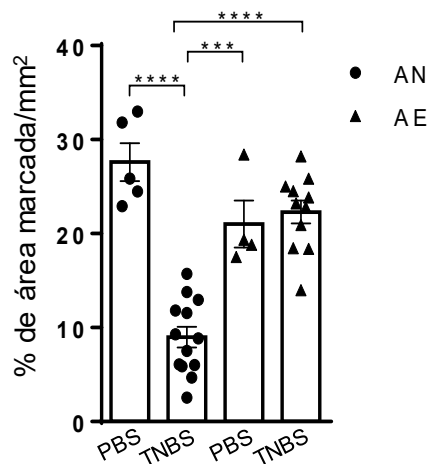
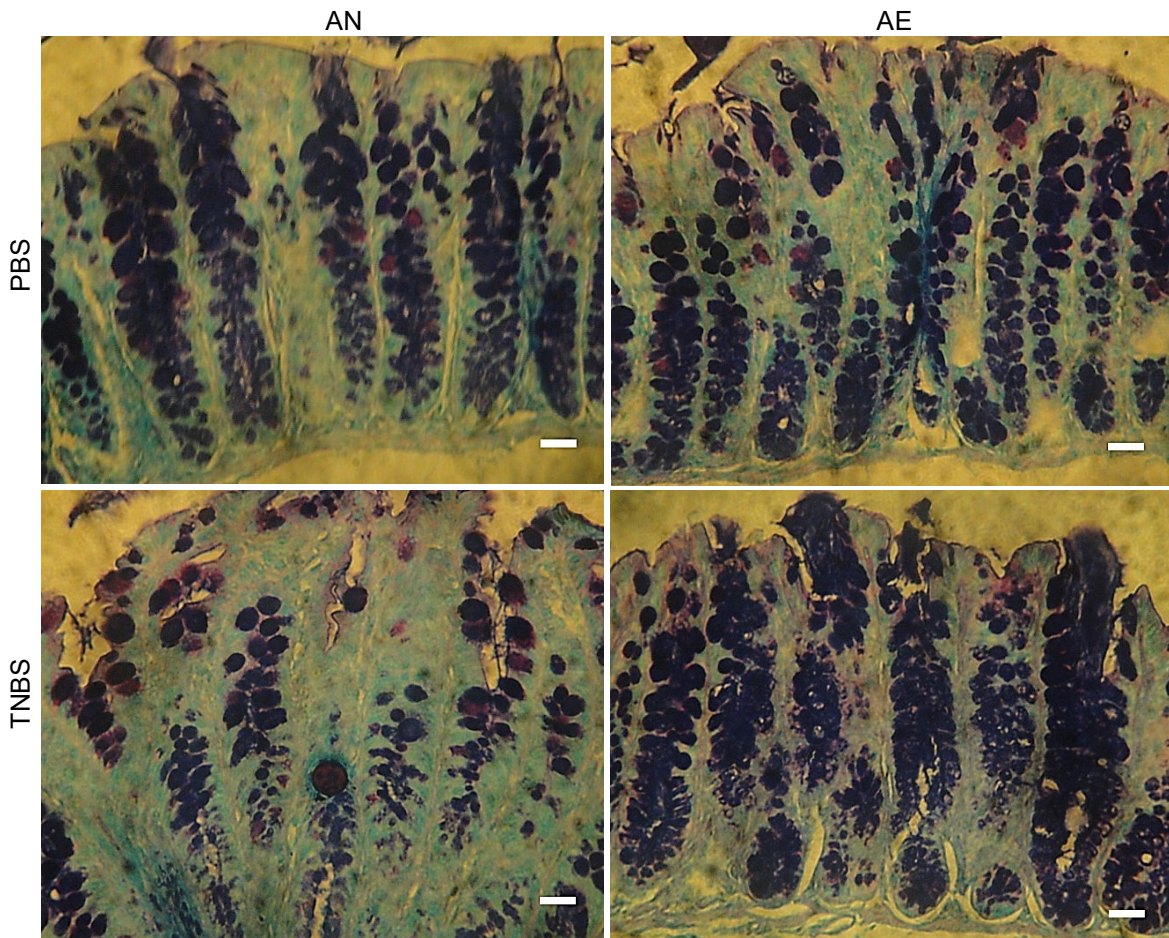
caliciformes en el colon de ratones sometidos al AN con colitis (AN/DSS) (Fig. 8). Lo anterior correlaciona con Blazejewski *et al.*, 2017, quien observa que la disminución del nivel de activación de caspasa 1 (similar a lo mostrado en los niveles de procaspasa 1 y caspasa1 en ratones C57BL/6, Fig. 6A y 6B) disminuye la pérdida de células caliciformes en el intestino, debido a la reducción en el nivel de IL-18 en ratones Caspasa 1<sup>-/-</sup> a los cuales se les indujo colitis con DSS. Los datos anteriores indican que ratones C57BL/6 con un proceso inflamatorio expuestos al AE (AE/DSS) exhiben una resistencia a la pérdida de células caliciformes en relación con ratones sometidos al ambiente estándar con administración de DSS (AN/DSS).

Consistente con los resultados de células caliciformes en ratones C57BL/6 (Fig. 8), ratones Balb/C a los que se les indujo colitis y habitaron el AN (AN/TNBS) muestran una disminución significativa del área de células caliciformes en comparación con ratones que habitaron en el AN sin inducción de colitis (AN/PBS) (Fig. 9). De la misma manera, el área correspondiente a células caliciformes de ratones con colitis que habitaron en condiciones estándar (AN/TNBS) disminuye significativamente con respecto al valor del área de células caliciformes de ratones que habitaron el AE con colitis (AE/TNBS) (Fig. 9). Por otra parte, los valores para el área de células caliciformes de ratones sometidos al AE con administración de PBS (AE/PBS) o el AE con colitis (AE/TNBS) son semejantes entre sí (Fig. 9). En cambio, se observa una tendencia en la disminución del valor de células caliciformes en ratones expuestos al AE con PBS (AE/PBS) en comparación con ratones sometidos al AN (AN/PBS) (Fig. 9). Lo anterior sugiere que el AE es capaz de prevenir la disminución de células caliciformes en un modelo murino de inducción de colitis con TNBS.

En conjunto, los datos generados en dos modelos murino de colitis sugieren que el AE es capaz de disminuir el daño en el intestino ocasionado por la inducción de colitis al prevenir la pérdida de células caliciformes; lo anterior correlaciona con la disminución del nivel de IL-18 y a su vez, la disminución de IL-18 se asocia a la reducción en la expresión de caspasa 1, de esta forma disminuyendo el daño asociado a elevados niveles de IL-18 durante un proceso inflamatorio en el intestino.



**Figura 8. La exposición a condiciones de enriquecimiento disminuye la pérdida de células caliciformes en ratones C57BL/6.** Se obtuvieron cortes histológicos de segmentos del colon proximal de ratones C57BL/6 expuestos a condiciones de enriquecimiento (AE) o condiciones estándar (AN) durante dos meses y sometidos a la inducción de colitis con DSS. Los cortes histológicos fueron teñidos con la tinción PAS (Periodic Acid Schiff)/Alcian azul, específica para la detección de mucinas. En la gráfica se muestran los valores del área correspondientes a células caliciformes (dividiendo el valor de área correspondiente a células caliciformes de "x" condición entre el valor de área total) así como el SEM (Error Estándar de la Media) de dos experimentos independientes, con una N total de 45 zonas evaluadas por cada condición. Las fotografías fueron tomadas con el microscopio NIKON ECLIPSE E600 con el objetivo 20x, usando la cámara digital Nikon DXM 1200. Barra de escala: 25  $\mu$ m. Para el análisis estadístico se realizaron pruebas de ANOVA de una vía seguida por prueba de Tukey., \*\*\*\* $p < 0.0001$ .



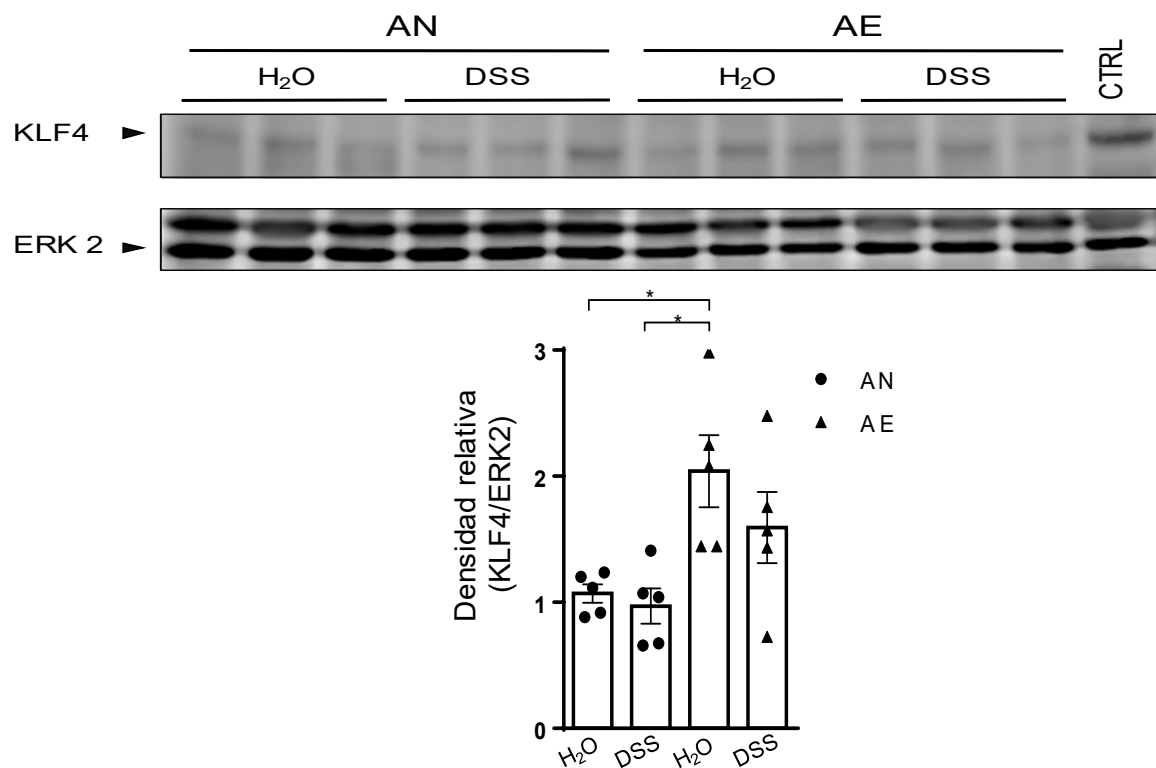
**Figura 9. La exposición a condiciones de enriquecimiento disminuye la pérdida de células caliciformes en ratones Balb/C.** Se obtuvieron cortes histológicos de segmentos del colon proximal de ratones Balb/C expuestos a condiciones de enriquecimiento (AE) o condiciones estándar (AN) durante un lapso de dos meses y sometidos a la inducción de colitis con TNBS. Los cortes histológicos fueron teñidos con la tinción PAS (Periodic Acid Schiff)/Alcian azul, específica para la detección de mucinas. En la gráfica se muestran los valores del área correspondientes a células caliciformes (dividiendo el valor de área correspondiente a células caliciformes de "x" condición entre el valor de área total) así como el SEM (Error Estándar de la Media) de un solo experimento, con una N total de 4-10 zonas evaluadas por cada condición. Las fotografías fueron tomadas con el microscopio NIKON ECLIPSE TE 300 con el objetivo 40x. Barra de escala: 25  $\mu$ m. Para el análisis estadístico se realizaron pruebas de ANOVA de una vía seguida por prueba de Tukey., \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

#### **6.4 La exposición al AE induce un incremento en el nivel de proteína de KLF4 en ratones C57BL/6 y Balb/C.**

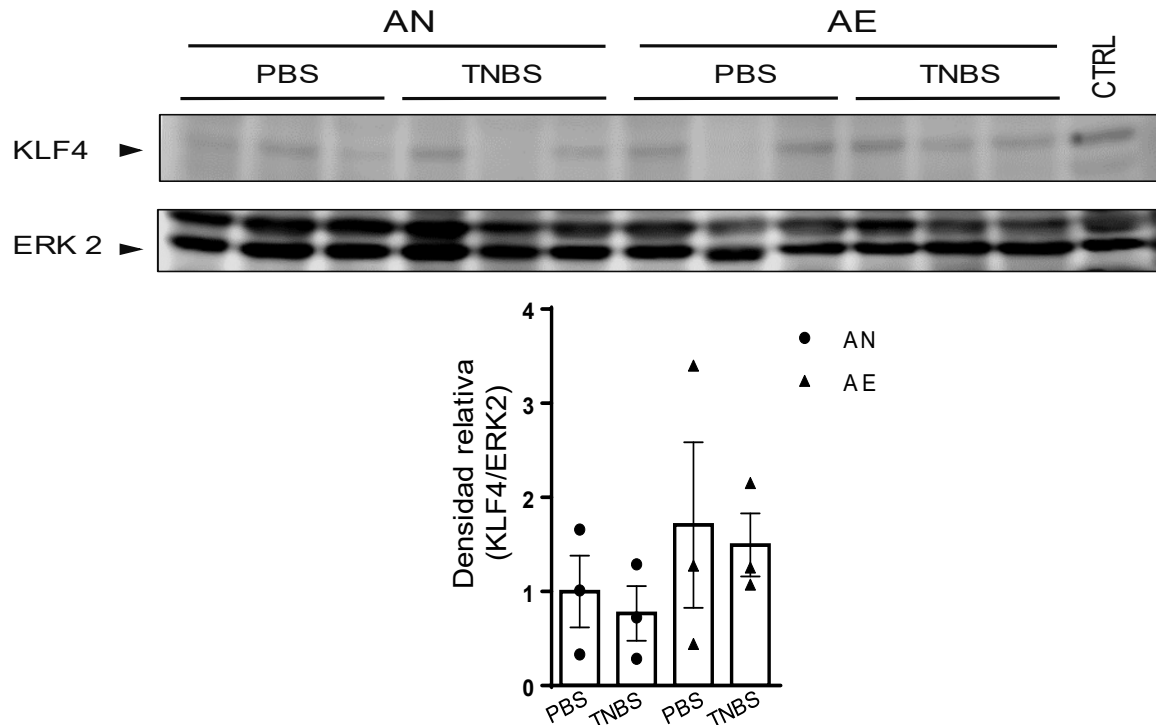
Finalmente, evaluamos los niveles de KLF4 (Kruppel like factor 4), factor transcripcional involucrado en la maduración de células caliciformes el cual disminuye debido a un incremento en los niveles de IL-18 (Nowarski *et al.*, 2015), mediante análisis de Western blot.

Contrario a lo reportado por Nowarski *et al.*, 2015, no encontramos diferencia significativa en los niveles de KLF4 entre ratones C57BL/6 que habitaron el AN con o sin administración de DSS; a pesar de ello se observa una ligera reducción, no significativa, en el nivel de KLF4 en animales tratados con DSS (AN/DSS) en relación con ratones sin inducción de colitis (AN/H<sub>2</sub>O) (Fig.10). Sorprendentemente, similar a lo que sucede con los niveles de procaspasa 1 y caspasa 1 (Fig. 6A y 6B), la exposición al AE en ausencia de colitis (AE/H<sub>2</sub>O) incrementa significativamente, aproximadamente dos veces, los niveles de KLF4 en comparación con los niveles observados en animales que habitaron el AN/H<sub>2</sub>O (Fig. 10). En cambio, la inducción de colitis a ratones sometidos al AE (AE/DSS) exhibe una tendencia hacia disminuir el nivel de KLF4 en comparación con el nivel de KLF4 mostrado en ratones expuestos al AE que bebieron H<sub>2</sub>O (AE/H<sub>2</sub>O) (Fig. 10). Finalmente, el nivel de KLF4 de ratones expuestos al AE con colitis (AE/DSS) muestra una tendencia hacia el incremento, aproximadamente 0.5 veces, en comparación con ratones expuestos al AN con colitis (AN/DSS) (Fig. 10).

De acuerdo con lo anterior, la inducción de colitis en ratones Balb/C no generó cambios significativos en los niveles de KLF4 en ratones que habitaron en el AN (AN/TNBS) respecto al grupo de ratones control (AN/PBS). Sin embargo, se observa una reducción (no significativa) en el nivel de KLF4 de animales tratados con TNBS (AN/TNBS) con respecto a ratones sin inducción de colitis (PBS) (Fig. 11). Asimismo, la exposición al AE promovió un aumento, no significativo, en los niveles de KLF4 (AE/PBS) en comparación con el nivel KLF4 de ratones que habitaron el AN con administración de PBS (AN/PBS) (Fig. 11). Por otra parte, la inducción de colitis en animales expuestos al AE (AE/TNBS) muestra una tendencia hacia la disminución de los niveles de KLF4 en comparación con animales expuestos al AE que recibieron PBS (AE/PBS) (Fig. 11). Finalmente, los ratones sometidos al AE con colitis (AE/TNBS) presentan una tendencia hacia el incremento de KLF4 en relación con el nivel de KLF4 de ratones expuestos al AN con colitis (AN/TNBS) (Fig. 11). A pesar de que ninguno de estos cambios haya sido estadísticamente diferente, estos datos sugieren que en nuestras condiciones la colitis no afecta los niveles de KLF4 en ninguno de los dos modelos evaluados. En cambio, los datos muestran que en nuestras condiciones la exposición al AE incrementa los niveles de KLF4 en comparación con las condiciones de habitación estándar.



**Figura 10. La exposición al AE modifica los niveles de KLF4 en ratones C57BL/6.** Se obtuvieron extractos proteicos totales de segmentos del colon proximal de ratones C57BL/6 expuestos a condiciones de enriquecimiento (AE) o condiciones estándar (AN) durante dos meses y sometidos a la inducción de colitis con DSS. Se utilizaron 30 microgramos de extracto proteico para análisis de Western Blot, empleando anticuerpos específicos contra KLF4 o ERK2. Los niveles de ERK2 se utilizaron como control de carga. En la gráfica se muestran los valores de densitometría correspondientes al nivel de KLF4 (dividiendo el valor de KLF4 entre el valor de ERK2) así como el SEM (Error Estándar de la Media) de dos experimentos independientes, con una N total de 5 animales. Para el análisis estadístico se realizaron pruebas de ANOVA de una vía seguida por prueba de Tukey. \*p <0.05.



**Figura 11. La exposición al AE modifica los niveles de KLF4 en ratones Balb/C.** Se obtuvieron extractos proteicos totales de segmentos del colon proximal de ratones Balb/C expuestos a condiciones de enriquecimiento (AE) o condiciones estándar (AN) durante un lapso de dos meses y sometidos a la inducción de colitis con DSS. Se utilizaron 30 microgramos de extracto proteico para análisis de Western Blot, empleando anticuerpos específicos contra KLF4 o ERK2. Los niveles de ERK2 se utilizaron como control de carga. En la gráfica se muestran los valores de densitometría correspondientes al nivel de KLF4 (dividiendo el valor de KLF4 entre el valor de ERK2) así como el SEM (Error Estándar de la Media) de un experimento, con una N total de 3 animales. Para el análisis estadístico se realizaron pruebas de ANOVA de una vía seguida por prueba de Tukey.

## 7. DISCUSIÓN

EL modelo de estudio conocido como ambiente enriquecido (condiciones habitacionales que promueven estimulación sensorial, visual, cognitiva, motora y social) (Nithianantharajah *et al.*, 2006; Reynolds *et al.*, 2010; Shono *et al.*, 2011), modula el funcionamiento del sistema nervioso y el sistema inmunológico.

Diversos estudios indican que el AE induce efectos benéficos en ratones en el sistema nervioso (van Praag *et al.*, 2000. A nivel celular, el AE aumenta la ramificación y la longitud de las dendritas (Connor *et al.*, 1982; Faherty *et al.*, 2003; Leggio *et al.*, 2005), el número de espinas dendríticas y el tamaño de las sinapsis en poblaciones neuronales (Rampon *et al.*, 2000) además de aumentar la neurogénesis del hipocampo (Kempermann *et al.*, 1997 and 2002; Bruel-Jungerman *et al.*, 2005). Asimismo, se ha observado un aumento en el peso y el tamaño del cerebro de ratones expuestos a condiciones de enriquecimiento (Rosenzweig *et al.*, 1962). A nivel conductual el AE mejora la capacidad de aprendizaje y la memoria en ratones jóvenes (Tang *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003), reduce la pérdida de memoria en animales de edad avanzada (Bennett *et al.*, 2006), disminuye la ansiedad y aumenta la actividad exploratoria (Schrijver *et al.*, 2002).

Tomando en cuenta los efectos positivos del AE, se ha explorado su impacto sobre diversas enfermedades. En modelos murinos de patologías del sistema nervioso, se observa una recuperación de habilidades motoras en ratas con lesiones en el cerebro expuestas al AE (Oh Isson *et al.*, 1995). En un modelo murino de la enfermedad de Huntington, la exposición al AE reduce la pérdida del número de neuronas en contraste con ratones sometidos al AN (van Dellen *et al.*, 2000). Además, el AE disminuye los niveles de péptidos  $\beta$  amiloide e incrementa la actividad neprisilina en ratones expuestos al AE, en modelos murinos de la enfermedad de Alzheimer (Jankowsky *et al.*, 2005; Lazarov *et al.*, 2005). Así también, la influencia del AE ha sido evaluada en enfermedades como cáncer, reportándose que el AE reduce del crecimiento de tumores en modelos de cáncer de colon, melanoma y páncreas (Cao *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2015). En modelos de obesidad, el AE aumenta la expresión de genes del tejido adiposo pardo al igual que induce un cambio de tejido adiposo blanco a tejido pardo, encargado de disipar el exceso de energía y acumulación de tejido adiposo blanco (Cao *et al.*, 2011). En modelos de diabetes, el AE revierte las alteraciones relacionadas con el metabolismo de glucosa, disminuyendo los niveles de glucosa basal, intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina, así también disminuir el proceso inflamatorio en tejido adiposo visceral (Díaz de León *et al.*, 2013).

Dado que el AE parece modular el ambiente inflamatorio y por tanto atenuar las alteraciones patológicas de diferentes enfermedades en las que la inflamación es un factor central, nuestro grupo de investigación evaluó el impacto del AE en dos modelos murinos de colitis experimental. Los resultados generados indican que el AE reduce el daño asociado a la colitis, previene la pérdida de peso, disminuye el acortamiento de la longitud del colon, aminora el daño al epitelio intestinal, reduce el infiltrado celular en la lámina propia acompañado del descenso en los niveles de

TNF e IL-1 $\beta$  en comparación con ratones expuestos a un AN (Villaseñor *et al.*, en preparación).

Diversos reportes indican que el nivel de IL-18 incrementa significativamente en el suero y biopsias del colon de pacientes con EC y CU (Monteleone *et al.*, 1999; Pizarro *et al.*, 1999; Leach *et al.*, 2008) así como en modelos animales de IBD (Maerten *et al.*, 2004). Elevados niveles de IL-18 incrementan la exacerbación del daño al epitelio intestinal (Ten Hove *et al.*, 2001; Siegmund *et al.*, 2001; Sivakumar *et al.*, 2002; Ishikura *et al.*, 2003; Nowarsky *et al.*, 2015) y el bloqueo de la actividad de IL-18 disminuye la gravedad de la enfermedad. Tomando en cuenta lo anterior, evaluamos el impacto del AE sobre el nivel de IL-18 procesada (es decir, IL-18 activa). Para esto, ratones de la cepa C57BL/6 y Balb/C fueron expuestos al AE o AN, posteriormente se indujo colitis al administrar DSS o TNBS, respectivamente, y se determinaron los niveles proteicos de IL-18 activa mediante análisis de Western Blot.

Similar a lo mostrado por Siegmund *et al.*, 2001; Ten Hove *et al.*, 2001; Sivakumar *et al.*, 2002; Ishikura *et al.*, 2003; Nowarsky *et al.*, 2015, nuestros datos indican que en condiciones de habitación estandar la administración de DSS o TNBS genera inflamación en el intestino e incrementa significativamente el nivel de IL-18 (AN/DSS o AN/TNBS) en comparación con los niveles de esta citocina en ratones con ausencia de daño (AN/H<sub>2</sub>O o AN/PBS). Adicionalmente, el incremento significativo de IL-18 bajo nuestras condiciones y en lo reportado por Ten Hove *et al.*, 2001; Sivakumar *et al.*, 2002; Nowarsky *et al.*, 2015, correlaciona con el aumento del índice de la enfermedad, el incremento del daño a la estructura del epitelio, la disminución de peso, la reducción de la longitud del colon, así como el aumento del nivel de IL-1 $\beta$  y TNF observados por Villaseñor *et al.*, en preparación.

A pesar de que en nuestras condiciones de inducción de colitis observamos un incremento de IL-18 en ratones C57BL/6 y Balb/C que habitaron en el AN (AN/DSS o AN/TNBS, respectivamente), no evaluamos si el incremento de IL-18 resulta en un aumento en la activación de IFN- $\gamma$  (potente inductor de óxido nítrico, molécula tóxica en modelos de colitis con DSS) (Guslandi *et al.*, 1998; Obermeier *et al.*, 1999) (Novick *et al.*, 1999). A pesar de esto, suponemos que observaríamos un efecto similar a lo reportado por Sivakumar *et al.*, 2002 (quien observa un incremento a nivel de RNAm y proteína de INF- $\gamma$  dependiente del nivel de IL-18) debido a que en nuestras condiciones de inducción de colitis la mayor parte de parámetros evaluados asociados al daño en IBD se cumplen, lo que sugiere que los métodos utilizados para la generación de colitis son adecuados.

Cuando se evalúa la influencia del AE en condiciones de ausencia de insulto (AE/H<sub>2</sub>O o AE/PBS) es claro que el AE no modifica los niveles de IL-18, ya que el nivel de IL-18 es semejante a las condiciones control (AN/H<sub>2</sub>O o AN/PBS), lo cual es consistente para ratones de la cepa C57BL/6 como para ratones Balb/C. Lo descrito anteriormente es consistente con estudios que evalúan el impacto del AE sobre otros parámetros inmunológicos. Por ejemplo, el nivel de IL-1 $\beta$ , TNF o actividad mieloperoxidasa (medición indirecta del nivel de infiltrado celular, Krawisz *et al.*, 1984) son semejantes entre ratones expuestos al AE (AE/H<sub>2</sub>O o AE/PBS) o



al AN en ausencia de insulto (AN/H<sub>2</sub>O o AN/PBS) (Villaseñor *et al.*, en preparación). Asimismo, en ausencia de daño el AE no altera el número total de leucocitos o poblaciones de leucocitos (linfocitos, monocitos o neutrófilos) en sangre periférica en comparación con el AN sin insulto (Brod *et al.*, 2017). De la misma forma, no hay diferencia significativa en el número de células T provenientes de timo o ganglios linfáticos de ratones expuestos al AE o al AN. Además, los niveles de IL-2, IL-4, IL-10, IL-17 y GM-CSF son similares entre las condiciones AN vs AE en ausencia de algún insulto (Rattazzi *et al.*, 2016). Lo anterior indica que la exposición al AE no modifica los valores de algunas citocinas o poblaciones de células inmunes en ausencia de insulto a nivel del intestino.

Adicionalmente, observamos que el AE disminuye del nivel de IL-18 madura en el colon resultante de la administración de DSS o TNBS (AE/DSS o AE/TNBS), indicando que el AE puede prevenir el incremento de IL-18 activa en dos modelos diferentes de colitis. Consistente con lo anterior, datos generados en nuestro grupo de investigación indican que el AE no solo modula el nivel de IL-18 sino que también puede influenciar la expresión de IL-1 $\beta$  y TNF, observándose que ratones con colitis inducida con DSS o TNBS y expuestos al AE tienen un decremento en el nivel de IL-1 $\beta$  y TNF en comparación con ratones con colitis que habitaron en condiciones estándar. En conjunto lo anterior sugiere que el AE puede reducir la expresión de citocinas importantes en el desarrollo de un proceso inflamatorio en la mucosa del intestino.

Caspasa 1 es una cisteína proteasa producida en forma de zimógeno (procaspasa 1). Una vez activada participa en la activación de pro IL-1 $\beta$  y pro IL-18, promoviendo la liberación al espacio extracelular en sus formas funcionalmente activas (Gu *et al.*, 1997; Fantuzzi *et al.*, 1999). Debido a que la activación de IL-18 es resultado de la actividad de ICE (IL-1 $\beta$  Converting Enzyme, por sus siglas en inglés) o caspasa 1, se podría pensar que la disminución del nivel de IL-18 en ratones administrados con DSS o TNBS expuestos al AE podría relacionarse con la regulación en la actividad de caspasa 1 (Gu *et al.*, 1997). La inducción de colitis con DSS o TNBS a ratones sometidos al AN (AN/DSS o AN/TNBS) incrementa la producción de procaspasa 1 y activación de caspasa 1 en ambos modelos de colitis en comparación con ratones que habitaron en el AN (AN/H<sub>2</sub>O o AN/PBS). El incremento de procaspasa 1 y caspasa 1 en ratones C57BL/6 o Balb/C sometidos al AN con colitis correlaciona con el incremento significativo de IL-18 de ratones sometidos a las mismas condiciones (AN/DSS o AN/TNBS) en nuestros modelos de inducción de colitis.

El incremento de procaspasa 1 y caspasa 1 no solo ha sido reportado en modelos murinos de las IBD. Estudios clínicos han mostrado un incremento significativo en los niveles de procaspasa 1 y caspasa 1 en biopsias de pacientes con EC o CU, observándose un incremento de IL-1 $\beta$  e IL-18 asociando el aumento de estas citocinas con el incremento del daño al epitelio intestinal, en comparación con biopsias de pacientes control (McAlindon *et al.*, 1998; Monteleone *et al.*, 1999). Lo anterior resalta la participación de caspasa 1 en el desarrollo de inflamación intestinal generada en modelos murinos de colitis por la administración de DSS o TNBS.

Diversos reportes señalan a caspasa 1 como la principal caspasa encargada de la activación de pro IL-18 (Gu *et al.*, 1997; Fantuzzi *et al.*, 1999). Sin embargo, se han reportado otras caspasas involucradas en la activación de IL-18, por ejemplo, caspasa 8 (Uchimaya *et al.*, 2013). Caspasa 8 participa en la activación de pro IL-1 $\beta$  y pro IL-18, siendo activada por dectin-1 y el ligando de Fas (Strasser *et al.* 2009; Gringhuis *et al.* 2012; Latz *et al.* 2013). En modelos murinos de infección sistémica, caspasa 8 participa en la defensa contra infecciones bacterianas, observándose que ratones caspasa 8<sup>-/-</sup> son más susceptibles a infección por *L. monocytogenes*, debido a la disminución del nivel de IL-18, indicando la participación de IL-18 en la eliminación de patógenos intracelulares (Bossaller *et al.*, 2013; Uchiyama *et al.* 2013). Adicionalmente, se ha señalado la participación de caspasa 4 y caspasa 11 en la activación de IL-18. La caspasa 4 participa en la activación de IL-18 en células epiteliales y células de origen mieloide humanas infectadas con *E. coli* o *Salmonella sp.* reduciendo los nichos bacterianos de estas bacterias durante la infección (Knodler *et al.*, 2014; Schmid-Burgk *et al.*, 2015). En el caso de caspasa 11, en modelos murinos de infección con *E. coli* y *C. rodentium*, se ha indicado que caspasa 11 interviene en la activación de IL-1 $\beta$  e IL-18 en macrófagos infectados con estos patógenos promoviendo su eliminación, ya que ratones deficientes de caspasa 11, IL-1 $\beta$  o IL-18 tienen una mayor carga bacteriana y un incremento en la patología intestinal en comparación con ratones control (Liu *et al.*, 2012; Rathinam *et al.*, 2012; Aachoui *et al.*, 2013). Por otra parte, distintas proteasas a caspasas pueden activar a pro-IL-18. Por ejemplo, proteinasa 3, una serina proteasa producida principalmente por neutrófilos, promueve la activación y liberación de IL-18 aun en presencia del inhibidor de caspasa 1 en células epiteliales (Sugawara *et al.*, 2001). Otra proteasa distinta a caspasa 1 relacionada a la activación de IL-18 es granzima B una serina proteasa sintetizada por células NK y linfocitos T CD8<sup>+</sup>, que induce la liberación de IL 18 al espacio extracelular (Omoto *et al.*, 2010). Asimismo, se ha reportado a la quimasa, enzima producida por mastocitos en la activación de pro IL-18 (Omoto *et al.*, 2006). A pesar de que se ha reportado la participación de caspasa 4, caspasa 8, caspasa 11 u otras proteasas distintas de caspasa 1, poco se sabe acerca de si estas caspasas o proteasas participan en el incremento del nivel de IL-18 durante la inflamación intestinal inducida por DSS o TNBS, contribuyendo a la exacerbación del daño al epitelio intestinal.

Por otra parte, animales C57BL/6 expuestos al AE y que bebieron H<sub>2</sub>O (AE/H<sub>2</sub>O) observamos un incremento del nivel procaspasa 1 y caspasa 1 madura en comparación con animales sometidos al AN/H<sub>2</sub>O. En cambio, en ratones Balb/C hay una ligera disminución del nivel de procaspasa 1, sin embargo, el incremento de caspasa 1 es consistente con lo observado en ratones C57BL/6, en animales sometidos al AE/PBS. La exposición de animales al AE en ausencia de insulto no genera modificaciones en los valores de algunas citocinas o poblaciones de células inmunológicas (Rattazzi *et al.*, 2016; Brod *et al.*, 2017; Villaseñor *et al.*, en preparación). Curiosamente, nosotros no observamos el mismo efecto sobre los niveles de procaspasa 1 y caspasa 1 en animales sometidos al AE en ausencia de colitis. Tomando en cuenta que el AE incrementa la actividad motora (Nithianantharajah *et al.*, 2006), el incremento en los niveles de procaspasa 1 y caspasa 1 posiblemente esté relacionado con un aumento en la actividad física lo

cual recapitularía lo reportado por Shirato *et al.*, 2017, quienes sugieren que un incremento en la actividad física induce un aumento de procaspasa 1 y caspasa 1.

Los niveles de procaspasa 1 y caspasa 1 de ratones C57BL/6 que habitaron en el AE sin insulto (AE/H<sub>2</sub>O), son más elevados en comparación con ratones que habitaron el AE con colitis (AE/DSS). En cambio, en ratones Balb/C hay un incremento en el nivel de procaspasa 1 y caspasa 1 de ratones sometidos el AE con colitis (AE/TNBS) en comparación con ratones expuestos al AE/PBS. Por otra parte, ratones C57BL/6 o Balb/C expuestos al AE con colitis (AE/DSS o AE/TNBS, respectivamente) exhiben una disminución del nivel de procaspasa 1 y caspasa 1 (únicamente caspasa 1 en ratones Balb/C) en comparación con los ratones de estas cepas que habitaron en el AN con inducción de colitis (AN/DSS o AN/TNBS). Lo anterior sugiere que el AE mediante la regulación de la expresión de procaspasa 1 y caspasa 1 y con ello la disminución del nivel de IL-18 puede reducir el proceso inflamatorio en el colon en dos modelos distintos de colitis. En conjunto, la exposición al AE modifica los niveles de expresión de procaspasa 1 y caspasa 1 en ratones C57BL/6 y Balb/C (promoviendo un incremento) en ausencia de insulto. En cambio, cuando se genera daño con la administración de DSS o TNBS el AE reduce el nivel de procaspasa 1 y caspasa 1 en ratones C57BL/6 pero únicamente caspasa 1 en ratones Balb/C, a nivel del intestino. Debido a la alta variabilidad en los valores de procaspasa 1 y caspasa 1 de animales Balb/C no observamos un efecto similar como en ratones C57BL/6, por ello es necesario incrementar el número de ratones evaluados para la obtención de resultados más robustos.

Finalmente, ratones con colitis expuestos al AE (AE/DSS o AE/TNBS) muestran una disminución del nivel de caspasa 1 en comparación con ratones con colitis expuestos al AN (AN/DSS o AN/TNBS). Lo anterior podría asociarse con la disminución del nivel de IL-1 $\beta$  (Villaseñor *et al.*, en preparación) e IL-18, que se refleja en la disminución del índice de la enfermedad, la reducción del daño al epitelio intestinal, la resistencia a la pérdida de peso observado por Villaseñor *et al.*, en preparación, en las mismas condiciones de tratamiento. Dado que caspasa 1 contribuye con la activación de pro IL-1 $\beta$  y pro IL-18 (Gu *et al.*, 1997; Fantuzzi *et al.*, 1999), se ha estudiado el efecto relacionado con la eliminación o el uso de inhibidores de caspasa 1 (Pralnasacan) en modelos murinos de colitis. Los reportes muestran una reducción en la patología de la enfermedad, reflejado en la disminución del índice de la enfermedad, menor pérdida de peso, disminución en la pérdida de longitud del colon y un decremento en los niveles de IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  e IL-18 (Siegmond *et al.*, 2001; Loher *et al.*, 2004; Bauer *et al.*, 2010; Blazejewski *et al.*, 2017). Inclusive, la inhibición de caspasa 1 (Siegmond *et al.*, 2001) tiene un efecto más significativo en la reducción del daño asociado a colitis en comparación con la neutralización de IL-1 $\beta$  e IL-18 (Siegmond *et al.*, 2001; Ten Hove *et al.*, 2001; Sivakumar *et al.*, 2002) indicando que caspasa 1 es un factor importante en el establecimiento de inflamación en modelos murinos de colitis. En conjunto, el AE induce un aumento en el nivel de procaspasa 1 y caspasa 1 en ausencia de insulto. Sin embargo, la generación colitis en ratones sometidos al AE (AE/DSS o AE/TNBS) reduce la expresión de procaspasa 1 y caspasa 1 y probablemente esto correlacione con la disminución de la patología de la enfermedad.

Las células caliciformes son el linaje de células secretoras más abundante del intestino. Estas células producen y secretan mucinas que conforman la capa de moco que recubre el intestino, el cual promueve la eliminación del contenido intestinal y constituye la primera línea de defensa contra el infiltrado microbiano en la lámina propia del intestino. Durante el desarrollo de IBD hay una reducción del grosor en la barrera de moco, acompañado de una disminución del número de células caliciformes y secreciones antimicrobianas, un aumento de la permeabilidad intestinal y una pérdida del epitelio donde se produce la ulceración (Andrianifahanana *et al.*, 2006; Johansson *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2010; Johansson *et al.*, 2013). Debido a que el incremento de IL-18 contribuye a la exacerbación del daño en el colon (Siegmond *et al.*, 2001; Ten Hove *et al.*, 2001; Sivakumar *et al.*, 2002; Wirtz *et al.*, 2002; Ishikura *et al.*, 2003) disminuyendo el número de células caliciformes (Nowarsky *et al.*, 2015) durante el desarrollo de colitis; y que el AE previene el incremento de IL-1 $\beta$  (Villaseñor *et al.*, en preparación), IL-18, así como reducir el nivel de expresión de procaspasa 1 y caspasa 1, nos preguntamos si la exposición de animales con colitis al AE reduciría la pérdida de células caliciformes, previniendo el daño al epitelio intestinal.

La administración de DSS o TNBS a ratones que habitaron el AN (AN/DSS o AN/TNBS) disminuye significativamente el área ocupada por las células caliciformes en comparación con ratones expuestos al AN con administración de H<sub>2</sub>O o PBS (AN/H<sub>2</sub>O o AN/PBS). Lo anterior es consistente con lo reportado por Nowarsky *et al.*, 2015, mostrando una reducción del número de células caliciformes en el colon de ratones a los que se les administró DSS, relacionado al incremento en el nivel de IL-18. Por otra parte, la disminución del grosor en la capa de moco debido al decremento de células caliciformes correlaciona con lo observado por Villaseñor *et al.*, en preparación, quienes observan un incremento del daño a la estructura del epitelio, disminución de peso y reducción de la longitud del colon en el mismo modelo murino de colitis. Adicionalmente, otros reportes indican la participación de IL-18 en la gravedad causada por las IBD. La administración IL-18BP (regulador negativo de IL-18) a modelos murinos de inducción de colitis con DSS o TNBS, indica que IL-18BP bloquea la biodisponibilidad de IL-18 reduciendo la pérdida de peso, la infiltración celular, destrucción de la cripta y ulceración del intestino grueso, sugiriendo que la disminución en la gravedad de la enfermedad es dependiente de la concentración de IL-18BP utilizada (Ten Hove *et al.*, 2001; Sivakumar *et al.*, 2002). En conjunto, esto sugiere que la administración de DSS o TNBS induce un incremento en el nivel de IL-18 que promueve mayor daño al intestino debido a la pérdida de células caliciformes en ambas cepas de ratón.

A nivel del sistema nervioso el AE promueve la neurogénesis en el hipocampo aumentando la proliferación y supervivencia de células progenitoras neurales (Kempermann *et al.*, 1997 and 2002; Bruel-Jungerman *et al.*, 2005; Salmaso *et al.*, 2012). A pesar de lo anterior, poco se conoce sobre si el AE impulsa el aumento de células progenitoras en otros sitios del cuerpo, por ejemplo, el colon. Bajo nuestras condiciones, la exposición de ratones C57BL/6 al AE/H<sub>2</sub>O no modifica el área ocupada por células caliciformes, siendo similar a ratones expuestos al AN/H<sub>2</sub>O. En cambio, en ratones Balb/C hay una ligera disminución del área ocupada por células

caliciformes de ratones expuestos al AE/PBS en comparación con ratones del AN/PBS, pero suponemos que es debido a un menor número de zonas del colon evaluadas debiendo aumentar las zonas evaluadas para obtener resultados más robustos. En conjunto, lo anterior sugiere que similar a lo observado en los niveles de enzimas (mieloperoxidasa), citocinas y/o poblaciones de leucocitos (Rattazzi *et al.*, 2016; Brod *et al.*, 2017; Villaseñor *et al.*, en preparación) la exposición de animales al AE en ausencia de insulto no modifica sus niveles, siendo similares a ratones expuestos al AN (AN/H<sub>2</sub>O o AN/PBS). Tomando en cuenta lo anterior, no debe descartarse un aumento de progenitores celulares en el colon inducidos por el AE, hasta evaluar marcadores celulares específicos para células progenitoras o inclusive la presencia de factores transcripcionales como Notch1 y Hes1, que determinan la diferenciación de estos progenitores (McCauley *et al.*, 2015) hacia enterocitos (Jensen *et al.*, 2000; Fre *et al.*, 2005; van Es *et al.*, 2005); o factores como Math1, Gfi1, Spdef y Klf4 relacionados con la diferenciación de células progenitoras hacia células de Paneth, células neuroendocrinas y células caliciformes (Yang *et al.*, 2001; Katz *et al.*, 2002; Shroyer *et al.*, 2005; Gregorieff *et al.*, 2009; Noah *et al.*, 2010). Lo anterior sugiere que someter ratones al AE no modifica el número de células caliciformes (valor representado por el área ocupada por células caliciformes) en ausencia de insulto a nivel del intestino.

Por otra parte, el AE previno la pérdida de células caliciformes en ambos modelos de colitis, ya que el área ocupada por células caliciformes en el colon de animales sometidos al AE/DSS o AE/TNBS tienen un área más elevada en relación con ratones que habitaron el AN/DSS o AN/TNBS, respectivamente. Inclusive, animales sometidos al AE/DSS o AE/TNBS muestran un área similar al área ocupa por células caliciformes en animales que habitaron el AE/H<sub>2</sub>O o el AE/PBS, respectivamente. El efecto benéfico del AE en la reducción del daño relacionado a colitis no se limita a prevenir la pérdida de células caliciformes, resultados en nuestro laboratorio indican que además el AE previene la pérdida de longitud del colon y daño al epitelio intestinal (Villaseñor *et al.*, en preparación). Similar a lo que observamos en nuestros modelos murinos de inducción de colitis y su exposición al AE; estudios en modelos murinos de la Enfermedad de Parkinson (Bezard *et al.*, 2003) y Enfermedad de Hountintong (Glass *et al.*, 2004) muestran que el AE previene la disminución del número de células nerviosas, inclusive el AE promueve un aumento en los precursores neuronales en comparación con ratones sometidos al AN. Asimismo, ratones con isquemia cerebral sometidos al AE muestran un incremento en las poblaciones de astrocitos y oligodendrocitos, sugiriendo que el AE promueve un incremento de progenitores neuronales, así como poblaciones de células con mayor grado de diferenciación (Komitova *et al.*, 2002; 2005; 2006). En conjunto, lo anterior sugiere que la exposición a condiciones de enriquecimiento previene la pérdida de células, ya sean células del colon o del cerebro, en respuesta a distintos promotores de daño. En nuestro modelo, la disminución en la pérdida de células caliciformes a nivel del intestino correlaciona con una reducción en activación de caspasa 1 y la disminución de IL-18 en ratones con inducción de colitis expuestos al AE.

Por último, evaluamos los niveles de KLF4, un factor transcripcional involucrado en la maduración de células caliciformes. Reportes previos en modelos murinos de

colitis indican que un incremento del nivel de IL-18 incrementa el daño al epitelio intestinal (Ten Hove *et al.*, 2001; Sivakumar *et al.*, 2002) y disminuye el número de células caliciformes maduras en el colon relacionado al decremento del nivel de KLF4 (Nowarski *et al.*, 2015). Contrario a lo reportado por Nowarski *et al.*, 2015, bajo nuestras condiciones, la administración de DSS o TNBS a ratones expuestos al AN (AN/DSS o AN/TNBS) no reduce de forma significativa los niveles de KLF4 en comparación con ratones sometidos al AN/H<sub>2</sub>O o AN/PBS, respectivamente.

Tomando en cuenta que Nowarski *et al.*, 2015 empleó ratones deficientes del regulador negativo de IL-18 (IL-18bp<sup>-/-</sup>) en la inducción de colitis y determinación de los niveles de KLF4, probablemente estos animales (IL-18bp<sup>-/-</sup>) tenían un sobre exceso en el nivel de IL-18 (un mayor nivel de IL-18 en relación al nivel de IL-18 de animales WT con inducción de colitis en nuestras condiciones) y por lo tanto hay una reducción del nivel de KLF4, relacionado al incremento en el nivel de IL-18. Estos datos indican que, bajo nuestras condiciones en dos modelos de inducción de colitis, el incremento en el nivel de IL-18 no influye en la expresión de KLF4 y probablemente se requiera de la administración exógena de IL-18 a los animales que se les indujo colitis para recapitular lo mostrado por Nowarski *et al.*, 2015.

KLF4 es un factor transcripcional que controla la diferenciación del linaje celular y mantenimiento de la homeostasis epitelial en el intestino, expresándose en células epiteliales diferenciadas (Ghaleb *et al.*, 2011). Ratones deficientes de KLF4 muestran una reducción en el número de células caliciformes en el colon (Katz *et al.*, 2002). Sin embargo, estudios adicionales sugieren que KLF4 no solo participa en la maduración de células caliciformes, sino que también controla el número de células caliciformes regulando la proliferación celular en el intestino inhibiendo un exceso en la proliferación celular del intestino (Yu *et al.*, 2012). Ratones C57BL/6 y Balb/C sometidos al AE en ausencia de colitis (AE/H<sub>2</sub>O o AE/PBS, respectivamente) incrementan el nivel de KLF4 en comparación con animales expuestos al AN en ausencia de insulto (AN/H<sub>2</sub>O o AN/PBS). Estos datos sugieren que la exposición al AE promueve un incremento en los niveles de KLF4, sin embargo, el aumento de KLF4 probablemente sea en respuesta a un incremento en la división de células poco diferenciadas localizadas en la base de las Criptas de Lieberkühn, con ello el incremento de KLF4 actuaría como inhibidor del ciclo celular en células que se dividen además de promover la maduración de las células inmaduras y en cierto grado promover un incremento en la secreción de moco por parte de las células caliciformes.

Similar a lo observado con los niveles de KLF4 en animales que habitaron el AE sin insulto (AE/H<sub>2</sub>O o AE/PBS), el nivel de KLF4 es ligeramente más elevado en animales expuestos al AE con inducción de daño (AE/DSS o AE/TNBS) en relación con sus contrapartes (AN/DSS o AN/TNBS), posiblemente debido a la exposición a condiciones de enriquecimiento. Sin embargo, el nivel de KLF4 tiene una ligera disminución en animales C57BL/6 o Balb/C expuestos al AE/DSS o AE/TNBS, respectivamente, en comparación con ratones expuestos al AE sin insulto (AE/H<sub>2</sub>O o AE/PBS), pudiendo ser resultado de la administración de DSS o TNBS, agentes químicos que promueven daño a la integridad del intestino, disminuyendo el número de células maduras en el intestino y de esta manera inducir una ligera reducción en

los niveles de KLF4. Estos datos ponen de manifiesto que en nuestras condiciones la exposición al AE induce un incremento en los niveles de KLF4, a nivel de proteína, incluso en animales con inducción de colitis y que habitaron las condiciones de enriquecimiento (AE/DSS o AE/TNBS) en contraste con las condiciones de habitación estándar.

## 8. CONCLUSIONES

- 1) La exposición al AE previene el incremento de IL-18 en ratones C57BL/6 y Balb/C en respuesta al daño causado por la administración de DSS o TNBS, respectivamente.
- 2) El AE modula los niveles de procaspasa 1 y caspasa 1 en ausencia o en presencia de colitis. Sin embargo, la inducción de colitis con DSS y exposición al AE reduce la expresión de procaspasa 1 así como disminuir el procesamiento y/o activación de caspasa 1 en ratones C57BL/6.
- 3) El alojamiento en habitaciones con enriquecimiento ambiental reduce la pérdida de células calciformes en el intestino grueso, generada por la administración de DSS o TNBS a ratones C57BL/6 o Balb/C, respectivamente.
- 4) Bajo nuestras condiciones la administración de DSS o TNBS a ratones C57BL/6 o Balb/C, respectivamente, reduce (de forma no significativa) el nivel de KLF4 en condiciones de habitación estándar. Asimismo, el someter ratones al enriquecimiento ambiental incrementa el nivel de KLF4 en presencia o ausencia de insulto en ambos modelos murinos de colitis.



## 9. PERSPECTIVAS

En este trabajo de investigación se determinó que el alojamiento en condiciones de enriquecimiento reduce el nivel de IL-18 en dos modelos murinos de colitis, lo cual correlaciona con una disminución del daño asociado al epitelio intestinal. La disminución del nivel de IL-18 durante el desarrollo de colitis ya ha sido estudiado por otros grupos de investigación mediante aproximaciones diferentes al enriquecimiento ambiental. Por ejemplo, ratones deficientes de IL-18 (IL-18<sup>-/-</sup>) (Kanai *et al.*, 2001), mediante el uso de anticuerpos anti-IL-18 (Kanai *et al.*, 2001; Siegmund *et al.*, 2001) o administrando IL-18BP (regulador negativo de IL-18) (Ten Hove *et al.*, 2000; Sivakumar *et al.*, 2002), indicando que la disminución en los niveles de IL-18 durante un proceso inflamatorio intestinal conlleva a una mejora en la enfermedad y demás parámetros relacionados a esta patología.

Debido a que el AE puede modular la expresión de IL-1 $\beta$  y TNF (Villaseñor *et al.*, en preparación) e IL-18, surge la posibilidad de que el AE pueda impactar la expresión de otras citocinas, tales como IL-12, citocina relacionada con el incremento del receptor de IL-18, IL-18R, en células T, células B y células NK (Kim *et al.*, 2001; Nakahira *et al.*, 2001). Asimismo, IL-12 e IL-18 entablan una sinergia incrementando la síntesis de IFN- $\gamma$ , a diferencia de su efecto individual (Ahn *et al.*, 1997; Yoshimoto *et al.*, 1998) potente inductor de óxido nítrico (molécula tóxica en modelos murinos de colitis) (Guslandi *et al.*, 1998; Obermeier *et al.*, 1999) (Novick *et al.*, 1999). Por otra parte, se ha reportado que IL-12 presenta elevadas concentraciones en biopsias de pacientes con EC o CU, y el uso de anticuerpos contra IL-12 en modelos murinos de colitis con TNBS reduce del daño al epitelio intestinal (Neurath *et al.*, 1995), lo que sugiere la participación de IL-12 en la patología de las IBD (Parronchi *et al.*, 1997). Debido a lo anterior, resulta interesante dilucidar si la influencia del AE puede modificar la expresión de IL-12 u otras citocinas o moléculas efectoras con acciones biológicas importantes, como el óxido nítrico. Adicionalmente, evaluar si la exposición de animales con colitis al enriquecimiento ambiental favorece el incremento de IL-18BP, o inclusive promover una reducción en el nivel del receptor para IL-18. Además, determinar si estos efectos son independientes o actúan sinérgicamente para mermar el proceso inflamatorio y daño al epitelio intestinal.

Por otra parte, ratones sometidos al AE con un proceso inflamatorio tienen una reducción en la síntesis de procaspasa 1 y activación de caspasa 1 en ratones C57BL/6 y Balb/C (solo caspasa 1), por lo que se requiere un aumento del número de ratones Balb/C evaluados para generar resultados más veraces. Así también, considerar que la activación de caspasa 1 requiere la participación del inflammasoma (Martinon *et al.*, 2002; Rathinam *et al.*, 2012) por lo que es interesante analizar si el alojamiento en el AE puede influenciar los sistemas encargados del control de la respuesta inflamatoria, como la autofagia. La autofagia regula el nivel de algunos componentes del inflammasoma; por ejemplo, ubiquitina e induce la degradación en el proteosoma de ASC (Inflammasome Adaptor Protein Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing CARD), proteína requerida para la activación de caspasa 1 (Shi *et al.*, 2012). Inclusive, se ha mostrado que en modelos de inducción

de colitis con DSS, ratones deficientes de Atg16L1 tienen una mayor activación de procaspasa 1 generando un incremento de IL-1 $\beta$  e IL-18, sugiriendo la participación de Atg16L1 en el control de la inflamación intestinal (Saitoh *et al.*, 2008). Debido a lo anterior, evaluar estas posibilidades nos daría pauta sobre el mecanismo de acción del AE para contender contra el proceso inflamatorio en la mucosa del intestino.

Por otra parte, el enriquecimiento ambiental reduce la pérdida de células caliciformes en el intestino grueso en ambos modelos de colitis. Sin embargo, este efecto al parecer no está relacionado con el incremento en el número de células caliciformes por lo que la medición de factores transcripcionales como Math1, Gfi1, Spdef asociados a la diferenciación y mantenimiento de células progenitoras hacia células caliciformes (Yang *et al.*, 2001; Katz *et al.*, 2002; Shroyer *et al.*, 2005; Gregorieff *et al.*, 2009; Noah *et al.*, 2010) es necesario para ratificar esta idea. Otra opción sería que el efecto protector del AE no este asociado al incremento en la población de células caliciformes sino este encaminado a incrementar el principal componente del moco que recubre el intestino grueso, las mucinas, principalmente MUC2 (Audie *et al.*, 1993; Weiss *et al.*, 1996) con esto disminuyendo la formación de zonas con daño asociado al decremento en la cantidad de moco en el colon de ratones con colitis.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

Achoui, Y., Leaf, I. A., Hagar, J., Fontana, M., Campos, C. *et al.* (2013). Caspase-11 Protects Against Bacteria That Escape the Vacuole. *Science*. 339: 975-978.

Abraham, C., and Cho, J. (2009). Inflammatory bowel disease. *New England Journal of Medicine*. 361: 2066-2078.

Ahn, H., Maruo, S., Tomura, M., Mu, J., Hamaoka, T., *et al.* (1997). A mechanism underlying synergy between IL-12 and IFN $\gamma$  inducing factor in enhanced production of IFN $\gamma$ . *Journal of Immunology*. 159:2125-2131.

Akolkar, P., Gulwani-Akolkar B., Heresbach, D., Lin, X., Fisher, S. *et al.* (1997). Differences in risk of Crohn's disease in offspring of mothers and fathers with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 92:2241-2244.

Amano, A., Nakagawa, I., and Yoshimori, T. (2006). Autophagy in Innate Immunity against Intracellular Bacteria. *The Journal of Biochemistry*. 140:161-166.

Ananthakrishnan, A., Khalili, H., Konijeti, G., Higuchi, L., de Silva, P. *et al.* (2013). Long-term intake of dietary fat and risk of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut*. 63:776-784.

Anderson, C., Boucher, G., Lees, C., Franke, A., D'Amato, M. *et al.*, (2011). Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat Genet*. 43:246-52.

Andrianifahanana, M., Moniaux, N., and Batra, S. (2006). Regulation of mucin expression: Mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 1765: 189-222.

Arend, W., Malyak, M., Smith, M., Whisenand, T., Slack, J., Sims, J. *et al.* (1994). Binding of IL-1 alpha, IL-1 beta, and IL-1 receptor antagonist by soluble IL-1 receptors and levels of soluble IL-1 receptors in synovial fluids. *J Immunol*. 153: 4766-4774.

Arend, W., Palmer, G. and Gabay, C. (2008). IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunological Reviews*. 223:20-38.

Armaka, M., Apostolaki, M., Jacques, P., Kontoyiannis, D., Elewaut, D. and Kollias, G. (2008). Mesenchymal cell targeting by TNF as a common pathogenic principle in chronic inflammatory joint and intestinal diseases. *The Journal of Experimental Medicine*. 205: 331-337.

Arranz, L., De Castro, N., Baeza, I., Mate, I., Viveros, M. and De la fuente, M. (2010). Environmental enrichment improves age-related immune system impairment; long-term exposure since adulthood increases life span in mice. *Rejuvenation Research*. 13: 415-428.

Atreya, R., Mudter, J., Finotto, S., Müllberg, J., Jostock, T. *et al.* (2000). Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: Evidence in Crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nature Medicine*. 6: 583-588.

Audie, J., Janin, A., Porchet, N., Copin, M., Gosselin, B. and Aubert, J. (1993). Expression of human mucin genes in respiratory, digestive, and reproductive tracts ascertained by in situ hybridization. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 41: 1479-1485.

Bauer, C., Duewell, P., Mayer, C., Lehr, H., Fitzgerald, K. *et al.* (2010). Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome. *Gut*. 59: 1192-1199.

Benaroya-Milshtein, N., Hollander, N., Apter, A., Kukulansky, T., Raz, N. *et al.* (2004). Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. *European Journal of Neuroscience*. 20:1341-1347.

Bennett, J., McRae, P., Levy, L. and Frick, K. (2006). Long-term continuous, but not daily, environmental enrichment reduces spatial memory decline in aged male mice. *Neurobiol. Learn. Mem.* 85: 139-152.

Ben-Sasson, S., Hu-Li, J., Quiel, J., Cauchetaux, S., Ratner, M. *et al.* (2009). IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106: 7119-7124.

Bernstein, C., Wajda, A., Svenson, L., MacKenzie, A., Koehoorn, M. *et al.* (2006). The epidemiology of inflammatory bowel disease in Canada: A population-based study. *The American Journal of Gastroenterology*. 101: 1559-1568.

Beser, O., Conde, C., Serwas, N., Cokugras, F., Kutlu, T. *et al.* (2015). Clinical features of interleukin 10 receptor gene mutations in children with very early-onset inflammatory bowel disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 60: 332-338.

Bezard, E., Dovero, S., Belin, D., Duconger, S., Jackson-Lewis, Przedborski, S. *et al.* (2003). Enriched environment confers resistance to 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine and cocaine: involvement of dopamine transporter and trophic factors. *J. Neurosci.* 23: 10999-11007.

Błażejowski, A., Thiemann, S., Schenk, A., Pils, M., Gálvez, E. *et al.* (2017). Microbiota normalization reveals that an onco-caspase-1 activation exacerbates chemically induced intestinal inflammation. *Cell Reports*. 19: 2319-2330.

BoLeung, B., Culshaw, S., Gracie, J., Hunter, D., Canetti, C. *et al.* (2001). A role for IL-18 in neutrophil activation. *J Immunol*. 167: 2879-86.

Born, T., Thomassen, E., Bird, T. and Sims, J. (1998). Cloning of a novel receptor subunit, AcPL, required for interleukin 18 signaling. *J Biol Chem*. 273: 29445-50.

- Bosques, F., Sandoval, E., Martínez, M., Garza, E. and Maldonado, H. (2011). Epidemiología y características clínicas de la colitis ulcerosa crónica idiopática en el noreste de México. *Rev Gastroenterol Mex.* 76: 34-38.
- Bossaller, L., Chiang, P., Schmidt-Lauber, C., Ganesan, S., Kaiser, W. J., Rathinam, V. A. K. *et al.* (2012). Cutting Edge: FAS (CD95) Mediates Noncanonical IL-1 and IL-18 Maturation via Caspase-8 in an RIP3-Independent Manner. *The Journal of Immunology.* 189: 5508-5512.
- Brod, S., Gobetti T., Gittens, B., Ono, M., Parrenti M. and D'Acquisto, F. (2017). The impact of environmental enrichment on the murine inflammatory immune response. *Journal of Clinical Investigation.* 7: 1-46.
- Bruel-Jungerman, E., Laroche, S. and Rampon, C. (2005). New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *Eur. J. Neurosci.* 21: 513-521.
- Burger, D., Chicheportiche, R., Giri, J. and Dayer, J. (1995). The inhibitory activity of human interleukin-1 receptor antagonist is enhanced by type II interleukin-1 soluble receptor and hindered by type I interleukin-1 soluble receptor. *J Clin Invest.* 96: 38-41.
- Camoglio, L., te Velde, A., de Boer, A. *et al.* (2000). Hapten-induced colitis associated with maintained Th1 and inflammatory responses in IFN-gamma receptor-deficient mice. *Europe Journal of Immunology.* 30:1486-1495.
- Cao, L., Choi, E., Liu, X., Martin, A., Wang, C., Xu, X. and Doring, M. J. (2011). White to Brown fat phenotypic switch induced by genetic and environmental activation of a hypothalamic-adipocyte axis. *Cell Metabolism.* 14:324-338.
- Cao, L., Liu, X., Lin, En-Ju. D., Wang, C., Choi, E. Y., Riban, V. *et al.* (2010). Environmental and genetic activation of a brain-adipocyte BDNF/leptin axis causes cancer remission and inhibition. *Cell.* 142: 52-64.
- Casini-Raggi, V., Kam, L., Chong, Y., Fiocchi, C., Pizarro, T. *et al.* (1995). Mucosal imbalance of IL1 and IL-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. A novel mechanism of chronic intestinal inflammation. *J Immunol.* 154: 2434-2440.
- Cho, J. H. (2008). The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Immunology.* 8:458-466.
- Cleynen, I., Boucher, G., Jostins, L., Schumm, L., Zeissig, S. *et al.* (2016). Inherited determinants of Crohn's disease and ulcerative colitis phenotypes: a genetic association study. *The Lancet.* 387: 156-167.
- Cominelli, F, Nast, C., Clark, B., Schindler, R., Lierena, R., Eysselein, V. *et al.* (1990). Interleukin 1 (IL-1) gene expression, synthesis, and effect of specific IL1 receptor blockade in rabbit immune complex colitis. *J Clin Invest.* 86:972-980.

Cominelli, F., Nast, C., Duchini, A. *et al.* (1992). Recombinant interleukin-1 receptor antagonist blocks the proinflammatory activity of endogenous interleukin-1 in rabbit immune colitis. *Gastroenterology*.103: 65-71.

Connor, J., Wang, E. and Diamond, M. (1982). Increased length of terminal dendritic segments in old adult rats' somatosensory cortex: an environmentally induced response. *Exp. Neurol.* 78: 466- 470.

Conti, B., Jahng, J., Tinti, C., Son, J. and Joh, T. (1997). Induction of interferon-gamma inducing factor in the adrenal cortex. *J Biol Chem.* 272: 2035-2037.

Corbaz, A., ten Hove, T., Herren, S., Graber, P., Schwartzburd, B., Belzer, I. *et al.* (2002). IL-18-binding protein expression by endothelial cells and macrophages is up-regulated during active Crohn's disease. *J Immunol.* 168: 3608-16.

Croucher, P., Mascheretti, S., Hampe, J., Huse, K., Frenzel, H., Stoll, M. *et al.* (2003). Haplotype structure and association to Crohn's disease of CARD15 mutations in two ethnically divergent populations. *European Journal of Human Genetics.* 11: 6-16.

Danese, S., Sans, M. and Fiocchi, C. (2004). Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmunity Reviews.* 3: 394-400.

Darfeuille-Michaud, A., Boudeau, J., Bulois, P., Neut, C., Glasser, A., Barnich, N. *et al.* (2004). High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology.* 127. 412-421.

de Jonge, W. J. (2013). The Gut's Little Brain in Control of Intestinal Immunity. *ISRN Gastroenterology.* 2013: 1-17.

De Silva, P., Luben, R., Shrestha, S., Khaw, K., and Hart, A. (2014). Dietary arachidonic and oleic acid intake in ulcerative colitis etiology. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology.* 26: 11-18.

Devkota, S., Wang, Y., Musch, M., Leone, V., Fehlner-Peach, H., Nadimpalli, A. *et al.* (2012). Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in *Il10<sup>-/-</sup>* mice. *Nature.* 487: 104-108.

Díaz de León, S., Meza, K., Salazar, J., Jiménez, V., Vega, A., García, S., Sánchez, F. *et al.* (2013). An Enriched Environment restores glucose homeostasis, reduces inflammation and modifies microRNA levels in the hypothalamus of obese mice. En preparación para ser enviado a *Cell metabolism*.

Diehl, S. and Rincón, M. (2002). The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Molecular Immunology.* 39: 531-536.

Dinarello, C. (1999). IL-18: a Th1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. *Journal of Allergy Clinical Immunology*. 103: 11-24.

Dinarello, C. (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol*. 27: 519-550.

Dinarello, C., Arend, W., Sims, J., Smith, D., Blumberg, H., O'Neill, L. *et al.* (2010). IL-1 family nomenclature. *Nature Immunology*. 11: 973-973.

Duerr, R., Taylor, K., Brant, S., Rioux, J., Silverberg, M., Daly, M., Sterinhardt, A. *et al.* (2006). A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science*. 314: 1461-1463.

Dupaul-Chicoine, J., Yeretssian, G., Doiron, K., Bergstrom, K., McIntire, C., LeBlanc, P. *et al.* (2010). Control of intestinal homeostasis, colitis, and colitis-associated colorectal cancer by the inflammatory caspases. *Immunity*. 32: 367-378.

Durant, L., Watford, W., Ramos, H., Laurence, A., Vahedi, G., Wei. *et al.* (2010). Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis. *Immunity*. 32: 605-615.

Eken, A., Singh, A. and Oukka, M. (2014). Interleukin 23 in Crohn's Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*. 20: 587-595.

Elinav, E., Strowig, T., Kau, A., Henao-Mejia, J., Thaiss, C., Booth, C. *et al.* (2011). NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell*. 145: 745-757.

Elson, C., Cong, Y., McCracken, V., Dimmitt, R., Lorenz, R. and Weaver, C. (2005). Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunol Rev*. 206:260-276.

Elson, C., Cong, Y., Weaver, C., Schoeb, T., McClanahan, T., Fick, R., and Kastelein, R. (2007). Monoclonal anti-interleukin 23 reverses active colitis in a T cell-mediated model in mice. *Gastroenterology*. 132: 2359-2370.

Faherty, C., Kerley, D. and Smeyne, R. (2003). A Golgi-Cox morphological analysis of neuronal changes induced by environmental enrichment. *Brain Res. Dev. Brain*. 141: 55-61.

Fantuzzi, G. and Dinarello, C. (1999). Interleukin-18 and interleukin-1 beta: two cytokine substrates for ICE (caspase-1). *Journal of Clinical Immunology*. 19:1-11.

Farrukh, A. and Mayberry, J. (2014). Inflammatory bowel disease in hispanic communities: a concerted south american approach could identify the aetiology of crohn's disease and ulcerative colitis. *Arq. Gastroenterol*. 51: 271-275.

Ferretti, M., Casini-Raggi, V., Pizarro, T. *et al.* (1994). Neutralization of endogenous IL-1 receptor antagonist exacerbates and prolongs inflammation in rabbit immune colitis. *Journal of Clinical Investigation*. 94:449-453.

Ford, A., Sandborn, W., Khan, K., Hanauer, S., Talley, N. and Moayyedi, P. (2011). Efficacy of biological therapies in inflammatory bowel disease: Systematic review and meta-analysis. *The American Journal of Gastroenterology*. 106: 644-659.

Fre, S., Huyghe, M., Mourikis, P., Robine, S., Louvard, D. and Artavanis-Tsakonas, S. (2005). Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature*. 435: 964-968.

Fujino, S., Andoh, A., Bamba, S., Ogawa, A., Hata, K., Araki, Y. *et al.* (2003). Increased expresión of IL-17 in inflammatory bowel disease. *Gut*. 52: 65-70.

Galitovskiy, V., Qian, J., Chernyavsky, A., Marchenko, S., Gindi, V., Edwards, R., and Grando, S. (2011). Cytokine-induced alterations of 7 nicotinic receptor in colonic CD4 T cells mediate dichotomous response to nicotine in murine models of Th1/Th17- versus Th2-mediated colitis. *The Journal of Immunology*. 187:2677-2687.

Ghaleb, A., McConnell, B., Kaestner, K. and Yang, V. (2011). Altered intestinal epithelial homeostasis in mice with intestine-specific deletion of the Krüppel-like factor 4 gene. *Developmental Biology*. 349: 310-320.

Glass, M., van Dellen, A., Blakemore, C., Hannan, A. and Faull, R. (2004). Delayed onset of huntington's disease in mice in an enriched environment correlates with delayed loss of cannabinoid CB1 receptors. *Neuroscience*. 123: 207-212.

Gonçalves, R., Coletta, R., Silvério, K., Benevides, L., Casati, M., da Silva, J. and Nociti, F. (2011). Impact of smoking on inflammation: overview of molecular mechanisms. *Inflammation Research*. 60: 409-424.

Gracie, J., Robertson, S. and McInnes, I. (2003). Interleukin-18. *J Leukoc Biol*. 73: 213-24.

Gregorieff, A., Stange, D., Kujala, P., Begthel, H., van den Born, M., Korving, J. *et al.* (2009). The Ets-Domain Transcription Factor Spdef Promotes Maturation of Goblet and Paneth Cells in the Intestinal Epithelium. *Gastroenterology*. 137: 1333-1345.

Gringhuis, S., Kaptein, T., Wevers, B., Theelen, B., van der Vlist, M. *et al.* (2012). Dectin-1 is an extracellular pathogen sensor for the induction and processing of IL-1 $\beta$  via a noncanonical caspase-8 inflammasome. *Nature Immunology*. 13: 246-254.



Grohmann, U., Belladonna, M., Vacca, C., Bianchi, R., Fallarino, F., Orabona, C. *et al.* (2001). Positive regulatory role of IL-12 in macrophages and modulation by IFN- $\gamma$ . *The Journal of Immunology*. 167: 221–227.

Gu, Y., Kuida, H, Tsutsui, G, Ku, K, Hsiao, *et al.* (1997). Activation of interferon- $\gamma$  inducing factor mediated by interleukin-1 $\beta$  converting enzyme. *Science*. 275:206.

Guidi, L., Felice, C., Procoli, A., Bonanno, G., Martinelli, E., Marzo, M. *et al.* (2013). FOXP3+T regulatory cell modifications in inflammatory bowel disease patients treated with Anti-TNF $\alpha$  agents. *BioMed Research International*. 2013: 1–10.

Guslandi, M. (1998). Nitric oxide and inflammatory bowel diseases. *European Journal of Clinical Investigation*. 128: 904-907.

Hagiwara, E., Takahashi, K., Okubo, T., Ohno, S., Ueda, A., Aoki, A., Odagiri, S. and Ishigatubo, Y. (2001). Cigarette smoking depletes cells spontaneously secreting Th1 cytokines in the human airway. *Cytokine*. 14: 121-126.

Hampe, J., Franke, A., Rosenstiel, P., Till, A., Teuber, M., Huse, K. *et al.* (2006). A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nature Genetics*. 39:207-211.

Hans, W., Scholmerich, J., Gross, V. *et al.* (2000). Interleukin-12 induced interferon- $\gamma$  increases inflammation in acute dextran sulfate sodium induced colitis in mice. *European Cytokine Network*. 11: 67-74.

Hedl, M., Li, J., Cho, J., and Abraham, C. (2007). Chronic stimulation of Nod2 mediates tolerance to bacterial products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104: 19440-19445.

Hirota, S., Ng, J., Lueng, A., Khajah, M., Parhar, K., Li, *et al.* (2011). NLRP3 inflammasome plays a key role in the regulation of intestinal homeostasis. *Inflammatory Bowel Diseases*. 17: 1359-1372.

Hisamatsu, T., Suzuki, M., Reinecker, H., Nadeau, W., McCormick, B. and Podolsky, D. (2003). CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*. 124: 993-1000.

Hoshino, K., Tsutsui, H., Kawai, T., Takeda, K., Nakanishi, K., Takeda, Y. *et al.* (1999). Cutting edge: generation of IL-18 receptor-deficient mice: evidence for IL-1 receptor related protein as an essential IL18 binding receptor. *J Immunol*. 162: 5041-5044.

Hoshino, T., Kawase, Y., Okamoto, M., Yokota, K., Yoshino, K., Yamamura, K. *et al.* (2001). Cutting edge: IL-18-transgenic mice: in vivo evidence of a broad role for IL-18 in modulating immune function. *J Immunol*. 166: 7014-7018

- Hou, J., Abraham, B. and El-Serag, H. (2011). Dietary Intake and Risk of Developing Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review of the Literature. *The American Journal of Gastroenterology*. 106: 563-573.
- Hue, S., Ahern, P., Buonocore, S., Kullberg, M., Cua, D., McKenzie, B. *et al.* (2006). Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *The Journal of Experimental Medicine*. 203: 2473-2483.
- Hugot, J., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cézard, J., Belaiche, J. *et al.* (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 411: 599-603.
- Hutchins, A., Diez, D., and Miranda-Saavedra, D. (2013). The IL-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response: recent developments and future challenges. *Briefings in Functional Genomics*. 12:489-498.
- Hyodo, Y., Matsui, K., Hayashi, N., Tsutsui, H., Kashiwamura, S., Yamauchi, H. *et al.* (1999). IL-18 upregulates perforin-mediated NK activity without increasing perforin messenger RNA expression by binding to constitutively expressed IL-18 receptor. *J Immunol*. 162: 1662-8.
- Inohara, N., Ogura, Y., Fontalba, A., Gutierrez, O., Pons, F., Crespo, J. *et al.* (2003). Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. *Journal of Biological Chemistry*. 278: 5509-5512.
- Ishikura, T., Kanai, T., Uraushihara, K., Iiyama, R., Makita, S., Totsuka, T. *et al.* (2003). Interleukin-18 overproduction exacerbates the development of colitis with markedly infiltrated macrophages in interleukin-18 transgenic mice. *J Gastroenterol Hepatol*. 18: 960-9.
- Jankowsky, J., Melnikova, T., Fadale, D., Xu, G., Slunt, H., Gonzales, V., Youkin, *et al.* (2005). Environmental enrichment mitigates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci*. 25: 5217-5224.
- Jantchou, P., Morois, S., Clavel-Chapelon, F., Boutron-Ruault, M. and Carbonnel, F. (2010). Animal protein intake and risk of inflammatory bowel disease: The E3N prospective study. *The American Journal of Gastroenterology*. 105: 2195-2201
- Jensen, J., Pedersen, E., Galante, P., Hald, J., Heller, R., Ishibashi, M. *et al.* (2000). Control of endodermal endocrine development by Hes-1. *Nature Genetics*. 24: 36-44.
- Johansson, M. and Hansson, G. (2013). Mucus and the Goblet Cell. *Digestive Diseases*. 3: 305-309.
- Johansson, M., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., and Hansson, G. (2008). The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105: 15064-15069.

Jones, S., and Rose-John, S. (2002). The role of soluble receptors in cytokine biology: the agonistic properties of the sIL-6R/IL-6 complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 1592: 251-263.

Jostins, L., Ripke, S., Weersma, R., Duerr, R., McGovern, D. *et al.* (2012). Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*. 491:119-124.

Jump, R. L., and Levine, A. D. (2004). Mechanisms of natural tolerance in the intestine. *Inflammatory Bowel Diseases*. 10: 462-478.

Kanai, T., Watanabe, M., Okazawa, A., Nakamaru, K., Okamoto, M., Naganuma, M. *et al.* (2000). Interleukin 18 is a potent proliferative factor for intestinal mucosal lymphocytes in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 119:1514-1523.

Kanai, T., Watanabe, M., Okazawa, A., Sato, T., Yamazaki, M., Okamoto, S. *et al.* (2001). Macrophage-derived IL18-mediated intestinal inflammation in the murine model of Crohn's disease. *Gastroenterology*. 121: 875-88.

Kappelman, M., Rifas-Shiman, S., Kleinman, K., Ollendorf, D., Bousvaros, A., Grand, R. and Fiskelsteil, J. (2007). The prevalence and geographic distribution of Crohn's disease and ulcerative colitis in the United States. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 5:1424-1429.

Katz, J., Perreault, N., Goldstein, B., Lee, C., Labosky, P. and Kaestner, K. (2002). The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon. *Development*. 129: 2619-2628.

Keller, M., Ruegg, A., Werner, S. and Beer, H. (2008). Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell*. 132: 818-831.

Kempermann, G., Gast, D. and Gage, F. (2002). Neuroplasticity in old age: sustained five fold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. *Ann. Neurol*. 52: 135-143.

Kempermann, G., Kuhn, H. and Gage, F. (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*. 386: 493-495.

Kim, S., Eisenstein, M., Reznikov, L., Fantuzzi, G., Novick, D., Rubinstei, M. *et al.* (2000). Structural requirements of six naturally occurring isoforms of the IL18 binding protein to inhibit IL-18. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97: 1190-5.

Kim, S., Reznikov, L., Stuyrt, R., Selzman, C., Fantuzzi, G., *et al.* (2001). Functional reconstitution and regulation of IL-18 activity by the IL-18Rb chain. *Journal of Immunology*. 166:148-154.

Kim, Y. and Ho, S. (2010). Intestinal Goblet Cells and Mucins in Health and Disease: Recent Insights and Progress. *Current Gastroenterology Reports*. 12: 319-330.

- Kim, Y., Park, J., Shaw, M., Franchi, L., Inohara, N., and Núñez, G. (2008). The Cytosolic sensors Nod1 and Nod2 are critical for bacterial recognition and host defense after exposure to Toll-like Receptor ligands. *Immunity*. 28: 246-257.
- Kishimoto, T. (2005). Interleukin-6: From Basic Science to Medicine-40 Years in Immunology. *Annual Review of Immunology*. 23: 1–21.
- Knodler, L., Crowley, S., Sham, H., Yang, H., Wrande, M. *et al.* (2014). Noncanonical Inflammasome Activation of Caspase-4/Caspase-11 Mediates Epithelial Defenses against Enteric Bacterial Pathogens. *Cell Host & Microbe*. 16: 249-256.
- Kobayashi, K., Chamaillard, M., Ogura, Y., Henegariu, O., Inohara N., Nuñez, G. and Flavell, R. (2005). Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science*. 307: 731-734.
- Koch, S., and Nusrat, A. (2012). The Life and death of epithelia during inflammation: Lessons learned from the gut. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 7: 35–60.
- Komitova, M., Mattsson, B., Johansson, B. and Eriksson, P. (2005). Enriched Environment Increases Neural Stem/Progenitor Cell Proliferation and Neurogenesis in the Subventricular Zone of Stroke-Lesioned Adult Rats. *Stroke*. 36: 1278-1282.
- Komitova, M., Perfilieva, E., Mattsson, B., Eriksson, P. and Johansson, B. (2002). Effects of Cortical Ischemia and Postischemic Environmental Enrichment on Hippocampal Cell Genesis and Differentiation in the Adult Rat. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 22: 852-860.
- Komitova, M., Perfilieva, E., Mattsson, B., Eriksson, P. and Johansson, B. (2006). Enriched environment after focal cortical ischemia enhances the generation of astroglia and NG2 positive polydendrocytes in adult rat neocortex. *Experimental Neurology*. 199: 113-121.
- Kontoyiannis, D., Boulougouris, G., Manoloukos, M., Armaka, M., Apostolaki, M., Pizarro, T. *et al.* (2002). Genetic dissection of the cellular pathways and signaling mechanisms in modeled tumor necrosis factor–induced Crohn’s-like Inflammatory Bowel Disease. *The Journal of Experimental Medicine*. 196: 1563-1574.
- Kontoyiannis, D., Pasparakis, M., Pizarro, T., Cominelli, F. and Kollias, G. (1999). Impaired On/Off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements. *Immunity*. 10. 387-398.
- Krawisz, J., Sharon, P. and Stenson, W. (1984) Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology*. 87: 1344-1350.
- Kugathasan, S., Loizides, A., Babusukumar, U., McGuire, E., Wang, T., Hooper, P. *et al.* (2005). Comparative phenotypic and CARD15 mutational analysis among African American, Hispanic, and White children with Crohn’s disease. *Inflammatory Bowel Disease*. 11: 631-638.

Kuwabara, T., Ishikawa, F., Kondo, M., and Kakiuchi, T. (2017). The role of IL-17 and related cytokines in inflammatory autoimmune diseases. *Mediators of inflammation*. 2017: 1-11.

Langholz, E., Munkholm, P., Krasilnikoff, P. and Binder, V. (1997). Inflammatory bowel diseases with onset in childhood: Clinical features, morbidity, and mortality in a regional cohort. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 32: 139-147.

Latz, E., Xiao, T. S., and Stutz, A. (2013). Activation and regulation of the inflammasomes. *Nature Reviews Immunology*, 13: 397-411.

Lazarov, O., Robinson, J., Tang, Y., Hairston, I., Korade-Mirnic, Z., Lee, V., Hersh, L. *et al.* (2005). Environmental enrichment reduces A $\beta$  levels and amyloid deposition in transgenic mice. *Cell*. 120: 701-713.

Le Leu, R., Young, G., Hu, Y., Winter, J. and Conlon, M. (2013). Dietary red meat aggravates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice whereas resistant starch attenuates inflammation. *Digestive Diseases and Sciences*. 58: 3475-3482.

Leach, S., Messina, I., Lemberg, D., Novick, D., Rubenstein, M. and Day, A. (2008). Local and systemic interleukin-18 and interleukin-18-binding protein in children with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 14: 68–74.

Lee, E., Hsu, W., Ma, Y., Lee, P. and Chao, C. (2003). Enrichment enhances the expression of *sgk*, a glucocorticoid-induced gene, and facilitates spatial learning through glutamate AMPA receptor mediation. *Eur. J. Neurosci*. 18: 2842-2852.

Leggio, M., Mansolesi, L., Federico, F., Spirito, F., Ricci, F. and Petrosini, L. (2005). Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. *Behav. Brain Res*. 163:78-90.

Leong, R., Armuzzi, A., Ahmad, T. Wong, M., Tse, P., Jewell, D. and Sung, J. (2003). NOD2/CARD15 gene polymorphisms and Crohn's disease in the Chinese population. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 17:1465-1470.

Leung, B., McInnes, I., Esfandiari, E., Wei, X. and Liew, F. (2000). Combined effects of IL-12 and IL-18 on the induction of collagen-induced arthritis. *Journal of Immunology*. 164: 6495-6502.

Levenstein, S., Prantera, C., Varvo, V., Scribano, M. L., Andreoli, A., Luzi, C. *et al.* (2000). Stress and exacerbation in ulcerative colitis: a prospective study of patients enrolled in remission. *The American Journal of Gastroenterology*. 95: 1213-1220.

Levy, M., Thaiss, C., Zeevi, D., Dohnalá, L., Zilberman-Schapira, G., Mahdi, J. A., David, E. *et al.* (2015). Microbiota-modulated metabolites shape the intestinal

microenvironment by regulation NLRP6 inflammasome signaling. *Cell*. 163:1428-1443.

Li, G., Gan, Y., Fan, Y., Wu, Y., Lin, H., Song, Y. *et al.* (2015). Enriched environment inhibits mouse pancreatic cancer growth and down-regulates the expression of mitochondria-related genes in cancer cells. *Scientific Reports*. 5: 7856-7865.

Ligumsky, M., Simon, P., Karmeli, F. and Rachmilewitz, D. (1990). Role of interleukin 1 in inflammatory bowel disease enhanced production during active disease. *Gut*. 31:686-689.

Liu, Z., Zaki, M., Vogel, P., Gurung, P., Finlay, B. *et al.* (2012). Role of Inflammasomes in Host Defense against *Citrobacter rodentium* Infection. *Journal of Biological Chemistry*. 287: 16955-16964.

Loftus, E. (2004). Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*. 126: 1504-1517.

Loher, F. (2003). The interleukin-1 converting enzyme inhibitor pralnacasan reduces dextran sulfate sodium-induced murine colitis and T helper 1 T-cell activation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 308: 583-590.

Loher, F. (2003). The interleukin-1 converting enzyme inhibitor pralnacasan reduces dextran sulfate sodium-induced murine colitis and T helper 1 T-cell activation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 308: 583-590.

Maerten, P., Shen, C., Colpaert, S., Liu, Z., Bullens, D., van Assche, G. *et al.* (2004). Involvement of interleukin 18 in Crohn's disease: evidence from in vitro analysis of human gut inflammatory cells and from experimental colitis models. *Clin Exp Immunol*. 135: 310-7.

Mahida, Y., Wu, K., Jewell, D. (1989). Enhanced production of interleukin 1-beta by mononuclear cells isolated from mucosa with active ulcerative colitis of Crohn's disease. *Gut*. 30: 835-8.

Mannon, P., Fuss, I., Mayer, L., Elson, C., Sandborn, W., Present, D. *et al.* (2004). Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *New England Journal of Medicine*. 351: 2069-2079.

Martinez-Medina M., Denizot, J., Dreux, N., Robin, F., Billard, E., Bonnet, R. and Barnich, N. (2013). Western diet induces dysbiosis with increased *E coli* in CEABAC10 mice, alters host barrier function favouring AIEC colonisation. *Gut*. 63: 116-124.

Martinon, F., Burns, K. and Tschopp, J. (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Molecular cell*. 10: 417-426.

Matteoli, G. and Boeckxstaens, G. E. (2013). The vagal innervation of the gut and immune homeostasis. *Gut*. 62:1214-1222.

McAlindon, M., Hawkey, C and Mahida, R. (1998). Expression of interleukin 1 $\alpha$  and interleukin 1  $\beta$  converting enzyme by intestinal macrophages in health and inflammatory bowel disease. *Gut*. 42: 214-219.

McCauley, H. A. and Guasch, G. (2015). Three cheers for the goblet cell: maintaining homeostasis in mucosal epithelia. *Trends in Molecular Medicine*. 21: 492-503.

McGovern, D., Gardet, A., Törkvist, L., Goyette, P., Essers, J. *et al.* (2010). Genome-wide association identifies multiple ulcerative colitis susceptibility loci. *Nature Genetics*. 42: 33-337.

Meuronen, A., Majuri, M., Alenius, H., Mäntylä, T., Wolff, H., Piirilä, P. and Laitinen, A. (2008). Decreased cytokine and chemokine mRNA expression in bronchoalveolar lavage in asymptomatic smoking subjects. *Respiration*. 75: 450-458.

Miao, E., Rajan, J. and Aderem, A. (2011). Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunol. Rev.* 243: 206-214.

Molodecky, N., Soon, I., Rabi, D., Ghali, W., Ferris, M., Chernoff, G., Benchimol, E., Panaccion, R., Ghosh, S., Barkema, H. and Kaplan. (2012). Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*. 142:46-54.

Montbarbon, M., Pichavant, M., Langlois, A., Erdual, E., Maggiotto, F., Neut, C. *et al.* (2013). Colonic inflammation in mice is improved by cigarette smoke through iNKT cells recruitment. *PLoS ONE*. 8: e62208.

Monteleone, G., Biancone, L., Marasco, R., Morrone, G., Marasco, O., Lizza, F., and Pallone, F. (1997). Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells. *Gastroenterology*. 112:1169-1178.

Monteleone, G., Trapasso, F., Parrello, T., Biancone, L., Stella, A., Iuliano, R. *et al.* (1999). Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn's disease. *J Immunol*. 163: 143-147.

Nagahara, A., Mateling, M., Kovacs, I., Wang, L., Eggert, S., Rockenstein, E., *et al.* (2013). Early BDNF treatment ameliorates cell loss in the entorhinal cortex of APP transgenic mice. *Journal of Neuroscience*. 33: 15596-15602.

Nakahira, M., Tomura, M., Iwasaki, M., Ahn, H., Bian, Y., *et al.* (2001). An absolute requirement for STAT4 and a role for IFN- $\gamma$  as an amplifying factor in IL-12 induction to the functional IL-18 receptor complex. *Journal of Immunology*. 167:1306-1312.

Nakamura, S., Otani, T., Ijiri, Y., Motoda, R., Kurimoto, M. and Orita, K. (2000). IFN- $\gamma$ -dependent and -independent mechanisms in adverse effects caused by

concomitant administration of IL-18 and IL-12. *Journal of Immunology*. 164: 3330-3336.

Nakanishi, K., Yoshimoto, T., Tsutsui, H. and Okamura, H. (2001). Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu Rev Immunol*. 19: 423-474.

Naugler, W. and Karin, M. (2008). The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. *Trends in Molecular Medicine*. 14: 109–119.

Neuman, M. G. (2007). Immune dysfunction in inflammatory bowel disease. *Translational Research*. 149:173-186.

Neurath, M. and Finotto, S. (2011). IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 22: 83-89.

Neurath, M., Finotto, S. and Glimcher, L. (2002). The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat Med*. 8: 567-573.

Neurath, M., Fuss, I., Kelsall, B., Stuber, E. and Strober, W. (1995). Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *The Journal of Experimental Medicine*. 182: 1281-1290.

Neurath, M., Fuss, I., Pasparakis, M., Alexopoulou, L., Haralambous, S., Meyer zum *et al.* (1997). Predominant pathogenic role of tumor necrosis factor in experimental colitis in mice. *European Journal of Immunology*. 27: 1743-1750.

Noah, T., Kazanjian, A., Whitsett, J. and Shroyer, N. (2010). SAM pointed domain ETS factor (SPDEF) regulates terminal differentiation and maturation of intestinal goblet cells. *Experimental Cell Research*. 316: 452-465.

Novick, D., Kim, S., Fantuzzi, G., Reznikov, L., Dinarello, C. and Rubinstein M. (1999). Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response. *Immunity*. 10:127-136.

Nowarsky, R., Jackson, R., Gagliana, N., de Zoete, R., Palm, N. W., Bailis, W., Low, J. *et al.* (2015). Epithelial IL-18 equilibrium controls barrier function in colitis. *Cell*. 163: 1444-1456.

O'Neill, L. (2008) The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunological Reviews*. 226:10-18.

Obermeier, F., Kojouharoff, G., Hans, W. *et al.* (1999). Interferon-gamma (IFN-gamma)- and tumour necrosis factor (TNF)-induced nitric oxide as toxic effector molecule in chronic dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Clinical and Experimental Immunology*. 116: 238-245.

Ogura, Y., Lala, S., Xin, W., Smith, E., Dowds, T., Chen, F., Zimmermann, E., Tretiakova. *et al.*(2003). Expression of NOD2 in paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Gut*. 52: 1591-1597.



- Ohlsson, A. and Johansson, B. (1995). Environment influences functional outcome of cerebral infarction in rats. *Stroke* 26: 644-649.
- Okamura, H., Nagata, K., Komatsu, T., Tanimoto, T., Nukata, Y, Tanabe, F. *et al.* (1995). A novel costimulatory factor for gamma interferon induction found in the livers of mice causes endotoxic shock. *Infect Immun.* 63: 3966-3972.
- Olesen, C., Coskun, M., Peyrin-Biroulet, L., and Nielsen, O. (2016). Mechanisms behind efficacy of tumor necrosis factor inhibitors in inflammatory bowel diseases. *Pharmacology and Therapeutics.* 159: 110-119.
- Omoto, Y., Tokime, K., Yamanaka, K., Habe, K., Morioka, T., Kurokawa, I. *et al.* (2006). Human Mast Cell Chymase Cleaves Pro-IL-18 and Generates a Novel and Biologically Active IL-18 Fragment. *The Journal of Immunology.* 177: 8315-8319.
- Omoto, Y., Yamanaka, K., Tokime, K., Kitano, S., Kakeda, M., Akeda, T. *et al.* (2010). Granzyme B is a novel interleukin-18 converting enzyme. *Journal of Dermatological Science.* 59: 129-135.
- Pagès, F., Lazar, V., Berger, A., Danel, C., Lebel-binay, S. *et al.* (2001). Analysis of interleukin-18, interleukin-1 converting enzyme (ICE) and interleukin-18-related cytokines in crohn's disease lesions. *European Cytokine Network.* 12: 97-104.
- Parkes, G., Whelan, K. and Lindsay, J. (2014). Smoking in inflammatory bowel disease: Impact on disease course and insights into the aetiology of its effect. *Journal of Crohn's and Colitis.* 8: 717-725.
- Parkes, M., Barrett, J., Prescott, N., Tremelling, M., Anderson, C. A. *et al.* (2007). Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nature Genetics.* 39:830-832.
- Parronchi, P., Romagnani, P., Annunziato, F., Sampognaro, S., Becchio, A., *et al.* (1997). Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *The American Journal of Pathology.* 150: 823-832.
- Pizarro, T., Michie, M., Bentz, M., Woraratanadharm, J., Smith, M., Foley, E., Moskaluk. *et al.* (1999). IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells. *J Immunol.* 162: 6829-6835.
- Podolsky, D. K. (2002). Inflammatory bowel disease. *New England Journal of Medicine.* 347: 417-429.
- Praag, H., Kempermann, G. and Gage, FH. (2000). Neural consequences of environmental enrichment. *Nature Reviews Neuroscience.* 3:191-198.
- Present, D., Rutgeerts, P., Targan, S., Hanauer, S., Mayer, L. *et al.* (1999). Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease. *The New England Journal of Medicine.* 340:1398-1405.

Prinz, M. and Hanisch, U. (1999). Murine microglial cells produce and respond to interleukin-18. *J Neurochem.* 72: 2215-8.

Puren, A., Fantuzzi, G., Gu, Y., Su, M. and Dinarello, C. (1998). Interleukin-18 (IFN $\gamma$ -inducing factor) induces IL-8 and IL-1 $\beta$  via TNF $\alpha$  production from non-CD141 human blood mononuclear cells. *Journal of Clinical Investigation.* 101: 711-721.

Pusic, K., Pusic, A. and Kraig, R. (2016). Environmental enrichment stimulates immune cell secretion of exosomes that promote CNS myelination and may regulate inflammation. *Cellular and Molecular Neurobiology.* 36:313-325.

Rampon, C., Jiang, C., Dong, H., Tang, Y., Lockhart, D., Schultz, P., Tsien, J. and Hu, Y. (2000). Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain. *Proc. Natl Acad. Sci.* 97: 12880-12884.

Rampon, C., Tang Y., Goodhouse, J., Shimizu, E., Kynin, M. and Tsien, J. (2000). Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nature Neuroscience.* 3: 238-244.

Rathinam, V., Vanaja, S., Waggoner, L., Sokolovska, A., Becker, C., Stuart, L. *et al.* (2012). TRIF Licenses Caspase-11-Dependent NLRP3 Inflammasome Activation by Gram-Negative Bacteria. *Cell.* 150: 606-619.

Rathinam, V., Vanaia, S. and Fitzgerald, K. (2012). Regulation of inflammasome signaling. *Nat Immunol.* 13: 333-332.

Rattazzi, L., Piras, G., Brod, S., Smith, K., Ono, Masahiro. and D'Acquisto, F. (2016). Impact of enriched environment on murine T Cell Differentiation and gene expression profile. *Frontiers in Immunology* Received. 7:381.

Reif, S., Klein, I., Lubin, F., Farbstein, M., Hallak, A., Gilat, T. (1997). Preillness dietary factors in inflammatory bowel disease. *Gut.* 40:754-760.

Rigoli, L. and Caruso, R. (2014). Inflammatory bowel disease in pediatric and adolescent patients: A biomolecular and histopathological review. *World Journal of Gastroenterology.* 20: 10262-10278.

Rioux, J., Xavier, R., Taylor, K., Silverberg, M., Goyette, P., Huett, A. *et al.* (2007). Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nature Genetics.* 39: 596-604.

Rivas, M., Beaudoin, M., Gardet, A., Stevens, C. *et al.* (2011). Deep resequencing of GWAS loci identifies independent rare variants associated with inflammatory bowel disease. *Nature Genetics.* 43: 1066-1073.

Rosenzweig, M., Krech, D., Bennett, E. and Diamond, M. (1962). Effects of environmental complexity and training on brain chemistry and anatomy. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 55: 429-437.

Rubin, D. and Hanauer, S. (2000). Smoking and inflammatory bowel disease. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 12:855-862.

Rutgeerts, P., Sandborn, W., Feagan, B., Reinisch, W., Olson, A., Johanns, J. *et al.* (2005). Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *New England Journal of Medicine*. 353: 2462-2476.

Saitoh, T., Fujita, N., Jang, M., Uematsu, S., Yang, B., Satoh, T., *et al.* (2008). Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 $\beta$  production. *Nature*. 456: 264-268.

Salmaso, N., Silbereis, J., Komitova, M., Mitchell, P., Chapman, K., Ment, L. *et al.* (2012). Environmental Enrichment Increases the GFAP+ Stem Cell Pool and Reverses Hypoxia-Induced Cognitive Deficits in Juvenile Mice. *Journal of Neuroscience*. 32: 8930-8939.

Schmid-Burgk, J., Gaidt, M., Schmidt, T., Ebert, T., Bartok, E., *et al.* (2015). Caspase-4 mediates non-canonical activation of the NLRP3 inflammasome in human myeloid cells. *European Journal of Immunology*. 45: 2911-2917.

Schrijver, N, Bahr, N., Weiss, I. and Wurbel, H. (2002). Dissociable effects of isolation rearing and environmental enrichment on exploration, spatial learning and HPA activity in adult rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73: 209-224.

Schroder, K. and Tschopp, J. (2010). The inflammasomes. *Cell*. 140: 821-832.

Shi, C, Shenderov, K., Huang, N., Kabat, J., Abu-Asab, M., Fitzgerald, K. *et al.* (2012). Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 $\beta$  production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nature Immunology*. 13: 255-263.

Shirato, K., Imaizumi, K., Sakurai, T., Ogasawara, J., Ohno, H. and Kizaki, T. (2017). Regular voluntary exercise potentiates interleukin-1 $\beta$  and interleukin-18 secretion by increasing caspase-1 expression in murine macrophages. *Mediators of Inflammation*. 9290416.

Shroyer, N. (2005). Gfi1 functions downstream of Math1 to control intestinal secretory cell subtype allocation and differentiation. *Genes & Development*. 19: 2412-2417.

Siegmund, B. (2010). Interleukin-18 in intestinal inflammation: friend and foe? *Immunity*. 32: 300-2.

Siegmund, B., Fantuzzi, G., Rieder, F., Gamboni-Robertson, F., Lehr, H. A., Hartmann, G. *et al.* (2001). Neutralization of interleukin-18 reduces severity in murine colitis and intestinal IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  production. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 281: 1264-1273.

Siegmund, B., Lehr, H., Fantuzzi, G., Dinarello, C. (2001). IL-1 $\beta$ -converting enzyme (caspase-1) in intestinal inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98:13249-13254.

- Simms, L., Doecke, J., Walsh, M., Huang, N., Fowler, E., and Radford-Smith, G. (2008). Reduced defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease. *Gut*. 57: 903-910.
- Sims, J. and Smith, D. (2010). The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immunol*. 10: 89-102.
- Singh, S., Davis, A., Talor, G. and Deretic, V. (2006). Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular Mycobacteria. *Science*. 313:1438-1441.
- Sivakumar, P., Westrich, G., Kanaly, S., Garka, K., Born, T., Derry, J. *et al.* (2002). Interleukin 18 is a primary mediator of the inflammation associated with dextran sulphate sodium induced colitis: blocking interleukin 18 attenuates intestinal damage. *Gut*. 50: 812-20.
- Smith, D., Hanna, R., Della, F., Moore, H., Chen, H., Farese, A. *et al.* (2003). The soluble form of IL-1 receptor accessory protein enhances the ability of soluble type II IL-1 receptor to inhibit IL-1 action. *Immunity*. 18: 87-96.
- Song, X., He, X., Li, X., and Qian, Y. (2016). The roles and functional mechanisms of interleukin-17 family cytokines in mucosal immunity. *Cellular & Molecular Immunology*. 13: 418-431.
- Sonnenberg, A. (1988). Geographic and temporal variations of sugar and margarine consumption in relation to Crohn's disease. *Digestion*. 41:161-171.
- Spires, T., Grote, H., Varshney, N., Cordery, P., van Dellen, A., Blakemore, C. and Hannan, A. (2004). Environmental enrichment rescues protein deficits in a mouse model of Huntington's disease, indicating a possible disease mechanism. *J. Neurosci*. 24: 2270-2276.
- Spoetl, T., Hausmann, M., Klebl, F., Dirmeier, A., Klump, B., Hoffmann, J. *et al.* (2007). Serum soluble TNF receptor I and II levels correlate with disease activity in IBD patients. *Inflammatory Bowel Diseases*. 13: 727-732.
- Steinman, L. (2004). Elaborate interactions between the immune and nervous systems. *Nature Immunology*. 5: 575-581.
- Sternberg, E. M. (2006). Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nature Reviews Immunology*. 6: 318-328.
- Stoll, S., Jonuleit, H., Schmitt, E., Muller, G., Yamauchi, H., Kurimoto, M. *et al.* (1998). Production of functional IL-18 by different subtypes of murine and human dendritic cells (DC): DC-derived IL-18 enhances IL-12-dependent Th1 development. *Eur J Immunol*. 28: 3231-3239.
- Stoll, S., Muller, G., Kurimoto, M., Saloga, J., Tanimoto, T., Yamauchi, H. *et al.* (1997). Production of IL18 (IFN-gamma-inducing factor) messenger RNA and functional protein by murine keratinocytes. *J Immunol*. 159: 298-302.

- Strasser, A., Jost, P. and Nagata, S. (2009). The Many Roles of FAS Receptor Signaling in the Immune System. *Immunity*. 30: 180-192.
- Strober, W., Fuss, I. and Mannon, P. (2007). The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest*. 117: 514-521.
- Strowig, T., Henao-Mejia, J., Elinav, E. and Flavell, R. (2012). Inflammasomes in health and disease. *Nature*. 481: 278-286.
- Sugawara, S., Uehara, A., Nochi, T., Yamaguchi, T., Ueda, H., Sugiyama, A. *et al.* (2001). Neutrophil Proteinase 3-Mediated Induction of Bioactive IL-18 Secretion by Human Oral Epithelial Cells. *The Journal of Immunology*. 167: 6568-6575.
- Symons, J., Eastgate, J. and Duff, G. (1991). Purification and characterization of a novel soluble receptor for interleukin 1. *J Exp Med*. 174: 1251-1254.
- Symons, J., Young, P. and Duff, G. (1995). Soluble type II interleukin 1 (IL1) receptor binds and blocks processing of IL-1 beta precursor and loses affinity for IL-1 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci*. 92: 1714-1718.
- Takagawa, T., Tamura, K., Takeda, N., Tomita, T., Ohda, Y., Fukunaga, K. *et al.* (2005). Association between IL-18 gene promoter polymorphisms and inflammatory bowel disease in a Japanese population. *Inflamm Bowel Dis*. 11: 1038-43.
- Tamura, K., Fukuda, Y., Sashio, H., Takeda, N., Bamba, H., Kosaka, T. *et al.* (2002). IL18 polymorphism is associated with an increased risk of Crohn's disease. *J Gastroenterol*. 37: 111-6.
- Tang, C., Chen, S., Qian, H. and Huang, W. (2012). Interleukin-23: as a drug target for autoimmune inflammatory diseases. *Immunology*. 135: 112-124.
- Tang, Y., Wang, H., Feng, R., Kyin, M. and Tsien, J. Z. (2001). Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2B transgenic mice. *Neuropharmacology*. 41: 779-790.
- Targan, S., Hanauer, S., van Deventer, S., Mayer, L., Present, D. *et al.* (1997). A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. *The New England Journal of Medicine*. 337:1029-1035.
- Ten Hove, T., Corbaz, A., Amitai, H., Aloni, S., Belzer, I., Graber, P. *et al.* (2001). Blockade of endogenous IL-18 ameliorates TNBS-induced colitis by decreasing local TNF-alpha production in mice. *Gastroenterology*. 121: 1372-9.
- Thia, K. T, Loftus, E., Sandborn, W. and Yang, S. (2008). An update on the epidemiology of inflammatory bowel disease in Asia. *The American Journal of Gastroenterology*. 103: 3167-3182.
- Thomas, G., Rhodes, J., Green, J. and Richardson, C. (2000). Role of smoking in inflammatory bowel disease: implications for therapy. *Postgraduate Medical Journal*. 76:273-279.

Tjonneland, A., Overvad, K., Bergmann, M., Nagel, G., Linseisen, J., Hallmans, G. *et al.* (2009). Linoleic acid, a dietary n-6 polyunsaturated fatty acid, and the aetiology of ulcerative colitis: a nested case-control study within a European prospective cohort study. *Gut*. 58:1606-1611.

Torigoe, K., Ushio, S., Okura, T., Kobayashi, S., Tani, M., Kunikida, T. *et al.* (1997). Purification and characterization of the human interleukin-18 receptor. *J Biol Chem*. 272: 25737-42.

Uchiyama, R., Yonehara, S., and Tsutsui, H. (2013). Fas-Mediated Inflammatory Response in *Listeria monocytogenes* Infection. *The Journal of Immunology*. 190: 4245-4254.

Udagawa, N., Horwood, N., Elliott, J., Mackay, A., Owens, J., Okamura, H. *et al.* (1997). Interleukin-18 (interferon-gamma-inducing factor) is produced by osteoblasts and acts via granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and not via interferon-gamma to inhibit osteoclast formation. *J Exp Med*. 185: 1005-1012.

van Dellen, A., Blakemore, C., Deacon, R., York, D. and Hannan, A. (2000). Delaying the onset of Huntington's in mice. *Nature*. 404: 721-722.

Van Es, J., van Gijn, M., Riccio, O., van den Born, M., Vooijs, M., Begthel, H. *et al.* (2005). Notch/ $\gamma$ -secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature*. 435: 959-963.

van Praag, H., Kempermann, G. and Gage, F. (2000). Neural consequences of environmental enrichment. *Nature Rev. Neurosci*. 1: 191-198.

Wehkamp, J., Harder, J., Weichenthal, M., Schwab, M., Schaffeler, E., *et al.* (2004). NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut*. 53: 1658-1664.

Wehkamp, J., Salzman, N., Porter, E., Nuding, S., Weichenthal, M., Petras, R. *et al.* (2005). Reduced Paneth cell-defensins in ileal Crohn's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102: 18129-18134.

Weiss, A., Babyatsky, M., Ogata, S., Chen, A. and Itzkowitz, S. (1996). Expression of MUC2 and MUC3 mRNA in human normal, malignant, and inflammatory intestinal tissues. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 44: 1161-1166.

Wiekowski, M., Leach, M., Evans, E., Sullivan, L., Chen, S., Vassileva, G., Bazan, J. *et al.* (2001). Ubiquitous transgenic expression of the IL-23 subunit p19 induces multiorgan inflammation, runting, infertility, and premature death. *Journal of Immunology*. 166:7563-7570.

Williamson, L., Chao, A. and Bilbo, S. (2012). Environmental enrichment alters glial antigen expression and neuroimmune function in the adult rat hippocampus. *Brain Behavior Immun*. 26: 500-510.

- Wirtz, S., Becker, C., Blumberg, R., Galle, P. and Neurath, M. (2002). Treatment of T cell-dependent experimental colitis in SCID mice by local administration of an adenovirus expressing IL-18 antisense mRNA. *J Immunol.* 168(1):411-20.
- Xu, H., Gelyana, E., Rajsombath, M., Yang, T., Li, S. and Selkoe, D. (2016). Environmental enrichment potently prevents microglia-mediated neuroinflammation by human amyloid-protein oligomers. *Neurobiology of Disease.* 36:9041-9056.
- Yamamoto, K. and Rose-John, S. (2012). Therapeutic blockade of Interleukin-6 in chronic inflammatory disease. *Clinical Pharmacology and Therapeutics.* 91: 574-576.
- Yamamoto, M., Yoshizaki, K., Kishimoto, T. and Ito, H. (2000). IL-6 is required for the development of Th1 cell-mediated murine colitis. *The Journal of Immunology.* 164: 4878-82.
- Yang, Q. (2001). Requirement of Math1 for Secretory Cell Lineage Commitment in the Mouse Intestine. *Science.* 294: 2155-2158.
- Yen, D., Cheun, J., Scheerens, H., Poulet, F., McClanahan, T., McKenzie, B. *et al.* (2006). IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest.* 116: 1310-1316.
- Yoshimoto, T., Takeda, K., Tanaka, T., Ohkusu, K., Kashiwamura, S. *et al.* (1998). IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN $\gamma$  production. *Journal of Immunology.* 161: 3400-3407.
- Young, D., Lawlor, P., Leone, P., Dragunow, M. and During, M. (1999). Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. *Nature Med.* 5: 448-453.
- Yu, H., Pardoll, D. and Jove, R. (2009). STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nature Reviews Cancer.* 9: 798-809.
- Yu, T., Chen, X., Zhang, W., Li, J., Xu, R., *et al.* (2012). Krüppel-like Factor 4 Regulates Intestinal Epithelial Cell Morphology and Polarity. *PLoS ONE.* 7: e32492.
- Zaki, M., Boyd, K., Vogel, P., Kastan, M., Lamkanfi, M. and Kanneganti T. (2010). The NLRP3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis. *Immunity.* 32: 379-91.
- Zelinkova, Z., van Beelen, A., de Kort, F., Moerland, P., Ver Loren van Themaat, E. *et al.* (2008). Muramyl dipeptide-induced differential gene expression in NOD2 mutant and wild-type Crohn's disease patient-derived dendritic cells. *Inflammatory Bowel Disease.* 14: 186-194.
- Zhang, Z., Zheng, M., Bindas, J., Schwarzenberger, P. and Kolls, J. (2006). Critical role of IL-17 receptor signaling in acute TNBS-induced colitis. *Inflammatory Bowel Diseases.* 12: 382-388.

Zhao, L., Xu, J., Liang, F., Li, Ao., Zhang, Y. and Sun, J. (2015). Effect of chronic psychological stress on liver metastasis of colon cancer in mice. PLoS ONE 10: e0139978.

Zhernakova, A., Festen, E., Franke, L., Trynka, G., van Diemen, C, Monsuur, A. *et al.* (2008). Genetic analysis of innate immunity in Crohn's disease and ulcerative colitis identifies two susceptibility loci harboring CARD9 and IL18RAP. Am J Hum Genet. 82: 1202–10.

Zhou, R., Yazdi, A., Menu, P. and Tschopp, J. (2010). A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. Nature. 469: 221-225.