



Enfermedad Inflamatoria Intestinal al Día

www.elsevier.es/eii



COMENTARIOS A ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA Y BÁSICA

Investigación básica

Basic research

Lahiri A, Abraham C. Activation of pattern recognition receptors up-regulates metallothioneins, thereby increasing intracellular accumulation of zinc, autophagy and bacterial clearance by macrophages. *Gastroenterology*. 2014;147:835-46.

Resumen

El objetivo del trabajo es analizar los mecanismos por los cuales, en situaciones de estimulación continua de receptores de reconocimiento de patrones moleculares microbianos, se incrementa la capacidad de los macrófagos para eliminar microorganismos intracelulares. El estudio pone de manifiesto, mediante una doble aproximación *in vitro* e *in vivo*, la importancia del incremento de la expresión de metalotioneínas (MT) mediado por Nod2, y el consiguiente incremento de los niveles intracelulares de cinc, en la regulación de la eliminación de bacterias intracelulares mediante autofagia en situaciones de estimulación mantenida de receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a microorganismos.

Comentario

El fenómeno de autofagia desempeña un papel esencial en determinadas condiciones fisiológicas y fisiopatológicas: procesos de degradación y reciclado intracelular de proteínas y organelas, la respuesta celular a la falta de nutrientes, la apoptosis o la inmunidad innata y adaptativa frente a microorganismos intracelulares. Polimorfismos del gen *ATG16L1* (autophagy-related 16-like 1), que codifica una proteína que se expresa en las células epiteliales intestinales y en los leucocitos necesaria para la formación del autofagosoma, se asocian con la susceptibilidad a padecer enfermedad de Crohn (EC); aunque la traducción funcional de la mutación descrita en la EC no se conoce con exactitud, es probable que el hecho de localizarse en una posición

muy conservada evolutivamente afecte de forma directa a la interacción de la molécula con otras proteínas del autofagosoma y por tanto dé lugar, hipotéticamente, a una menor efectividad en la eliminación de bacterias intracelulares y una consiguiente activación inmune mantenida. La hipótesis que sugiere que la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) resulta consecuencia de una respuesta inmune inadecuada frente a microorganismos comensales y/o patógenos, así como resultados previos de estudios de asociación genómica amplia, han puesto el foco en proceso de autofagia como un elemento clave en la patogenia de la EII.

En este estudio, investigadores de la Universidad de Yale identifican que el incremento de expresión de MT –proteínas intracelulares que mantienen la homeostasis intracelular de cinc– constituye un mecanismo fundamental en la eliminación mediada por autofagia de bacterias intracelulares en macrófagos en situaciones de estimulación crónica (que no puntual) de receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a microorganismos (pattern recognition receptors); demuestran además que este fenómeno está mediado por Nod2 y la consiguiente activación de NF- κ B y caspasa 1. Recordemos que *NOD2* codifica una proteína (Nod2) que se expresa principalmente en la mayoría de los leucocitos y en las células epiteliales intestinales, y activa el factor de transcripción nuclear NF κ B y la vía de señalización de MAP kinasas, desempeñando una función esencial en el desarrollo de reacciones inmunitarias innatas efectivas frente a bacterias, en especial intracelulares. Tres variantes del gen *NOD2* (también denominado *CARD15*) que se relacionan con una activación reducida de NF κ B –y por tanto con un defecto de la eliminación de microorganismos por parte del sistema inmune intestinal– se asocian a la aparición de la EC. Estudios previos han estimado que el riesgo de su desarrollo para los portadores (heterocigóticos u homocigóticos) de mutaciones de *NOD2* aumenta entre 3 y 20 veces aproximadamente en comparación con el resto de la población.

En primer lugar los investigadores confirman que la expresión de MT-1 y de MT-2A (tanto a nivel de ARN mensajero como de proteína), los niveles intracelulares de cinc, y la capacidad de eliminación de *Salmonella typhimurium* de los macrófagos en cultivo, se incrementan de forma significativa tras la estimulación mantenida (durante 48 horas) de Nod2 con su agonista específico, el muramil-dipéptido derivado del peptidoglicano bacteriano. Por otra parte, tanto la incubación de los macrófagos con un quelante

específico de cinc, como el silenciamiento del gen de MT-1 y de su factor de transcripción MTF-1 mediante siRNA, revirtió la capacidad de las células estimuladas de eliminar bacterias intracelulares, incluyendo *Escherichia coli* adherente invasiva que coloniza el íleon terminal de pacientes con EC. Es interesante el hecho de que los macrófagos intestinales –tanto humanos como murinos– expresan en condiciones basales mayores niveles de MT que los macrófagos periféricos, lo que se correlaciona con la mayor capacidad bactericida de los primeros; este fenómeno podría estar en relación con la constante estimulación de los macrófagos intestinales por patrones moleculares microbianos derivados de la microbiota. Adicionalmente el estudio demuestra, de nuevo mediante técnicas de silenciamiento génico, que la acumulación intracelular de cinc mediada por MT desempeña un papel fundamental en la autofagia inducida por la activación mantenida de Nod2 *in vitro*; además, se pone de manifiesto la importancia de la activación sinérgica de este receptor y de determinados receptores toll-like (TLR-5 y TLR-9) en este fenómeno. Cabe destacar que la deficiencia de cinc ha sido asociada a la exacerbación de la colitis experimental en roedores, mientras que su administración disminuye la gravedad de la misma; en el mismo sentido se ha descrito que los niveles séricos de cinc son menores en pacientes con EII que en individuos sanos, y que su administración podría disminuir la permeabilidad intestinal en pacientes con enfermedad de Crohn.

Para profundizar en los mecanismos por los cuales se producen los fenómenos previamente descritos, los autores demuestran, mediante aproximaciones genéticas y farmacológicas, la implicación de la vía Nod2 - NF κ B (pero no de MAP kinasas) y caspasa-1 en la expresión de MTF-1 y MT-1, y en el consiguiente incremento de cinc intracelular en macrófagos estimulados de forma mantenida con muramil-dipéptido.

Finalmente, los investigadores llevan a cabo una serie de experimentos *in vivo*, mediante la administración de antibióticos y DSS a ratones, en los que demuestran la modulación de la expresión y actividad de MT en macrófagos intestinales murinos por la microbiota entérica; la inducción de la expresión y actividad de MT en macrófagos intestinales durante el daño epitelial característico del modelo de colitis inducida por DSS en ratones podría constituir un mecanismo de mejora de la eliminación de bacterias que se translocan a la lámina propia en este contexto, y quizás en otros escenarios clínicos caracterizados por la disfunción de la barrera intestinal.

Alonso A, Domènech E, Julià A, Pañés J, García-Sánchez V, Mateu PN, et al. Identification of risk loci for Crohn's disease phenotypes using a genome-wide association study. *Gastroenterology*. 2015;148(4):794-805. (Publicación electrónica).

Resumen

El estudio analiza mediante análisis de asociación de genoma completo en dos cohortes de pacientes españoles con EC la presencia de genes asociados a diversos fenotipos de la

misma, incluyendo sus manifestaciones extraintestinales. Los autores replican la asociación de 4 loci, *MAG11*, *CLCA2*, *2q24.1* y *LY75* con el desarrollo de enfermedad estenosante, la localización ileal, el curso evolutivo leve, y el desarrollo de eritema nudoso, respectivamente.

Comentario

Desde la realización de los primeros estudios de asociación de genoma completo (*genome-wide association study*, GWAS) en el año 2005, este tipo de análisis ha contribuido de manera excepcional al conocimiento de los determinantes genéticos de las enfermedades humanas, incluyendo la EII; de hecho, en números anteriores de «EII al día» hemos comentado varias publicaciones de GWAS que confirman la presencia de determinantes genéticos que confieren riesgo o protección frente al desarrollo de la EC y la colitis ulcerosa.

Este ambicioso estudio, llevado a cabo gracias a la colaboración de numerosos investigadores de GETECCU y a la base de datos ENEIDA, se marca como objetivo el análisis de los determinantes genéticos de los diversos fenotipos clínicos de la EC. Para ello se evalúa inicialmente una cohorte de 1.338 pacientes de etnia caucásica reclutados en 15 hospitales españoles. Para controlar la presencia de estratificación genética, y para evaluar la asociación con la susceptibilidad global de EC de aquellos loci asociados a diferentes fenotipos de la misma, se utilizó como control una cohorte de casi 1.500 individuos sanos ya empleada en un estudio previo del mismo consorcio (Julià et al., 2013) y que comentamos en un número previo de «EII al día». Los resultados obtenidos fueron validados en otra cohorte independiente del mismo origen (aunque con un seguimiento, y por tanto un porcentaje de pacientes con fenotipos graves, significativamente menores), compuesta por más de 1.600 individuos con EC que, al igual que en el primer grupo, cumplían al diagnóstico los criterios clásicos de Lennard-Jones, y cuyos fenotipos fueron definidos acorde a la clasificación de Montreal (localización, comportamiento, edad al diagnóstico y presencia de enfermedad perianal) así como a la presencia de las manifestaciones extraintestinales clásicas más frecuentes: a saber, eritema nudoso y artropatía periférica.

En primer término el estudio valida de forma adecuada la asociación de los loci previamente descritos (entre otros) *ATG16L1*, *NCF4*, *FOXO3* y *NOD2* (rs62029864) con el comportamiento inflamatorio, la enfermedad perianal, el curso agresivo de la EC, y la necesidad de resección intestinal, respectivamente.

Para identificar nuevos loci asociados a fenotipos clínicamente relevantes de la EC los investigadores llevan a cabo 17 GWAS (uno por cada fenotipo definido a priori), que se describen en detalle en el manuscrito y en la tabla 2 del estudio; un total de 57 SNPs (single nucleotide polymorphisms) asociados con determinados fenotipos en la cohorte inicial, fueron seleccionados para la posterior fase de replicación; curiosamente, solo 5 de ellos pertenecían a locus de susceptibilidad conocida a EC. En la cohorte independiente se validó la asociación de 4 SNPs en otros tantos genes, con determinados fenotipos:

- *MAG11* con el fenotipo complicado B2 (enfermedad estenosante). Este gen codifica una proteína de membrana

implicada en el mantenimiento de las uniones intercelulares estrechas entre células epiteliales adyacentes, y por tanto en la función de barrera y la permeabilidad intestinal. El papel de la disfunción de la barrera intestinal en la patogenia de la EII es reconocido cada vez con evidencia más sólida.

- *LY75* con el desarrollo de eritema nudoso. Este gen codifica un receptor de lectina, expresado principalmente en células dendríticas de la piel, y que participa en la respuesta inmune mediante la captación y presentación antigénica.
- *CLCA2* con la localización ileal; el producto de este gen es un canal de cloro dependiente de calcio que se expresa de forma marcada en el epitelio asociado a los folículos linfoides intestinales y en las

células M, y que se ha implicado en la carcinogénesis colorrectal.

- Un SNP localizado en 2q24.1, cuya función no se conoce, con un comportamiento leve (definido como comportamiento B1 durante un seguimiento de al menos 10 años, ausencia de enfermedad perianal, y sin necesidad de cirugía o tratamiento anti-TNF).

L. Menchén Viso

Sección de Gastroenterología, Servicio de Aparato Digestivo, Hospital General Universitario Gregorio

Marañón, Madrid, España

Correo electrónico: lamenchen.hgugm@salud.madrid.org

Disponible en Internet el 9 de mayo de 2015