

RESULTADOS

Se incluyeron 20 pacientes con EC sometidos a resección ileocecal y 10 controles sin EC pero que requirieron resección ileocecal como parte del tratamiento de su patología de base.

5.1 Criterios de normalización y estandarización (LIMA-R y QLucore)

Al realizar una aproximación del resultado del transcriptoma mediante el programa QLucore, utilizando la función de PCA, y previo a realizar cualquier interpretación de los resultados, se verificó la presencia de *outliers* (que son sujetos con un expresión distinta al resto de sujetos del estudio y cuya inclusión puede implicar una importante alteración de la varianza del conjunto) en relación a todas las otras muestras (pacientes y controles) y se encontró que uno de los pacientes presentaba esta característica. Se trata de una mujer de 24 años, fumadora activa (tanto al diagnóstico como al momento de la cirugía: 10 cigarrillos/día) sin historia familiar de EC y con una enfermedad ileal con patrón estenosante, sin afectación perianal y que evolutivamente no presentó recurrencia post-quirúrgica. Su hallazgo queda demostrado en la Figura 16.

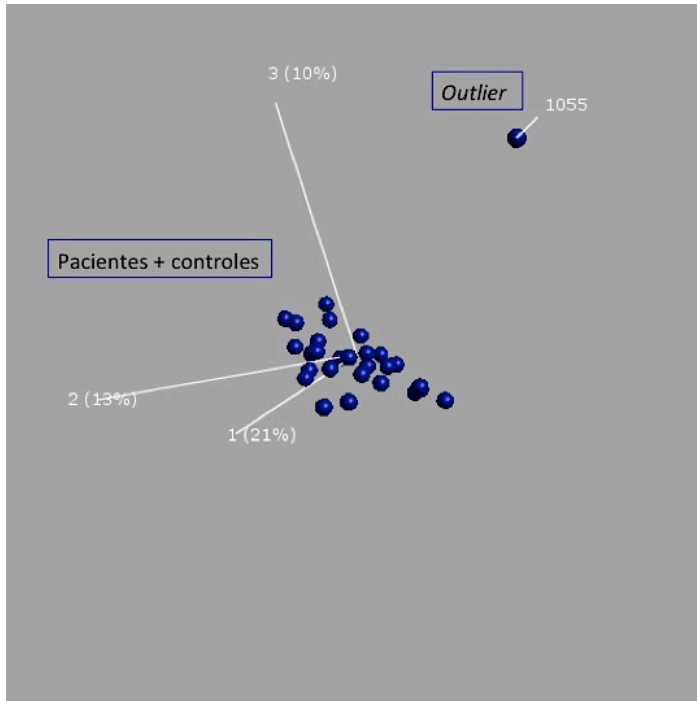


Figura 16. Demostración de la paciente considerada como *outlier* identificada como 1055.

Por otra parte, también se observó la presencia de 4 pacientes con un patrón de expresión genética distinto al resto de pacientes. Estos pacientes fueron considerados como “pacientes problema”. Sus características comparativas con el resto de pacientes se encuentran en la Tabla 13 y su hallazgo se muestra en la Figura 17.

Tabla 13. Características comparativas entre los pacientes “problema” (n= 4) y el resto de pacientes (n = 15) (datos expresados en mediana (intervalo intercuartil) para variables continuas y frecuencias (%) para variables categóricas).

Característica	Pacientes “problema” n = 4	Resto de pacientes n = 15	P
----------------	----------------------------------	---------------------------------	---

Edad al diagnóstico	27 (19-33)	26 (21-37)	ns
Sexo masculino	0	11 (73)	0,038
IMC al momento de la cirugía	22,4 (18,6-22,4)	20,8 (18,4-23)	ns
Fumador activo al diagnóstico	4 (100)	13 (87)	ns
Fumador activo al momento de la cirugía	3 (75)	11 (73)	ns
Historia familiar de EII	0	3 (20)	ns
Enfermedad perianal	2 (50)	2 (13)	ns
Localización			ns
L1	3 (75)	9 (60)	
L3	1 (25)	6 (40)	
Tiempo desde el diagnóstico hasta la cirugía	69 (21-69)	77(33-114,5)	ns
Indicación de la cirugía			ns
B2	3 (75)	7 (47)	
B3	1 (25)	8 (53)	
Complicaciones post-quirúrgicas	2 (50)	3 (20)	ns
Longitud reseca > 20cm	2 (50)	5 (33)	ns
Tratamiento previo a la cirugía			
Salicilatos	1 (25)	6 (40)	ns
Corticoides	2 (50)	5 (33)	ns
Antibióticos (últimas 4 semanas)	0	5 (33)	ns
Tiopurinas/metotrexate	3 (75)	12 (80)	ns
Anticuerpos anti-TNF	2 (50)	4 (27)	ns

Recurrencia post-quirúrgica

0

5 (33)

ns

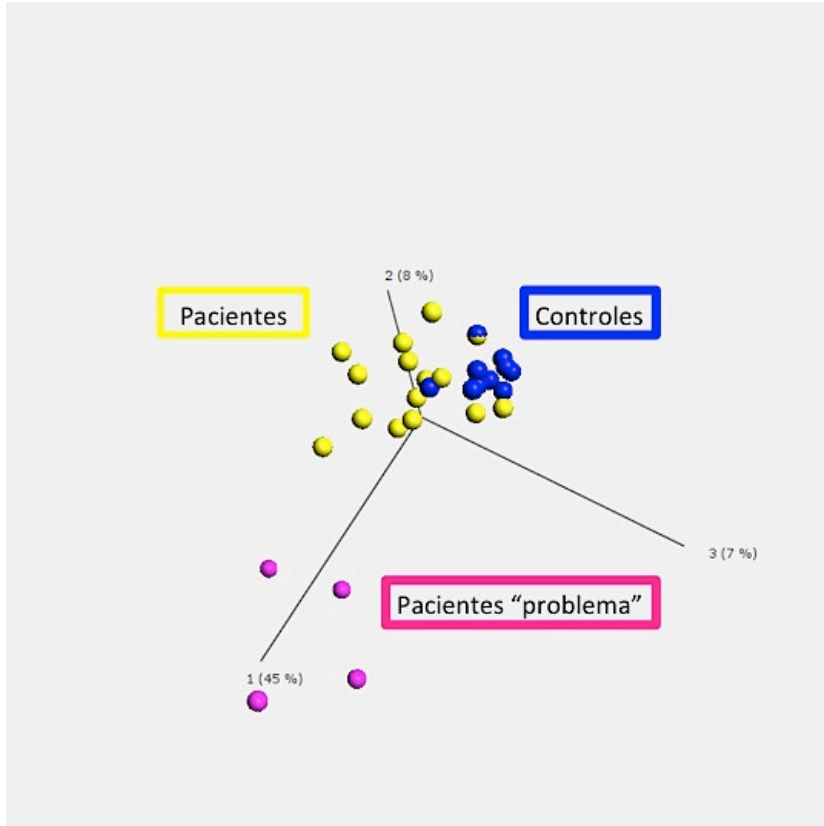
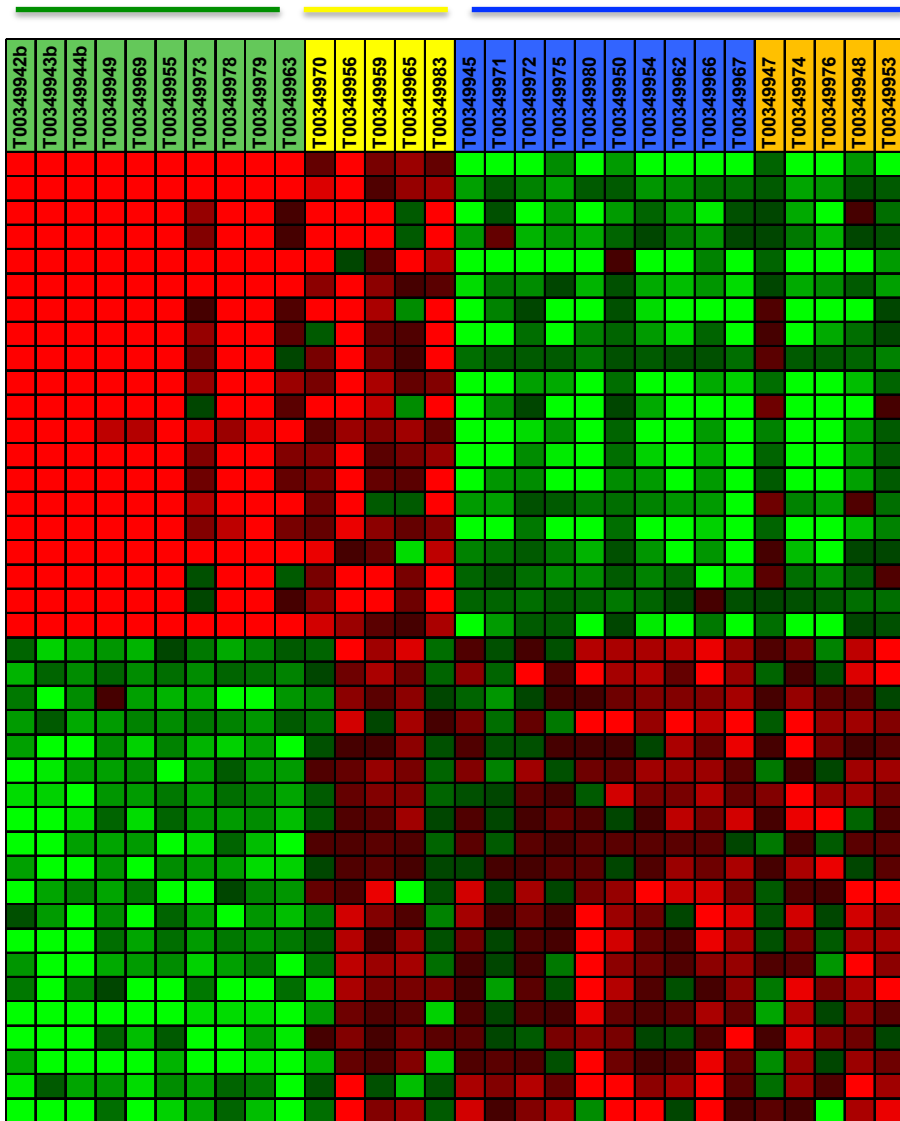
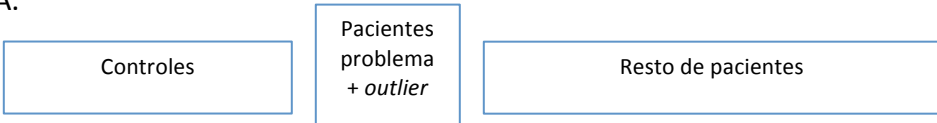


Figura 17. Demostración de los pacientes "problema".

A partir de este momento y para todos los análisis, se decidió retirar tanto a la paciente *outlier* como a los "pacientes problema" para evitar trabajar con perfiles de expresión que presenten influencia de otros fenómenos diferentes a los de las condiciones de este estudio, ya que el perfil de expresión tanto de los pacientes "problema" como del *outlier* eran diferentes, como puede verse demostrado en la Figura 18. Por tanto, finalmente se incluyeron 15 pacientes y 10 controles.

A.



B.

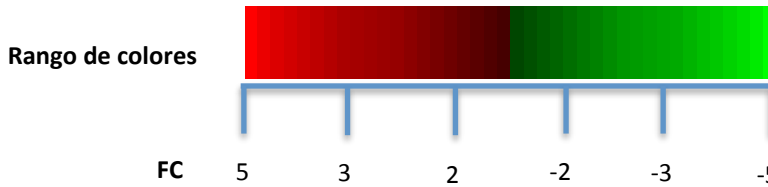


Figura 18. A. Perfiles de expresión diferente entre los pacientes “problema”, la paciente *outlier* (amarillo) y el resto de pacientes (azul: no recurrencia, naranja: recurrencia) y controles (verde). B. Significado del rango de colores y su relación con el FC.

5.2 Características basales

5.2.1 Pacientes vs. controles

Las características basales y del momento de la cirugía se recogen de los pacientes en la Tabla 14; de los controles en la Tabla 15 y la comparativa de pacientes y controles en la Tabla 16.

Tabla 14. Características demográficas de los pacientes con EC (datos expresados en mediana (intervalo intercuartil) para variables continuas y frecuencias (%) para variables categóricas).

Característica	n = 15
Edad al momento de la cirugía	35 años (29-44)
Sexo masculino	11 (73)
Índice de masa corporal (IMC) al momento de la cirugía	21 (18-23)
Historia familiar de EII	3 (20)
Localización	L1: 8 (53) L3: 7 (47)
Enfermedad perianal	4 (20)
Fumador activo al diagnóstico	13 (87)

Fumador activo al momento de la cirugía	11 (73)
Tratamiento al momento de la cirugía	Nada o salicilatos: 3 (20) Inmunomoduladores: 10 (67) Anticuerpos anti-TNF: 2(13)
Tiempo desde el diagnóstico de la EC hasta la cirugía	77,8 meses (33-114,5) 1 (7)
Resección intestinal previa	
Indicación de la cirugía	estenosis: 7 (47) absceso/fístula/plastrón: 8 (53)
Complicaciones quirúrgicas	3 (20)

Tabla 15 Características demográficas de los controles (datos expresados en mediana (intervalo intercuartil) para variables continuas y frecuencias (%) para variables categóricas).

Característica	n =10
Edad al momento de la cirugía	65 años (62-73)
Sexo masculino	7 (70)
IMC al momento de la cirugía	28 (24-30)
Fumador activo al momento de la cirugía	0
Historia familiar de EI	0
Historia familiar de cáncer colorrectal	2 (20)
Antecedente previo de apendicectomía	4 (40)
Otras enfermedades intestinales	1 (10) síndrome de intestino irritable
Diagnóstico final de cáncer colorrectal	8 (80)
Otros diagnósticos finales	1 (10) lipoma ulcerado 1 (10) fibrosis focal

Tabla 16. Comparación de pacientes con EC vs. controles, en relación a sus características basales (datos expresados en mediana (intervalo intercuartil) para variables continuas y frecuencias (%) para variables categóricas).

Característica	Pacientes n = 15	Controles n = 10	P
Edad al momento de la cirugía	35 años (29-44)	65 años (62-73)	< 0,0001
Sexo	11(73)	7 (70)	ns
IMC al momento de la cirugía	21 (18-23)	28 (24-30)	< 0,0001
Fumador activo al momento de la cirugía	11 (73)	0	< 0,0001

Cabe, por tanto, destacar que los pacientes con EC eran más jóvenes, con una mayor proporción de fumadores y más delgados que los controles.

5.2.2 Pacientes con vs. sin recurrencia post-quirúrgica precoz

Después de la resección ileocecal todos los pacientes recibieron tratamiento de profilaxis de la recurrencia post-quirúrgica, iniciado de forma inmediata (8 pacientes recibieron tiopurinas únicamente, 6 pacientes tiopurinas asociadas los primeros 3 meses a metronidazol y 1 paciente adalimumab). Evolutivamente, a los 18 meses **5 pacientes presentaron recurrencia post-quirúrgica precoz** (todos endoscópica, 2 clínica y radiológica). Dos pacientes presentaron recurrencia post-quirúrgica a los 6 meses, 2 a los 12 meses y 1 a los 18 meses post-cirugía.

La comparación de las características basales entre pacientes con recurrencia post-quirúrgica precoz de aquellos sin recurrencia se recoge en la Tabla 17.

Tabla 17. Comparación de características clínicas entre pacientes con recurrencia post-quirúrgica precoz de aquellos sin recurrencia (datos expresados en mediana (intervalo intercuartil) para variables continuas y frecuencias (%) para variables categóricas).

Característica	No recurrencia n = 10	Recurrencia n = 5	P
Edad al diagnóstico	24 (18,8-34,8)	37 (27,5-43,5)	ns
Sexo masculino	7 (70)	4 (80)	ns
IMC al momento de la cirugía	21,7 (18,9-24)	19,5 (17,8-21)	ns
Fumador activo al diagnóstico	8 (80)	5 (100)	
Fumador activo al momento de la cirugía	7 (70)	4 (80)	ns
Historia familiar de EII	3 (30)	0	ns
Enfermedad perianal	1 (10)	1 (20)	ns
Localización			ns
L1	5 (50)	4 (80)	
L3	5 (50)	1 (20)	
Tiempo desde el diagnóstico hasta la cirugía (meses)	69,5 (27-115,7)	77,8 (19,7-107,6)	ns
Indicación de la cirugía			ns
B2	6 (60)	1 (20)	
B3	4 (40)	4 (80)	
Complicaciones post-quirúrgicas	2 (20)	1 (20)	ns
Tratamiento preventivo de la recurrencia post-quirúrgica			

Tiopurinas/metotrexate	3 (30)	5 (100)	ns
Tiopurinas con metronidazol	6 (60)	0	ns
Adalimumab	1 (10)	0	ns
Longitud reseçada >20cm	2 (20)	3 (60)	ns

5.3 Histología convencional

Los resultados comparativos entre pacientes con recurrencia postquirúrgica precoz frente a los pacientes sin ella en lo que refiere al análisis histológico convencional (estudio macroscópico y microscópico) al momento de la cirugía quedan reflejados en la Tabla 18.

Tabla 18. Resultados del análisis histológico entre pacientes con recurrencia postquirúrgica y pacientes sin esta condición (datos expresados en frecuencias (%)).

Característica	No recurrencia n = 10	Recurrencia n = 5	P
Estudio macroscópico			
PARED			
Estenosis por engrosamiento	9 (90)	5 (100)	ns
Fístulas	2 (20)	4 (80)	ns
Depósito de fibrina	8 (80)	3 (60)	ns
SEROSA			
Adhesión a estructuras vecinas	1 (10)	4 (80)	0,033
<i>Fat wrapping</i>	1 (10)	1 (20)	ns
MUCOSA			
Lesiones aftoideas	1 (10)	3 (60)	ns
Apariencia en	5 (50)	1 (20)	ns

empedrado			
Úlceras serpinginosas	6 (60)	4 (80)	ns
Áreas sana	6 (60)	2 (40)	ns
Estudio microscópico			
Presencia de márgenes afectados	5 (50)	5 (100)	ns
Afectación transmural	10 (100)	5 (100)	ns
Fisuras	7 (70)	2 (40)	ns
Úlceras	10 (100)	5 (100)	ns
Agregados linfoides transmurales	10 (100)	5 (100)	ns
Granulomas no caseificantes	4 (40)	1 (20)	
Plexitis mientérica	4 (40)	1 (20)	ns
Hipertrofia de plexos nerviosos	10 (100)	5 (100)	ns
Fibrosis submucosa	10 (100)	5 (100)	ns
Infiltrado linfoplasmocitario	10 (100)	5 (100)	ns
Folículos linfoides	10 (100)	5 (100)	ns
Necrosis parcheada	3 (30)	1 (20)	ns
Irregularidades de vellosidades	10 (100)	5 (100)	ns
Metaplasia pseudopilórica	5 (50)	4 (80)	ns
Irregularidades de las criptas	8 (80)	4 (80)	ns

5.4 Estudio genómico: recurrencia vs. no recurrencia post-quirúrgica

precoz

Según los criterios de selección que se comentó en el capítulo de materiales y métodos, de todos los SNP valorados en el estudio genómico (Anexo 2) se han excluido ciertos SNP. La lista de SNP excluidos y sus motivos se exponen en la Tabla 19.

Tabla 19. Lista de genes excluidos del análisis genómico.

Motivo de exclusión	SNP	Gen representado
Control del genotipado	rs4077515	CARD9
	rs1250550	ZMIZ1
	rs2301436	CCR6
	rs1456896	IKZF1
	rs1800795	IL6
Control de monomorfismo	rs121909601 (GG)	IL10RB NOD2 (G908R)
	rs2066845 (CC)	IL10RA
	rs137853580 (GG)	IL10RA
	rs137853579 (GG)	
Control de tasa de genotipado	rs35873774	XBP1
	rs12720356	TYK2
	rs694739	PRDX5
	rs1805192	PPAR
	rs11225394	MMP8
	rs6478108	TNFSF1
	rs684302	TPH1
Control de frecuencias alélicas	rs11175593	MUC19
	rs11209026	IL23R
Control del equilibrio de Gardy-Weinberg	rs2066844	NOD2 (R702W)
	rs7927997	C11orf30
	rs4958847	IRGM

Del listado original de genes los que se presentan a continuación (Tabla 20) han demostrado una asociación significativa con la presencia de recurrencia post-quirúrgica precoz en este estudio.

Tabla 20. Genes que se asocian con la presencia de recurrencia post-quirúrgica precoz.

Gen	SNP	Cambio	Mejor modelo	OR	P
C1orf106	rs7554511	A/C	Dominante (CC)	1	0,0003
DLG5	rs2579176	C/T	Co-dominante	1	0,0392
ORMDL3				0,15	
GSDMB	rs2872507	A/G	Recesivo (AA)	(0,02-1,19)	0,0232
ZBP2					
IKZF3					
IGF1R	rs1357112	C/T	Dominante (AA)	1	0,0459
IL23R	rs11209026	A/G	Dominante (GG)	1	0,0163
IRF1					
SLC22A4	rs12521868	G/T	Recesivo (AA)	2,98	0,0459
(OCTN1)					
SLC22A5					
(OCTN2)					
IL3					
IRGM	rs133619	A/G	Recesivo	6,70	0,0348

			(GG)	(1,06- 42,45)	
TNFRSF6B					
RTEL1	rs4809330	A/G	Recesivo	13,49	0,0252
SLC2A4RG			(AA)	(1,08- 168,23)	
SMAD3	rs17293632	C/T	Recesivo	4,47	0,0292
			(AA)	(1,17- 17,06)	
TAGAP	rs212388	A/G	Recesivo	0	0,0483
			(GG)		
TNFSF11	rs2062305	A/G	Aditivo	2,62	0,0149
				(1,16- 5,91)	
ZNF365	rs10761659	A/G	Dominante	1	0,0322

De los genes portadores de SNP que se asocian de forma más relevante a la recurrencia post-quirúrgica precoz cabe destacar aquellos con OR significativas:

- **ORMDL3** (*orosomuroid 1-like 3*), es un gen vinculado a la unión proteica y que es especialmente frecuente en población asiática y que se ha asociado al riesgo de asma (264) y a la respuesta a los corticoides en pacientes con asma (265). En los últimos estudios de GWAS se ha relacionado al riesgo de padecer CU (266). De todas formas en este estudio el tener este polimorfismo parece conferir un efecto protector de presentar recurrencia post-quirúrgica precoz.

- **IRF1** (*interferón regulatory factor 1*). Este gen activa la transcripción de los interferones alfa y beta. También ha demostrado jugar un papel importante en la regulación de la apoptosis y la supresión de tumores. La asociación de este gen y el riesgo de EC ya es conocida, formando parte del locus IBD5 haplotipo (junto a OCTN1 y el OCTN2) (267), aunque no se ha descrito previamente como factor de riesgo para la recurrencia post-quirúrgica.
- **IRGM** (*immunity-related GTPase family*). Este gen codifica una proteína importante en la respuesta inmune innata al regular la autofagia en respuesta a patógenos intracelulares. Se ha descrito que mutaciones en este gen aumentan en la susceptibilidad de la EC, e incluso a la recurrencia post-quirúrgica precoz (250).
- La sonda **rs4809330** se la relaciona con tres genes vecinos:
 - **TNFRSF6B** (*tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6b, decoy*): gen de la súper-familia de los receptores del factor de necrosis tumoral. La proteína codificada por este gen tiene un rol regulador en la supresión de la muerte celular (apoptosis) mediada por FasL (*Fas ligand*), actuando como un receptor que compite con los receptores de muerte celular para la unión con los ligandos. Una sobre-expresión de este gen se ha relacionado con tumores gastrointestinales. Es un factor de riesgo conocido para la EC, aunque no existe evidencia de su asociación con la recurrencia post-quirúrgica.

- **RTEL1** (*regulator of telomere elongation helicase 1*). Este gen codifica una helicasa de DNA cuya función es aportar estabilidad, protección y elongación de los telómeros.
- **SLC2A4RG** (*solute carrier family 2 member 4 (SLC2A4) regulator*): la proteína codificada por este gen es un factor de transcripción nuclear que junto al factor 2 potenciador de miocitos activa al gen SLC2A4.
- **SMAD3** (*SMAD family member 3*). Las proteínas SMAD (proteínas intracelulares, cuyo nombre viene de la combinación de dos proteínas: MAD y SMA) son transductores de señal y moduladores transcripcionales que participan de múltiples vías de señalización. Se ha asociado con el riesgo de presentar recurrencia post-quirúrgica de forma global (249).
- **TNFSF11** (*tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11*). Este gen codifica una proteína fundamental para la diferenciación y activación de los osteoclastos. Rol importante en la regulación de la apoptosis. Mutaciones en este gen son conocidas por ser factor de riesgo de osteopenia asociada a la EC (268).

Colectivamente, el perfil genético de los pacientes con recurrencia post-quirúrgica precoz sugiere potenciales alteraciones a nivel de la inmunidad innata, en particular de la autofagia (SMAD3, IRF1, IRGM) y a nivel del ciclo celular (TNFSFR6/RTEL1, TNFS11, SLC2A4RG, SMAD3). El análisis de la función de estos genes mediante la herramienta del Genecodis revela el vínculo de estos genes con el

cáncer, la interacción citoquina-recetor, la endocitosis, la adhesión celular, la apoptosis y el ciclo celular.

5.5 Análisis del transcriptoma

El primer paso para confirmar que los resultados del transcriptoma no son un hallazgo casual, fruto de las múltiples comparaciones, se llevó a cabo la correlación (coeficiente de Pearson) de expresión (qPCR) de 10 genes pre-seleccionados con sus valores obtenidos en el transcriptoma mediante el *array* de cDNA. Sus hallazgos quedan demostrados en la Tabla 21 y dado el resultado global (correlación estadísticamente significativa en el 80% de los genes: 8 de 10 con un coeficiente de Pearson mayor de 0,45), puede darse por válidos y extrapolables para el análisis a los resultados del *array*.

Tabla 21. Correlaciones qPCR-*array* de 10 genes seleccionados (coeficiente de Pearson). Si en el *array* se estudiaban varias sondas del mismo gen, en esta tabla se expresa el mejor resultado de correlación. En negrita los resultados estadísticamente significativos

Gen	Coeficiente de Pearson	Regresión lineal	P
MUC2	-0,69	0,473	< 0,0005
TMIGD1 (GE781695)	-0,82	0,666	< 0,0005
PKIB	-0,72	0,523	< 0,0005
MALM2 (GE873468)	-0,56	0,310	< 0,0005
SMAD3 (GE802702)	0,45	0,454	0,001
HNF4a	-0,45	0,191	0,002
HNF4g	-0,77	0,385	< 0,0005
CNNY (GE576979)	0,36	0,130	0,012
MST1	0,46	0,214	0,001
SLC22A5	-0,26	0,065	0,080

5.5.1 Pacientes con EC vs. controles: *realce de la actividad de la matriz extracelular*

Para evitar la influencia de la inflamación en el transcriptoma (que podría enmascarar particularidades no inflamatorias y diferenciales entre los grupos de pacientes) se realizó la comparación del transcriptoma del tejido ileal sano de controles con el macroscópicamente no inflamado de pacientes. Esta comparación encontró 718 genes con una expresión diferencial significativa ($FDR < 0,005$), de estos 258 sobre-expresados ($FC \geq 2$) y 171 infra-expresados ($FC \leq -2$) en los pacientes en comparación con los controles (Anexo 11).

Las vías enriquecidas en el conjunto de genes infra-expresados en los pacientes con EC se exponen en la Figura 19, mientras que aquellas enriquecidas por los genes sobre-expresados se muestran en la Figura 20.

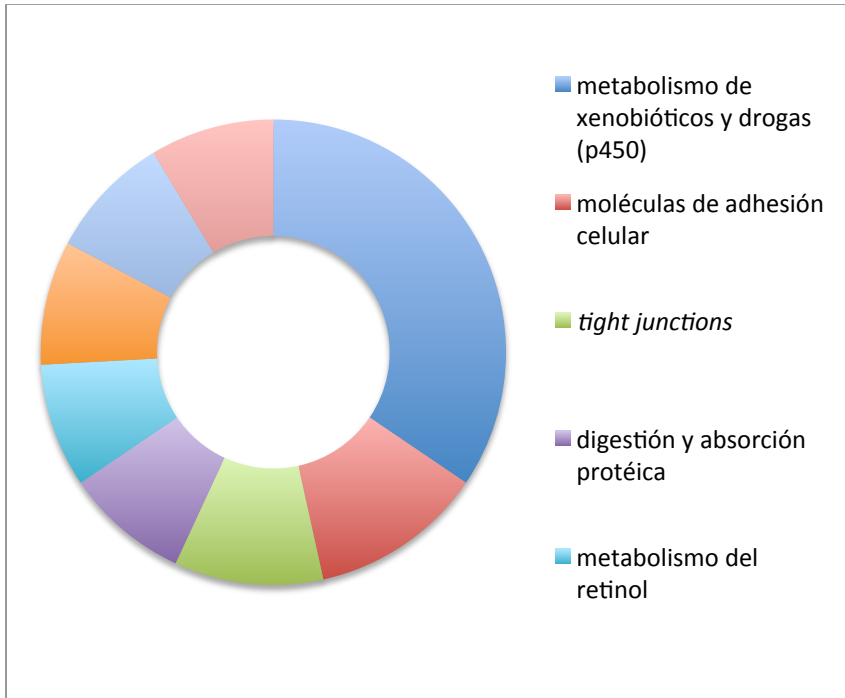


Figura 19. Vías enriquecidas en el conjunto de genes **infra-expresados** en pacientes con EC.

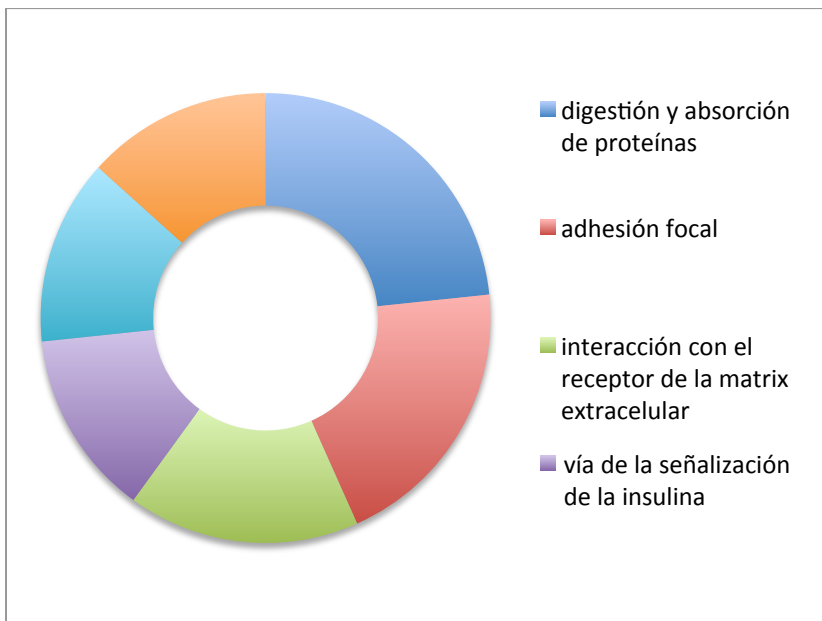


Figura 20. Vías enriquecidas en el conjunto de genes **sobre-expresados** en pacientes con EC.

No se encontró ningún perfil de expresión diferencial en relación a características propias de EC como el patrón de la enfermedad, la indicación quirúrgica, la presencia de enfermedad perianal asociada o el tratamiento al momento de la cirugía (bien fueran salicilatos, inmunomoduladores, antibióticos o tratamiento con anticuerpos anti-TNF).

No obstante, el análisis del transcriptoma indica que los pacientes con EC sufren un descenso de funciones claves de desintoxicación celular, en el fortalecimiento de las uniones para-celulares, en el metabolismo energético, así como en funciones reguladoras de la inmunidad innata. Por otra parte, parecen tener una respuesta inflamatoria relevante, así como una elevada actividad reparativa a nivel de la matriz extracelular.

5.5.2 Expresión genética de la recurrencia post-quirúrgica precoz

Tomando en cuenta todo el transcriptoma, sin criterios previos de selección, el resultado del estudio de vías enriquecidas y funciones biológicas (GSEA) quedan expuestos en la Tabla 22.

Tabla 22. Vías enriquecidas y funciones biológicas más relevantes entre recurrencia y no recurrencia. Las vías descritas de forma individual son aquellas que presentan mayor diferencia entre recurrencia y no recurrencia (FDR < 25% o P < 0,005).

Recurrencia	No recurrencia
Organización los filamentos de actina	Cascada JAK-STAT
Unión a proteínas no	Complejo de la unión apical
	Transporte de carbohidratos

plegadas	Unión de lípidos
Adhesión de sustrato celular	Actividad de transporte transmembrana de hidrógeno
Regulación de la migración celular	Desmontaje de componentes celulares
Respuesta inmune adaptativa	
Regulación positiva en respuesta a estímulos	
Adhesión a la matriz celular	Biosíntesis de los lípidos de membrana
Transporte de potasio	Homeostasis del número de células
Complejo de puertas por voltaje de potasio	Uniones fosfolipídicas
Matriz mitocondrial	Complejo del proteosoma

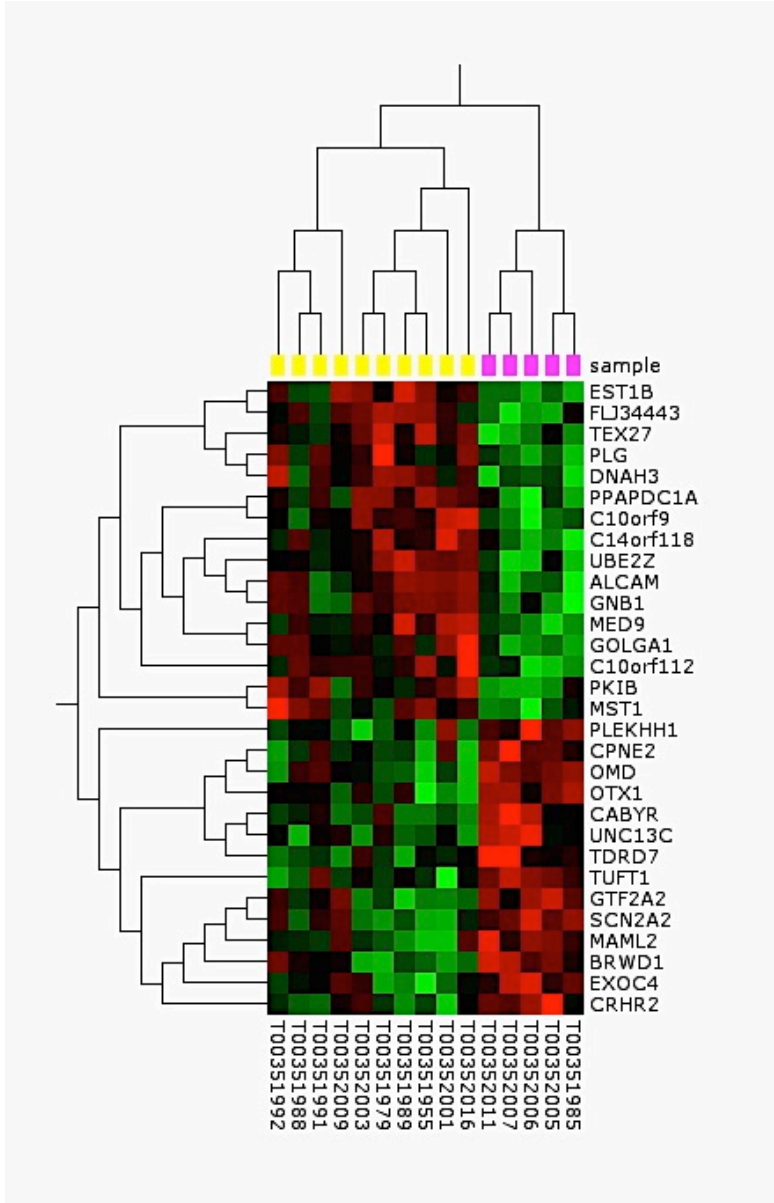
Es difícil extraer conclusiones definitivas del análisis GSEA, pero los pacientes con EC que no presentan recurrencia post-quirúrgica precoz tienen actividades reparativas e inmunológicas más evidentes que los pacientes que sí que la presentan. En ambos grupos aparecen actividades de recuperación de la homeostasis celular, aunque implicando distintos mecanismos.

Al analizar el transcriptoma del tejido ileal de forma individual (LIMARR), no se consiguió ningún gen con un FDR de 0, así que con criterios estadísticos menos restrictivos ($P = 0,005$) los genes encontrados en los pacientes que presentaron recurrencia en comparación con aquellos que no la presentaron quedan reflejados en la Tabla 23 y en la Figura 21.

Tabla 23 Transcriptoma de la recurrencia post-quirúrgica precoz según LIMA-R (P < 0,005 y FC ≤ -1,5 o ≥ 1,5)

Identificador	Gen	FC	P
GE53136	CUTL2	-1,919	0,004
GE475923	MAML2	-1,755	0,002
GE61398	CABYR	-1,641	0,001
GE578953	UNC13C	-1,585	0,002
GE83480	TRIM51	-1,521	0,004
GE581231	MGC45922	-1,507	0,004
GE523463	UBE2Z	1,534	0,001
GE57294	SQLE	1,605	0,003
GE83081	DNAH3	1,650	0,001
GE81178	PLG	1,659	0,002
GE56226	GOLGA1	1,726	0,001
GE739928	C10orf112	1,743	0,001
GE82253	C14orf118	1,762	0,001
GE840484	MED9	1,772	0,001
GE85234	ASTN	1,782	0,003
GE84857	C6orf208	1,837	0,005
GE575009	PPAPDC1A	1,880	0,001
GE643432	C10orf9	1,907	0,001
GE82575	MST1	2,096	0,002
GE80398	AKR1C2	2,310	0,003
GE57008	CLDN2	2,325	0,004
GE519515	PKIB	2,809	0,001

A.



B.

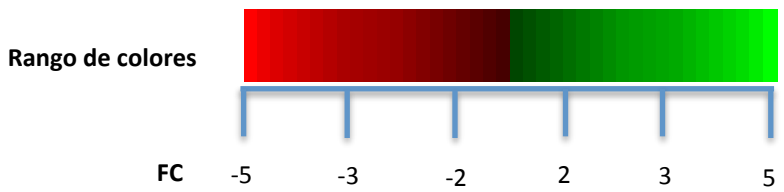


Figura 21. A. *Heatmap* de los genes con expresión diferencial entre pacientes con (fucsia) y sin (amarillo) recurrencia post-quirúrgica precoz (según análisis de QLucore). B. Significado del rango de colores y su relación con el FC.

Agrupando todos estos genes según las características de su expresión en la recurrencia post-quirúrgica (GENECODIS) los resultados de los genes infra-expresados se representan en la Figura 22 mientras que los sobre-expresados en la Figura 23.

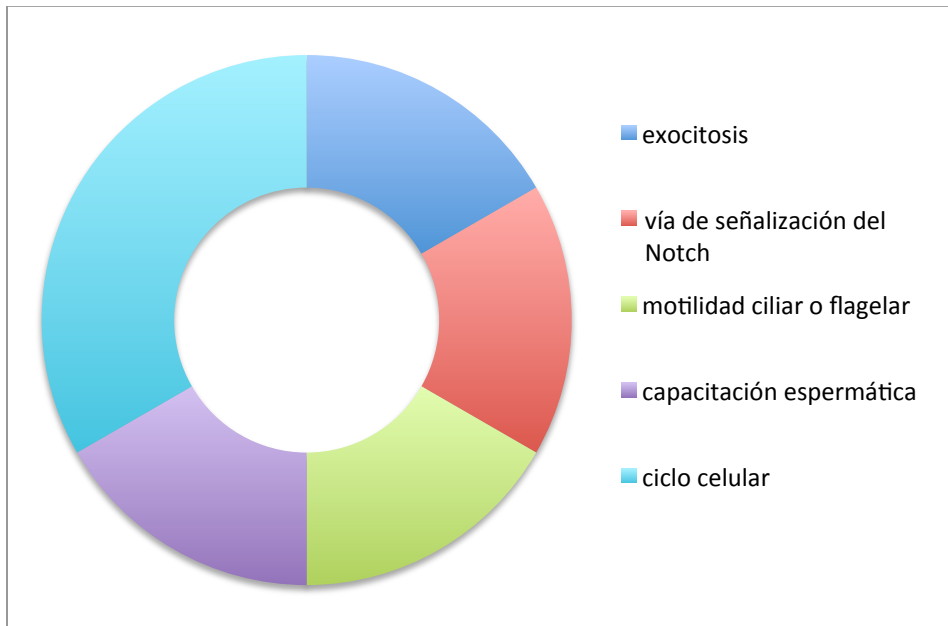


Figura 22. Genes infra-expresados en los pacientes con recurrencia post-quirúrgica, según su agrupación funcional y tomando en cuenta los procesos biológicos (GENECODIS).

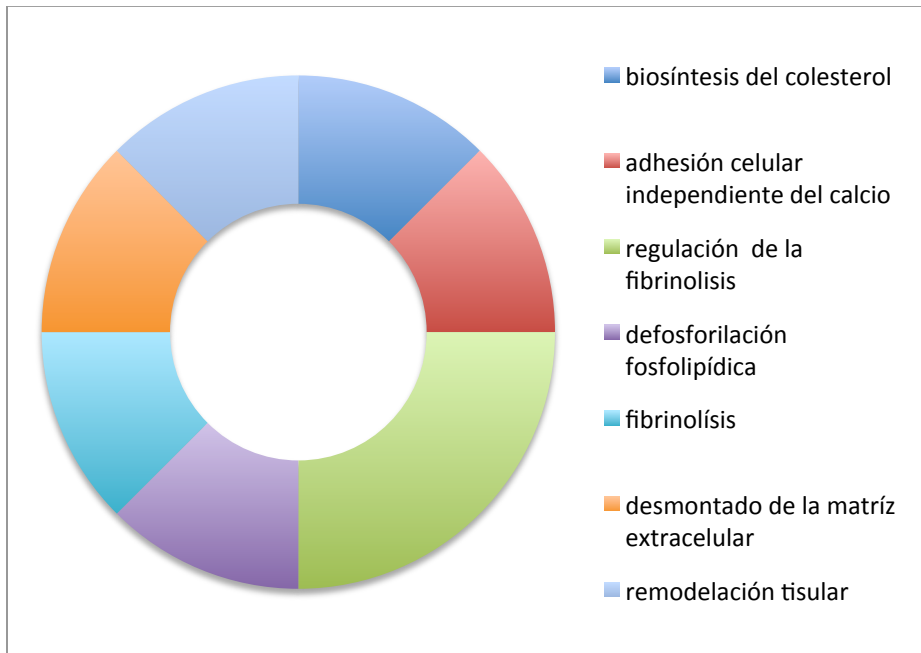


Figura 23. Genes sobre-expresados en los pacientes con recurrencia post-quirúrgica, según su agrupación funcional y tomando en cuenta los procesos biológicos (GENECODIS).

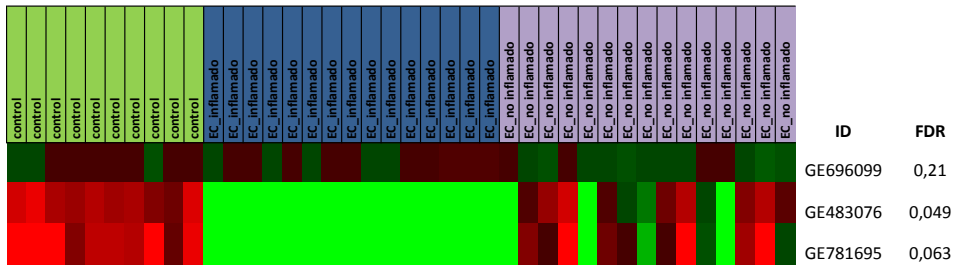
Los resultados anteriores sugieren que en los pacientes con recurrencia post-quirúrgica precoz existen cambios singulares a nivel del ciclo celular, principalmente por lo que respecta a la remodelación, polarización o transformación celular, donde probablemente la vía del destino celular *Notch* juega un importante papel. Por otro lado, estos pacientes también mantienen una elevada actividad de la matriz extracelular, vinculada principalmente a la reparación del tejido intestinal. En conjunto, estos datos sugieren que los pacientes con recurrencia tienen una actividad biológica diferencial focalizada en la remodelación de las lesiones a nivel del epitelio. Para intentar precisar los mecanismos subyacentes en la EC y

más concretamente en la recurrencia post-quirúrgica precoz se optó por profundizar en las actividades biológicas destacadas en los pacientes con recurrencia post-quirúrgica. En primer lugar se decidió estudiar si el gen con más cambio en la comparación entre pacientes y controles, **TMIGD1**, se asocia a alguna de las actividades singulares de los pacientes con recurrencia post-quirúrgica, ya sea a nivel de la actividad de la matriz extracelular, o en la definición del linaje de las células epiteliales. Por otra parte, se eligió evaluar las vías del destino celular, concretamente la vía **Notch**, para investigar su relación con la recurrencia post-quirúrgica.

5.6 Estudio del TMIGD1

En el **transcriptoma** de los pacientes (tanto si se toma en cuenta el tejido ileal francamente inflamado como el macroscópicamente no inflamado) el mRNA de TMIGD1 se muestra notoriamente disminuido (Figura 24), en las tres sondas que se han utilizado del gen (GE696099, GE48076 y GE78195). La sonda que muestra mayor diferencia es la GE781695. Las diferencias de FC entre controles y pacientes quedan reflejadas en la Tabla 24.

A.



B.

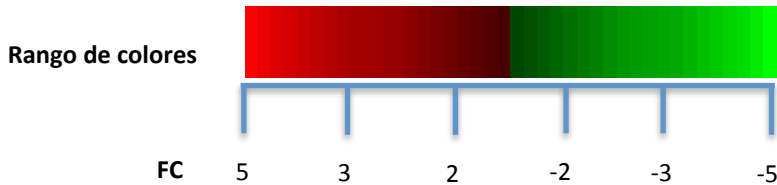


Figura 24. A. Expresión de TMIGD1 entre controles (verde) y pacientes, tanto si se compara tejido francamente inflamado (azul) como macroscópicamente no inflamado (malva). B. Significado del rango de colores y su relación con el FC.

Tabla 24. Diferencias de expresión (transcriptoma) del TMIGD1 (GE781695) en pacientes en comparación con controles.

Tipo de tejido ileal	FC
Macroscópicamente no inflamado	-26
Inflamado	-109

No hubo diferencias en la expresión del TMIGD1 mediante el estudio del transcriptoma en la comparación de los pacientes que posteriormente presentaron recurrencia post-quirúrgica precoz de

aquellos que no la presentaron, tanto en el tejido inflamado como en el no inflamado. La expresión de TMIGD1 en el tejido ileal no inflamado en relación a la recurrencia se describe en la Tabla 25.

Tabla 25. Diferencias de expresión (transcriptoma) del TMIGD1 (GE781695) en pacientes que posteriormente presentaron recurrencia post-quirúrgica precoz de aquellos que no la presentaron.

Tipo de tejido ileal de pacientes (frente a controles)	FC
No recurrencia post-quirúrgica	-122,7
Recurrencia post-quirúrgica	-89,5

Los hallazgos a nivel del perfil de expresión se confirmaron mediante la realización de **RT-qPCR** (Figura 25).

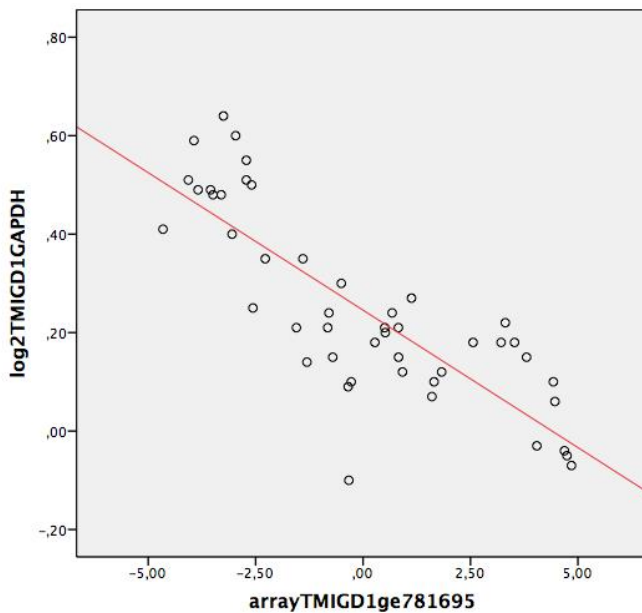


Figura 25. Correlación entre la presencia de TMIGD1 en el *microarray* de RNA y la RT-qPCR (normalizado por el gen HK: GAPDH). Coeficiente de Pearson = -0,816. $P < 0,0001$. R_2 linear = 0,666

Ante este resultado se decidió continuar con el **estudio de la expresión** de TMIGD1. Se realizaron varias comparaciones del nivel de mRNA (RT-PCR) de TMIGD1 según grupos. Los resultados entre controles y pacientes quedan reflejados en la Figura 26, demostrando claramente que los pacientes tienen menos expresión de TMIGD1 si se comparan con los controles, independientemente del tener o no inflamación.

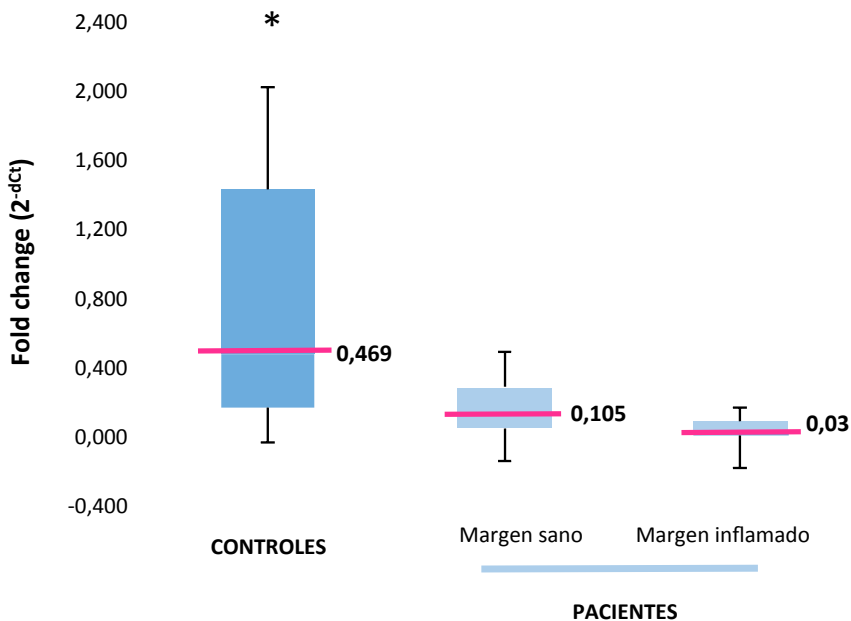


Figura 26. Resultados de la diferencia de expresión de RNAm por técnica de RT-qPCR. * $p < 0,007$, en comparación con la expresión en pacientes, según el margen sano o inflamado (U-Mann bilateral, mediana e intervalo intercuartil).

Para profundizar el conocimiento del TMIGD1 en la EC se comparó la expresión tomando en cuenta si los pacientes presentaban en el futuro recurrencia post-quirúrgica precoz o no (tomando en cuenta el margen sin inflamación). Su resultado (Figura 27) demuestra que la expresión de TMIGD1 en el momento de la cirugía no influye en el desarrollo precoz de recurrencia.

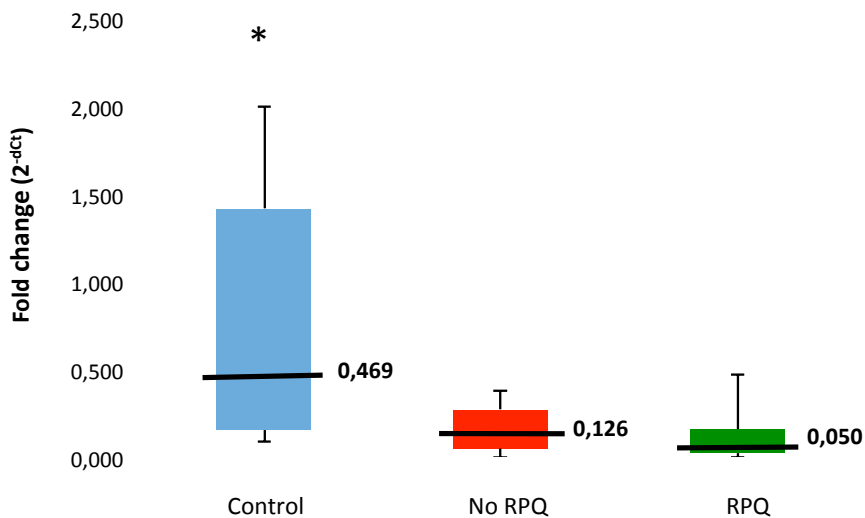


Figura 27. Diferencias de expresión de TMIGD1 comparando controles con pacientes con recurrencia post-quirúrgica precoz (RPQ) y sin ella (No RPQ) (U-Mann bilateral, mediana e intervalo intercuartil). * $p < 0,032$ vs pacientes con RPQ o sin ella.

Los niveles de mRNA de TMIGD1 determinados mediante microarrays y RT-PCR son coincidentes, tanto respecto a los márgenes como entre los fenotipos de pacientes analizados. Para comprobar si la expresión de TMIGD1 se traducen a proteína de forma equivalente, se realizó una aproximación mediante *western blot*.

Con este análisis se observó que la proteína de TMIGD1 se detectaba en la banda correspondiente al peso 23-24KDa en todas las condiciones del estudio (controles, pacientes con margen ileal sano o inflamado). A pesar de ello, en algunas ocasiones, en muestras de controles o pacientes con margen ileal sano, se detectó una tenue banda de 29-30KDa (Figura 28).

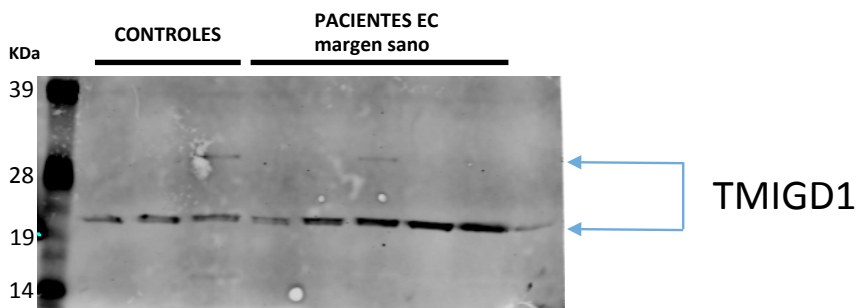


Figura 28. *Western blot* de TMIGD1. EC = enfermedad de Crohn

Para comprobar que los cambios observados en el peso molecular de TMIGD1 no eran debidos al protocolo de extracción proteica empleado se implementó el ensayo con muestras sometidas a otra modalidad de extracción (con RIPA) o sin precipitar.

En este estudio se emplearon células HT-29 provenientes de cultivos celulares de adenocarcinoma de colon de origen humano como control para los distintos procesos de extracción. Los resultados de estos experimentos quedan reflejados en la Figura 29, demostrando, por una parte, que las células de adenocarcinoma colónico presentan una isoforma más pesada (29-30kDa) que la de pacientes y controles (23-24KDa). Por otro lado, quedó demostrado que ni la forma de

extracción proteica ni el procedimiento de precipitación interfiere con el peso molecular del TMIGD1 detectado en cada ocasión.

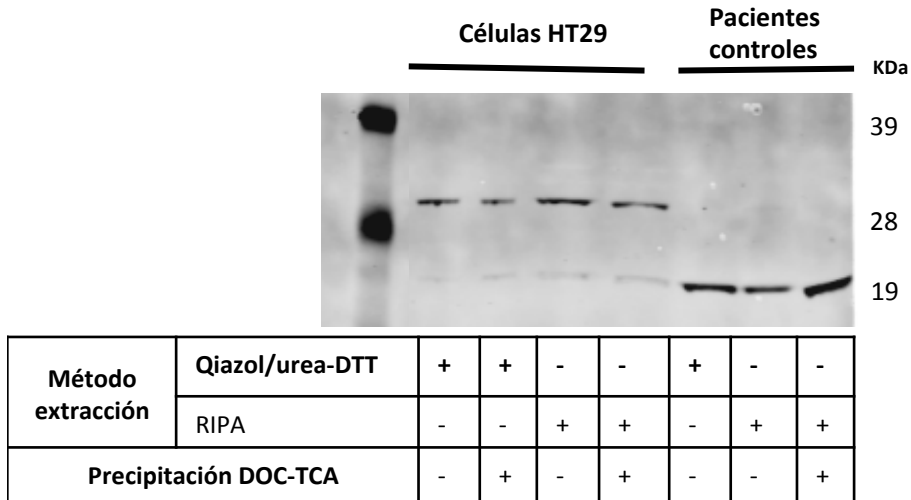


Figura 29. Experimentos para descartar que el TMIGD1 tenga un peso molecular diferente al esperado debido a la técnica del *western blot*.

A la vez, para descartar que las diferencias de peso molecular fueran debidas a que TMIGD1 estuviera deglicosilada (lo que supondría detectarlo en la banda inferior), se realizó un ensayo para extraer los grupos glucídicos de todas las muestras utilizadas en el *western blot*. A las muestras del estudio de pacientes con EC se incorporaron extractos proteínicos de células HT-29 (control monocelular) y a muestras de ratones de la cepa C57BL/J6 (control intestinal pluricelular), ambos casos con isoformas más pesadas de TMIGD1. Los resultados quedan expuestos en la Figura 30 demostrando que el TMIGD1 se encuentra en forma no glicosilada en todos los casos.

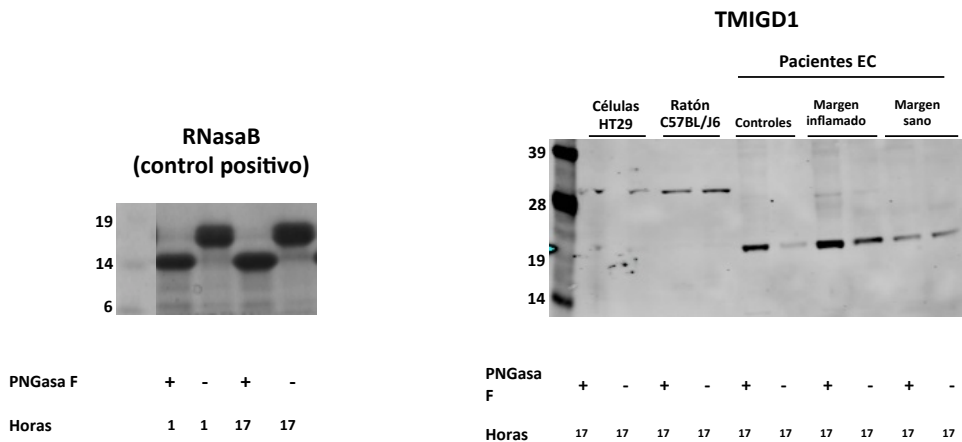


Figura 30. Resultados del ensayo de deglicosilación

Los resultados anteriores fueron contrastados en la base de datos UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q6UXZ0>) que confirmó la presencia de dos isoformas de esta proteína en humanos: una de 29KDa y otra de 24KDa, y una sola en ratones: 29KDa. Por tanto, el peso molecular de pacientes y controles indica que la isoforma mayoritaria es la de menor tamaño.

Dado que se comprueba que no existe ninguna influencia metodológica, ni de las modificaciones estructurales que hagan que TMIGD1 varíe su peso molecular, se decidió realizar los *western blot* definitivos con todas las muestras y normalizarlos con GAPDH (proteína HK).

A partir de estos hallazgos se repitieron las comparaciones realizadas previamente con la expresión de mRNA. En la Figura 31 se puede observar la traducción a proteína entre pacientes y controles tomando en cuenta ambos márgenes. Como puede verse, no existe diferencia.

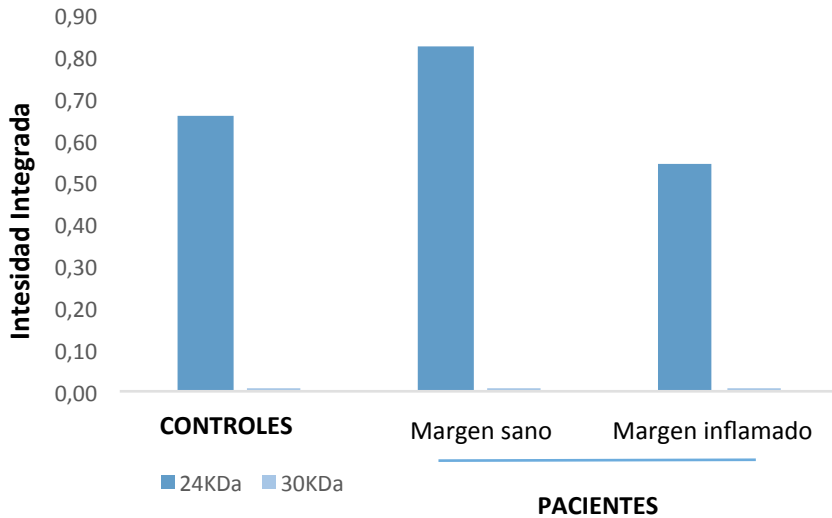


Figura 31. Comparación del nivel proteínico de TMIGD1 entre pacientes y controles, tomando en cuenta márgenes inflamados y sanos en los pacientes, mediante *western blot*

Por otra parte, cuando se realizó la comparación de nivel de proteína entre pacientes con y sin recurrencia post-quirúrgica pudo verse como los pacientes que desarrollarán recurrencia tienen menor nivel de TMIGD1 si se comparan con los pacientes que posteriormente no presentarán recurrencia (Figura 32).

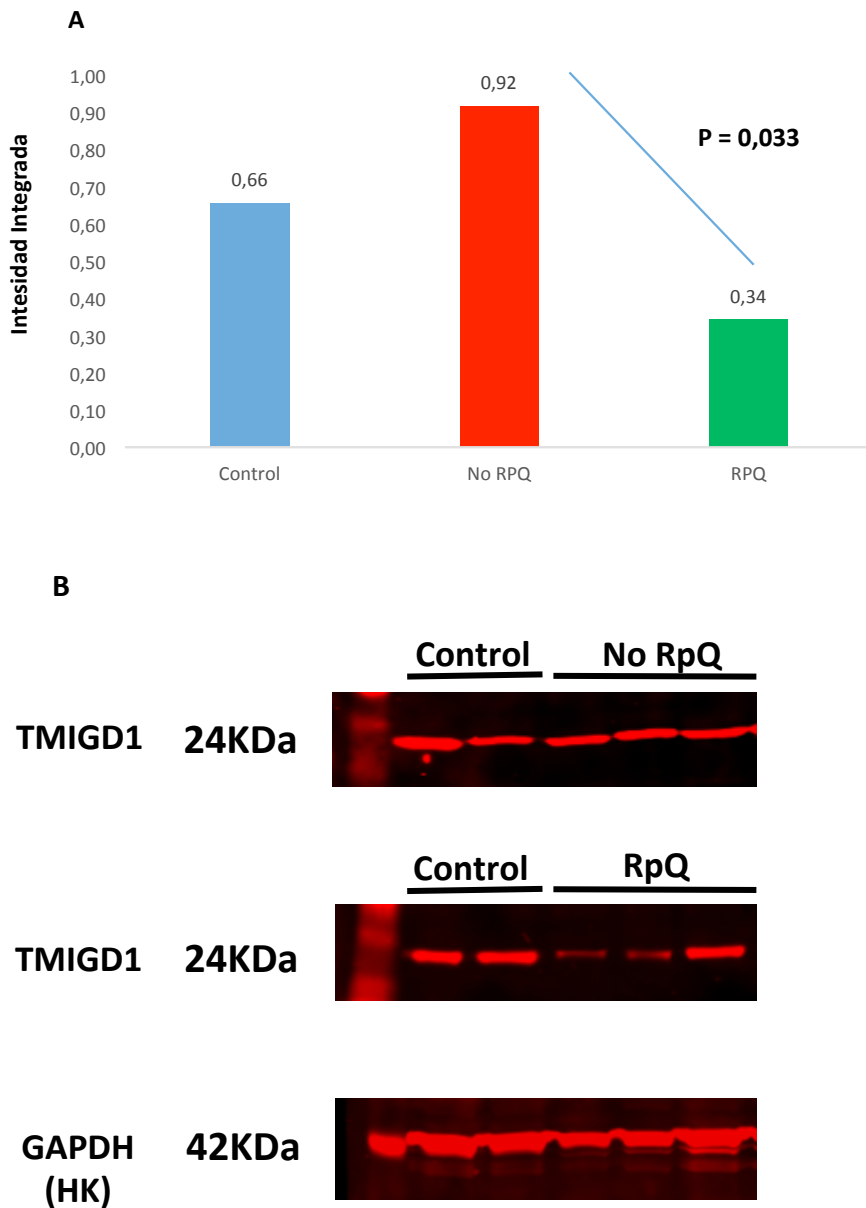


Figura 32. Comparación del nivel proteínico mediante *western blot* de TMIGD1 entre pacientes con (RPQ) y sin recurrencia post-quirúrgica precoz (No RPQ). A. Medias de intensidad integrada. B. Imágenes del gel de electroforesis. HK: *house-keeping*

Si se comparan los resultados obtenidos con el *western blot* y los de expresión de mRNA se comprueba que no existe correlación lineal significativa entre ambos (correlación de Pearson = 0,122). No obstante, mientras controles y pacientes con recurrencia post-quirúrgica precoz mantienen un perfil similar entre expresión y proteína, los pacientes sin recurrencia post-quirúrgica precoz mantienen una diferencia apreciable, ya que respecto a los controles la presencia de proteína es mayor pero la expresión de mRNA es menor, lo que sugiere la existencia de mecanismos post-transcripcionales de regulación de TMIGD1 en estos pacientes (Figura 33).

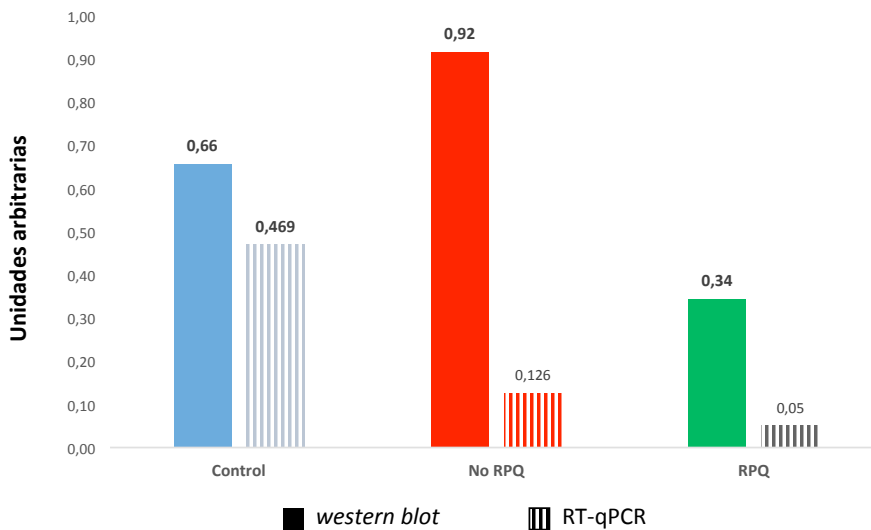


Figura 33. Comparación de los resultados de TMIGD1 a nivel proteínico (*western blot*) y de expresión (mRNA: RT-qPCR). RPQ = recurrencia post-quirúrgica.

Finalmente, para complementar la información sobre TMIGD1, se llevaron a cabo técnicas de **immunolocalización** para de esta forma demostrar su ubicación a nivel tisular e intentar hacer una aproximación a la función que esta proteína podría tener a los pacientes con EC. Ya que por investigaciones previas (269) el TMIGD1 parece estar localizado en las células epiteliales se decidió hacer un ensayo de inmunofluorescencia co-localizando TMIGD1 y NOD2 (Figura 34). Se decidió incluir la co-localización con NOD2 dado que es una proteína citoplasmática de especial relevancia en la patogenia de la EC.

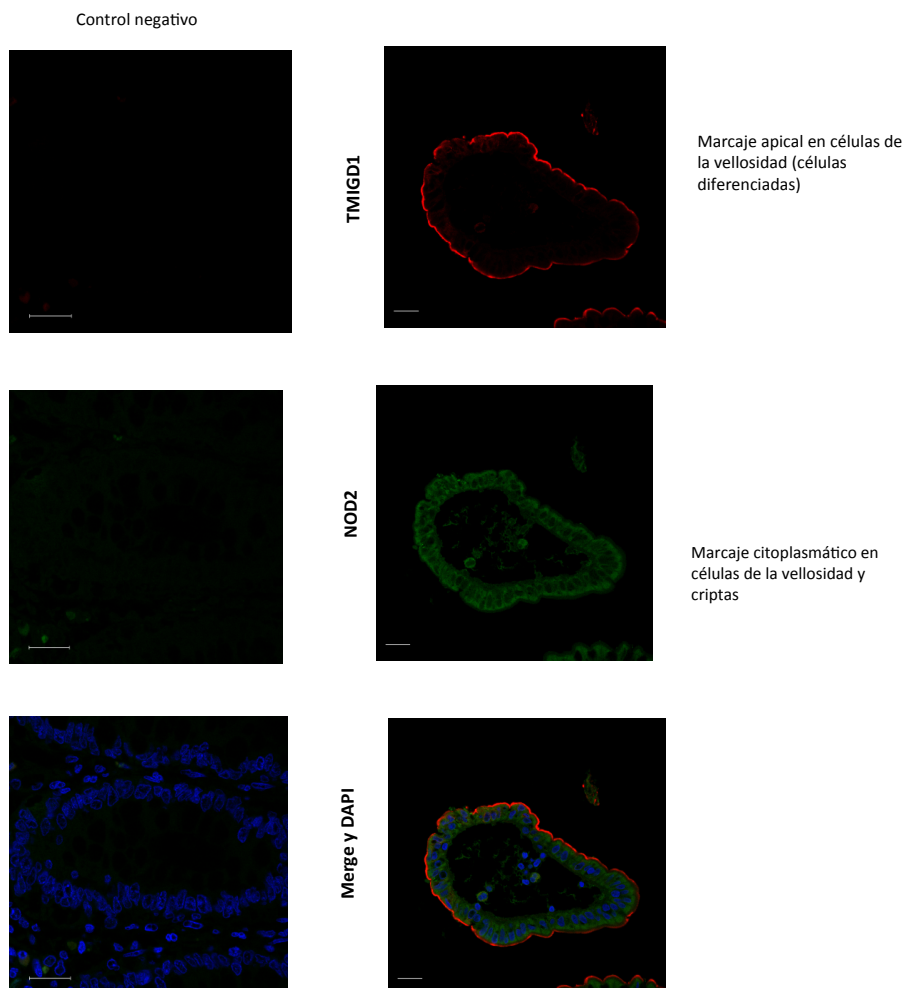
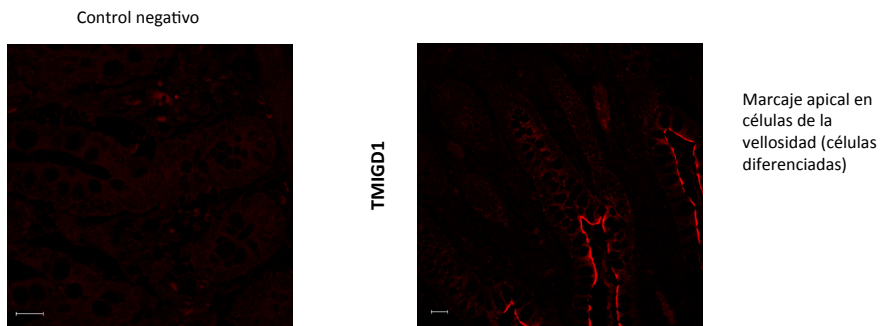


Figura 34. Co-localización mediante inmunofluorescencia de TMIGD1-NOD2. Contra-tinción nuclear con DAPI (Azul = DAPI, rojo = TMIGD1, verde= NOD2). Escala = 20 μ m.

De forma general (controles y pacientes) presentan la distribución del TMIGD1 mayoritariamente apical en las células epiteliales intestinales bien diferenciadas ya que su presencia en las criptas es nula, aunque sin mantener la continuidad de la señal como ocurre en los controles. En ocasiones, los pacientes con EC muestran una localización citoplasmática. Para precisar su localización, TMIGD1 se co-localizó con isomaltasa-sucrasa, enzima del ápice de los *microvilli* en las células epiteliales del intestino. A pesar que no se han apreciado diferencias sustanciales entre los pacientes con y sin recurrencia post-quirúrgica, el resultado demostró claramente que TMIGD1 se halla en los *microvilli* de las células del epitelio intestinal diferenciado (Figura 35).



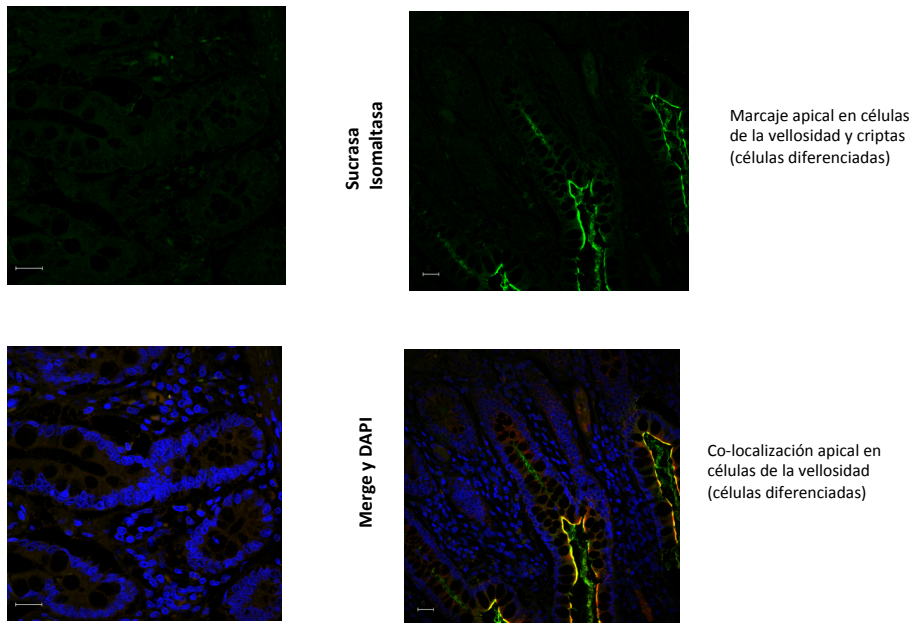


Figura 35. Co-localización mediante inmunofluorescencia de TMIGD1-Sucrasa-isomaltasa. Contra-tinción nuclear con DAPI (Azul = DAPI, rojo = TMIGD1, verde= Sucrasa-isomaltasa). Escala = 20 μ m.

5.6.1 Conclusiones del estudio del TMIGD1

TMIGD1 es una proteína en su isoforma truncada (isoforma 2), no glicosilada, menos expresada en pacientes que evolutivamente presentaran recurrencia post-quirúrgica precoz.

TMIGD1 se localiza en los *microvilli* de las células epiteliales polarizadas y bien diferenciadas, lo que lo relaciona con mecanismos de recuperación de la homeostasis, cuya función aún es desconocida.

Los resultados del *microarray* desvelan acciones de renovación ciliar y diferenciación de las células del epitelio intestinal que pueden vincular TMIGD1 con las vías del destino celular, como la vía de

señalización *Notch* que se destaca en el estudio transcriptómico de la recurrencia post-quirúrgica precoz.

5.7 Estudio de las vías del destino celular: vía *Notch*

La exploración del transcriptoma de la recurrencia reveló una vía sin relación a la inflamación y que no ha estado descrita previamente en relación a la patogenia de la EC: la vía *Notch*. Esta vía de señalización, junto con las vías Wnt y Bmp, se encarga de definir el destino de las células madre en las criptas intestinales. A pesar de que estas vías participan en definir el fenotipo definitivo en diversos tipos celulares, su papel más relevante es en el epitelio intestinal donde adquieren un papel clave en el mantenimiento de la barrera epitelial. Por tanto, una hipótesis en relación a su función en la recurrencia post-quirúrgica podría ser que los pacientes que experimentan recurrencia post-quirúrgica precoz pierden el equilibrio homeostático, de las vías que controlan el destino celular, aún más que los pacientes sin recurrencia, a pesar de que ambos padezcan la misma enfermedad.

Para empezar a explorar esta hipótesis se comprobó que los hallazgos del transcriptoma en relación a uno de los genes implicados en la vía *Notch* (*MAML2 -mastermind-like 2-*) se correlacionaban con los hallazgos de la qPCR en el tejido, como puede verse expuesto en la Figura 36. La proteína codificada por este gen forma parte de la regulación positiva la vía *Notch*.

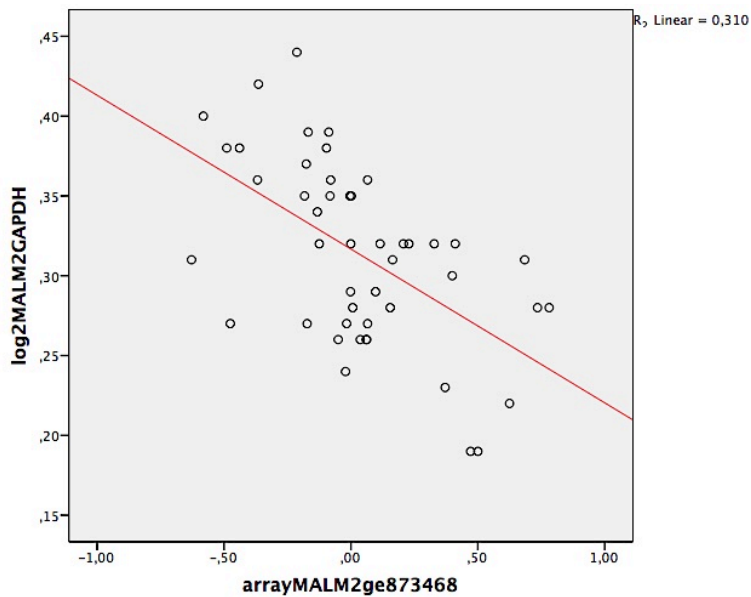


Figura 36. Correlación entre la presencia de MAML2 en el *microarray* de RNA y la RT-qPCR (normalizado por el gen HK: GAPDH). Coeficiente de Pearson = -0,556. $P < 0,0001$. R_2 linear = 0,310

El siguiente paso fue comprobar la presencia de proteínas relacionadas con las vías del destino celular. Para esto se realizó un *microarray* de proteínas, descrito en el capítulo de materiales y métodos. Las medias de expresión de todas las proteínas evaluadas se encuentran en la Tabla 26.

Tabla 26. Medianas de expresión de proteínas (pg/ml) del margen intestinal no inflamado en pacientes por *microarrays* (intervalo intercuartil)

Grupo funcional	Proteína	Recurrencia post-quirúrgica precoz	No recurrencia post-quirúrgica precoz
Secreción	S100A8	11683 (9982-21785)	8462 (6274-100006)
	S100A9	4471 (2820-7067)	3465 (3126-3677)
	TFF3	31630 (11523-44651)	12033 (4529-21200)
	DEFB1	2124 (1343-5128)	1725 (1182-2421)
	MUC1	346 (266-4117)	993 (433-1290)
	MUC2	1551 (654-1654)	1122 (779-1220)
	HP	59081 (51677-89623)	76513 (27851-107315)
De la vía Wnt	APC	2890 (2039-6019)	3295 (1113-5429)
	KLF4	2112 (1683-5527)	1910 (1612-2109)
	CEACAM5	4687 (3316-9928)	2360 (1864-4029)
	DSG2	5297 (3351-7697)	3004 (2818-3127)
	B-catenina	27590 (21653-54594)	14760 (12641-33490)

De la vía Bmp	BMPR1B	1968 (1313-4070)	2234 (1056-3377)
	BMPR2	1988 (1461-5513)	1508 (1338-1769)
	BMPR1AALK3	7835 (3338-9736)	5080 (4196-8496)
	SMAD7	1562 (561-2829)	1916 (1384-2861)
	SMAD4	4666 (3055-11577)	3005 (1871-3468)
	TGFR1I	6412 (3946-10792)	4162 (3425-4704)
De la vía <i>Notch</i>	NOTCH1	1689 (850-3501)	1245 (582-1409)
	NOTCH2	21194 (13115-33963)	10556 (9222-17801)
	CyclinD1	10170 (6064-22325)	3977 (3421-4528)
	ADAM17	12115 (7297-24901)	7222 (5472-8966)
	HES1	910 (521-2569)	1596 (840-2896)
	DLL1	4509 (2019-8573)	2959 (2155-4055)
	MAML1	9410 (4984-15742)	6049 (4996-7845)
	JAG1	10207 (5823-20748)	5465 (4380-8128)

Comunes a las tres vías de destino celular	HNF1A	12384 (9726-22523)	10499 (8440-1321)
	HNF4A	3826 (2120-8579)	2408 (1761-4261)
	HNF4G	3036 (1942-5991)	1398 (987-1961)
De señalización	IL17	2671 (1936-6170)	3409 (2276-3928)
	IL17F	1451 (1048-4649)	2375 (1151-3426)
	TGFB1	4477 (2462-5262)	5824 (4379-6851)
	GP96	3134 (1699-6091)	3933 (3424-5219)
	ATF2	7949 (3097-11161)	2763 (2529-3358)

De las proteínas evaluadas, aquellas con expresión diferencial entre pacientes con o sin recurrencia post-quirúrgica precoz se muestran en la Figura 37.

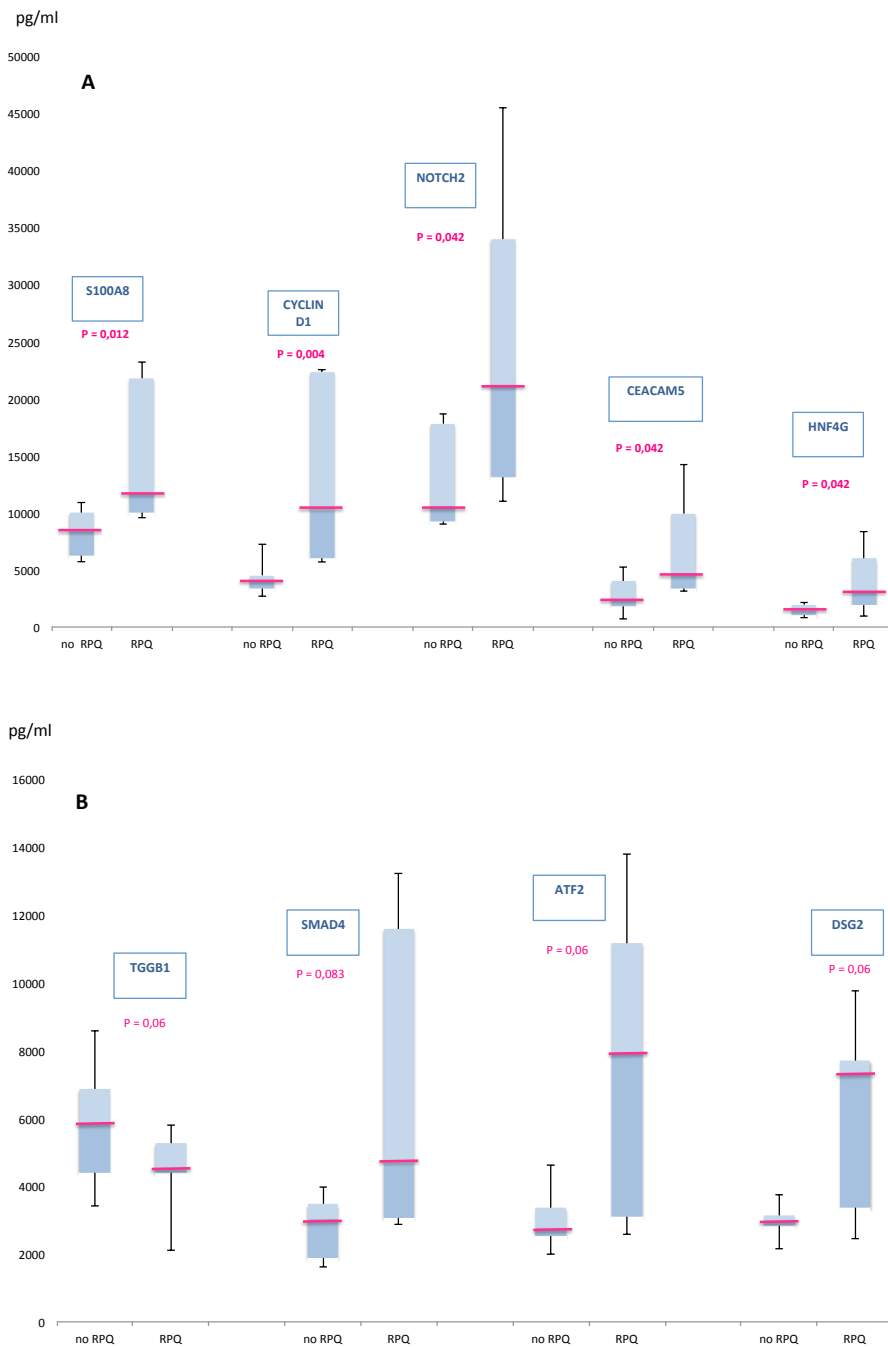


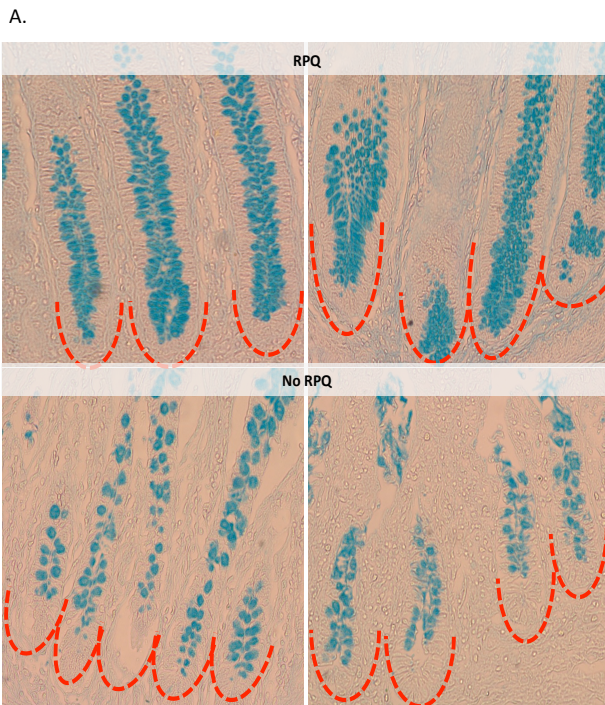
Figura 37. Diferencias en la expresión de proteínas (pg/mL) entre los pacientes con EC que experimentan recurrencia post-quirúrgica precoz o no. A. Proteínas con diferencia estadísticamente significativa. B. Proteínas con diferencia que muestra

una tendencia estadísticamente significativa. RPQ = recurrencia post-quirúrgica precoz.

Estos hallazgos confirman que los pacientes con EC que desarrollan recurrencia post-quirúrgica precoz presentan niveles diferentes de proteínas relacionadas con varias vías del destino celular, sobretodo la vía *Notch*, en comparación con los pacientes con EC y sin recurrencia post-quirúrgica precoz. Las diferencias entre pacientes con y sin recurrencia post-quirúrgica precoz alcanzan la significación estadística, mostrando cambios en proteínas relacionadas con la diferenciación de los linajes celulares del epitelio, y una tendencia a disminuir la citoquina anti-inflamatoria TGF β 1 en la recurrencia post-quirúrgica, que, entre la gran variedad de procesos biológicos que controla, destaca la modulación de procesos de diferenciación celular en distintos epitelios. Cabe recordar que estos son hallazgos del estudio del tejido ileal macroscópicamente no inflamado proveniente de las piezas de resección ileocecal.

Por último, se utilizaron las muestras ileales incluidas en parafina para identificar como los cambios a nivel molecular detectados pueden afectar el linaje definitivo que adquieren las células del epitelio intestinal. Para ello, se estudiaron células caliciformes (tinción azul de Alcian), la proliferación epitelial (anti-Ki67, Dako, Dinamarca) y las células madre (anti-Lrg5, LSBio, EEUU). El estudio de estas estirpes celulares epiteliales en las criptas intestinales (donde se localiza la actividad principal de las vías del destino celular como *Notch*) demuestra que los pacientes con recurrencia post-quirúrgica precoz tienen mayor concentración de células caliciformes en las criptas

(Figura 38 A). Estos resultados muestran una alteración de base en la concentración de células caliciformes en el momento de la resección intestinal. Los pacientes que desarrollarán recurrencia presentan mayor concentración de células caliciformes en las criptas ileales que los que no la presentarán (Figura 38 B). De, todas formas, al contrastar estos resultados con las biopsias obtenidas en el seguimiento endoscópico posterior a la cirugía, no se apreció un mantenimiento de esta diferencia en el número de células caliciformes según las biopsias provinieran de un íleon con o sin recurrencia post-quirúrgica (Figura 38 B). También se evaluó la presencia de células caliciformes en las columnas vellositarias (Figura 38 C), aunque en este caso no existe diferencia entre pacientes que desarrollarán o no recurrencia respecto a la condición control.



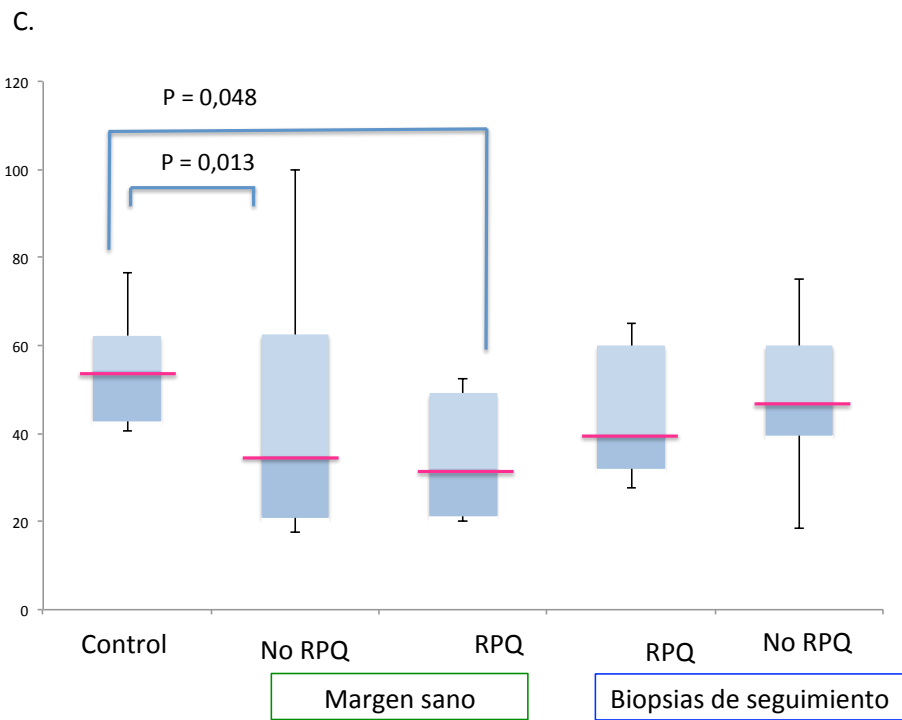
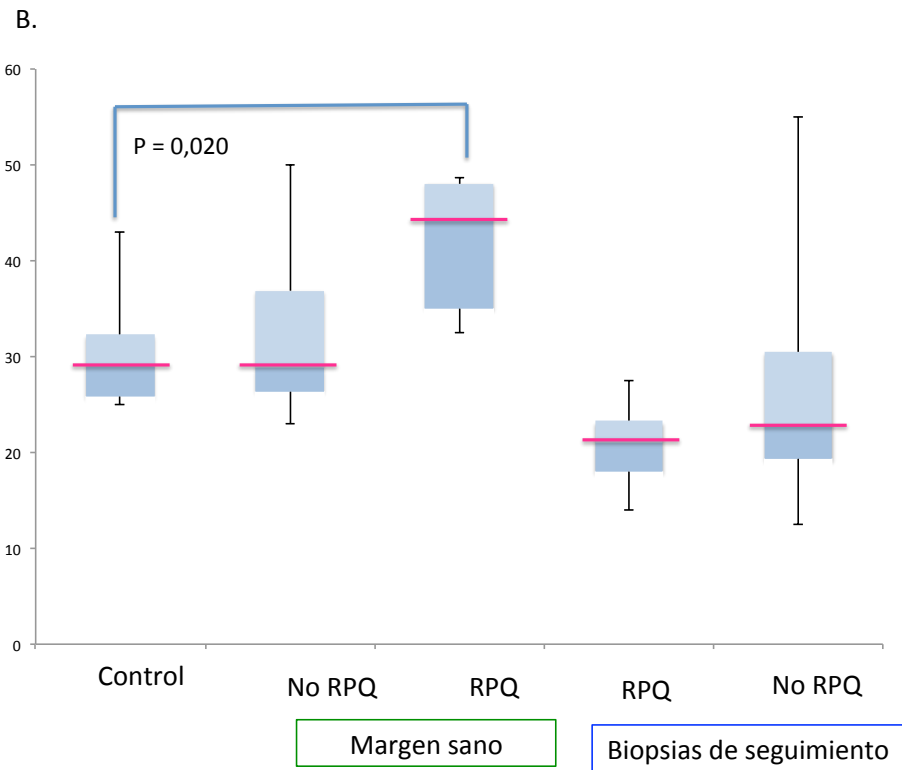


Figura 38. A. Células caliciformes en las criptas del margen no inflamado entre pacientes con y sin recurrencia post-quirúrgica precoz. Tinción azul de Alcian. X200 aumentos. RPQ = recurrencia post-quirúrgica precoz. B. Distribución de células caliciformes en **criptas** en controles, piezas de resección (margen sano) y en biopsias de seguimiento (con y sin recurrencia post-quirúrgica precoz). C. Distribución de células caliciformes en **columnas** en controles, piezas de resección (margen sano) y en biopsias de seguimiento (con y sin recurrencia post-quirúrgica precoz).

El resto de células epiteliales analizadas y de los marcadores de proliferación celular no mostraron cambios significativos entre pacientes con y sin recurrencia (Anexo 12).

5.7.1 Conclusiones del estudio de la vía *Notch*

Una distinta actividad de la vía de señalización *Notch* se ha detectado en la pieza de resección del íleon de pacientes con EC que desarrollarán recurrencia post-quirúrgica precoz, lo que sugiere una base fisiopatológica de esta complicación en la EC.

Varias de las proteínas que participan en esta vía (CYCLIN D1, NOTCH2, CEACAM, HNFAG) presentan una expresión diferencial y estadísticamente significativa entre los pacientes que evolutivamente presentarán recurrencia precoz en comparación con aquellos que no la presentarán.

La producción de TGF β 1 está disminuida en los pacientes que presentarán recurrencia precoz, lo que podría corresponder a una

menor modulación en la diferenciación celular en el epitelio intestinal.

Un gran número de células caliciformes en las criptas podrían ser un marcador precoz de recurrencia post-quirúrgica a nivel tisular.

DISCUSIÓN

La transcriptómica es una herramienta útil para descifrar la patogenia de enfermedades complejas, como es la EC. Su ventaja fundamental radica en la capacidad de estudiar los perfiles de expresión entre dos condiciones de manera general, pero también delineando fenotipos o fases evolutivas diferentes, consiguiendo mayor precisión que el estudio genómico tradicional (estudios de asociación o GWAS). De todas formas, a la par de la evolución del conocimiento sobre la expresión, parece que existen eventos más complejos que únicamente la transcripción, además del hecho que supone el descubrimiento continuo de nuevos mRNA implicados (212). Por otra parte, el estudio del transcriptoma mediante la tecnología de *microarrays* utiliza un abordaje bioinformático que debe ser corroborado mediante técnicas como la qPCR o el estudio proteómico, por lo que utilizar únicamente la transcriptómica es insuficiente para definir de forma taxativa una vía como alterada o para sugerir un biomarcador en una condición particular, como podría ser la recurrencia post-quirúrgica en el caso de la EC.

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar en profundidad los perfiles de expresión génica intestinal en un subgrupo bien caracterizado de pacientes con EC, tanto comparándolo con controles como intentado determinar el perfil de expresión génica de una de las limitaciones más importantes de la cirugía en la EC: la recurrencia post-quirúrgica. Se ha optado por este abordaje para poder explorar todo el conjunto de transcritos (mRNA) conocidos hasta el momento, con la idea de tener una visión amplia de los fenómenos biológicos que se suceden en el EC y en la recurrencia post-quirúrgica, en particular.

Los resultados más relevantes obtenidos de este estudio son:

- La EC tiene un perfil de expresión génica diferente a los controles, del que destaca un descenso de funciones claves de desintoxicación celular, fortalecimiento de las uniones paracelulares, metabolismo energético, así como en funciones reguladoras de la inmunidad innata. Por otra parte, la EC presenta una respuesta inflamatoria excesiva, así como una elevada actividad reparativa a nivel de la matriz extracelular.
- En este estudio, el patrón de la enfermedad, la indicación quirúrgica, la presencia de enfermedad perianal asociada o el tratamiento al momento de la cirugía no parecen influir en el perfil de expresión de los pacientes con EC.
- La inflamación intensa puede ocultar vías alteradas ocasionando “ruido de fondo”. Cabe puntualizar que el análisis de la parte no inflamada del tejido intestinal es una estrategia utilizada con relativa frecuencia, donde se ha demostrado la importancia que aporta este tejido dado que refleja la fisiopatología de la enfermedad de forma más precisa, ya que estas áreas pueden presentar cambios moleculares y patogénicos muy tempranos sin una excesiva influencia de la inflamación (106,252).
- Existe un subgrupo de pacientes con EC, sin recurrencia postquirúrgica precoz, que en este estudio se ha definido como pacientes “problema” y que tiene un perfil de expresión diferencial tanto en relación a los controles como a la mayoría de pacientes. Este hallazgo sugiere la existencia de fenotipos moleculares de la enfermedad, no obstante esto deberá ser

contrastado en otros estudios con cohortes más amplias para relacionarlo con la clínica, la genética y la microbiota intestinal.

- La única característica histológica diferencial en las piezas quirúrgicas de aquellos pacientes que evolutivamente presentarán recurrencia post-quirúrgica precoz es la mayor presencia de adhesión a estructuras vecinas. En este estudio, el hecho de dejar márgenes con inflamación microscópica en la anastomosis ileo-cólica no se ha asociado a una mayor incidencia de recurrencia post-quirúrgica.
- El estudio genómico revela que la recurrencia se asocia a autofagia y apoptosis deficitarias (autofagia: IRF1, IRGM; apoptosis: TNFSFR6/RTEL1, TNFS11).
- De forma preliminar, el estudio transcriptómico muestra que los pacientes que no presentarán recurrencia post-quirúrgica precoz tienen actividades reparativas e inmunológicas en el momento de la cirugía más evidentes que los pacientes que sí que la presentarán. En todo el grupo de pacientes, con y sin recurrencia, aparecen actividades de recuperación de la homeostasis celular, aunque implicando distintos mecanismos.
- Los pacientes con recurrencia post-quirúrgica precoz presentan cambios singulares a nivel del ciclo celular, principalmente en lo que respecta a la remodelación, polarización o transformación celular, así como una elevada actividad de la matriz extracelular, vinculada principalmente a la reparación del tejido intestinal.

Después de esta descripción general de los hallazgos del estudio transcriptómico, histológico y genómico, se optó por estudiar a profundidad dos hallazgos relevantes: el gen con mayor diferencia en la comparación entre pacientes y controles, TMIGD1 y la vía del destino celular *Notch* y su relación en la recurrencia post-quirúrgica precoz.

El **TMIGD1** (*transmembrane and immunoglobulin domain containing 1*) es un gen del que poco se sabe, probablemente porque su representación en el *microarray* de cDNA es reciente (269). Tan solo existen dos referencias bibliográficas que lo mencionan (269,270). La referencia más antigua data del 2011 (269) y se describe este gen en el estudio del transcriptoma de lesiones pre-cancerígenas, en la secuencia de la formación del cáncer colorrectal a partir de lesiones polipoideas y de la relación inversa entre el grado de lesión y la producción tanto de mRNA como de proteína de TMIGD1. En ese estudio, se demuestra que TMIGD1 en la mucosa cólica normal se encuentra confinada a las criptas de las células o las vellosidades del intestino delgado (donde están las células diferenciadas). Los resultados se comparan frente a líneas celulares de cáncer colorrectal (SW480 y Caco 2), deduciendo que TMIGD1 es una proteína glicosilada y no secretada, con un peso molecular de 38 kDa (diferente a las isoformas recogidas hasta el momento en el Uniprot y que son de 29 y 24 kDa), sin especular el por qué de este hallazgo. Con todo ello, se concluye que la expresión de TMIGD1 podría ser considerada un marcador de diferenciación celular, cuya expresión se pierde durante la transformación celular. El análisis *in silico* realizado en ese estudio indica que el TMIGD1 podría jugar un papel

importante en la adhesión celular, dado que contiene un dominio similar a las inmunoglobulinas que es común a las moléculas de adhesión de la familia Ig-CAM (*cell adhesion molecules*). De todas formas, no se consigue explicar si su infra-expresión es el promotor de la progresión de la carcinogénesis en el epitelio intestinal.

El segundo y último estudio que hace referencia a TMIGD1 investiga el transcriptoma del pseudomixoma peritoneal, siendo uno de los genes candidatos relacionados con este raro tumor de células caliciformes (270). En este estudio TMIGD1 se encuentra infra-expresado (FC -6,62), sin conseguirse realizar la tinción mediante técnicas de inmunohistoquímica dado el bajo nivel de expresión, pero también por la “contaminación” de la señal de las células caliciformes. Comparándolo con otras líneas de cáncer colorrectal (como la HT-29), se observa que en el adenocarcinoma colorrectal la expresión de TMIGD1 se encuentra aún más disminuida que en el pseudomixoma peritoneal (FC de -50 hasta -100).

Al igual que esas dos investigaciones previas, en el presente estudio la expresión de TMIGD1 está disminuida en comparación a controles. No obstante, si en los estudios anteriores su disminución está relacionada a mayor transformación neoplásica, en este estudio se vincula con una mayor inflamación (Figura 27). Esta sería la primera ocasión en que la infra-expresión de TMIGD1 se relaciona con la intensidad de la inflamación, constituyendo un fenómeno potencialmente relevante para la diferenciación de líneas celulares a nivel intestinal. Esta observación es similar a la obtenida en las

investigaciones previas sobre TMIGD1, siendo la primera ocasión que se lo vincula con la EC.

La localización de TMIGD1 en todos los estudios, incluso el presente, es predominantemente en los *microvilli* de las células epiteliales polarizadas y bien diferenciadas como lo demuestra el hecho que su localización sea escasa o nula en las criptas de las glándulas del íleon, a diferencia de la señal obtenida en las células de las columnas vellositarias. A pesar de ello, en ocasiones y sin seguir un patrón claro, TMIGD1 también se ha detectado a nivel citoplasmático. En el presente estudio TMIGD1 no muestra diferencia de sus niveles entre pacientes con EC y controles, concuerda con la isoforma 2 de 24 kDa y no está glicosilada. Estos hallazgos no coinciden ni con el hecho de estar glicosilada ni con el peso molecular de 38 kDa del estudio de Cattaneo y colaboradores (269). A pesar de ello existen diferencias claves entre los dos estudios para explicar estas circunstancias y van desde diferencias patológicas hasta en su localización, tal como se señala en los distintos apartados de esta discusión.

Sorprendentemente, en este estudio no se hallaron diferencias en los niveles proteínicos de TMIGD1 entre la homeostasis y la inflamación, lo que podría sugerir que TMIGD1 no se traduce a proteína durante la inflamación, sino más bien estabiliza sus niveles cambiando probablemente de localización en la célula. Sin embargo, los niveles de TMIGD1 están claramente disminuidos en la mucosa de los pacientes que presentarán evolutivamente recurrencia de forma precoz, lo que sugiere una incapacidad añadida de producir TMIGD1. Otro hallazgo relevante de este trabajo es la correlación entre

transcriptos de TMIGD1 (mRNA) y su traducción en proteína. Tanto en controles como en pacientes que en un futuro presentarán recurrencia, los perfiles de expresión genética y proteínica son coincidentes, lo que indica que la producción efectora de TMIGD1 responde a una activación de su mRNA. En contrapartida, los pacientes que no presentarán recurrencia precoz no tienen una correcta correlación: la proteína es mayor que en los controles mientras que el mRNA es notoriamente menor. Esto podría implicar la presencia de un mecanismo post-transcripcional de regulación en estos pacientes.

A pesar de que el conocimiento de TMIGD1 es escaso, su función se podría inferir del análisis de otras proteínas similares y de la misma familia. La más conocida es TMIGD2 (*transmembrane and immunoglobulin domain containing 2*; también descrita como IGPR-1: *proline-rich receptor-1* o CD28H: *CD 28 homolog*), que está ampliamente expresada, en especial por células epiteliales de casi todos los órganos, células T y endotelio. Es un receptor de adhesión celular que regula la morfología celular, modula la formación de fibras de actina (resultado del estrés celular) y la adhesión focal, reduciendo la migración celular. También es relevante para la interacción célula-célula y la angiogénesis. Co-estimula las células T en el contexto de la activación mediada por los receptores, facilitando la proliferación de células T y la producción de citoquinas a través de una cascada dependiente de la protein-quinasa B (PKB) (271,272). TMIGD2 tiene dos isoformas: una de 30,675 kDa y otra de 30,319 kDa (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q96BF3>), aunque parece ser que presenta una alta glicosilación *in vivo* por lo que su peso molecular

en los estudios experimentales es de 55 kDa (271). TMIGD2 es común en todas las células T *naïve* pero se pierde conforme las células maduran a células de memoria. Una postulación de este evento es que la desaparición gradual de TMIGD2 en células de memoria, frente a estímulos antigénicos, facilita un mecanismo de protección para controlar la respuesta de células T y evitar la respuesta excesiva que podría derivar en enfermedades autoinmunes o infecciones crónicas (272). Se conoce la existencia de TMIGD3 (*transmembrane and immunoglobulin domain containing 3*) aunque esta proteína no se ha estudiado en ningún escenario. De ella se describen dos isoformas: una de 30,327 kDa y otra de 38,976 kDa (<http://www.uniprot.org/uniprot/PODMS9>). En general, las proteínas de transmembrana, como TLRs o receptores de TNF tienen un papel fundamental en diversos procesos biológicos: morfogénesis, diferenciación celular, angiogénesis, apoptosis y modulación de la respuesta inmune (273).

Es relevante comentar el hallazgo de que, en este estudio, TMIGD1 no se encuentra glicosilada. La glicosilación (o glucosilación) proteica es un proceso de adición de carbohidratos a una proteína y parte de un grupo de eventos de modulación proteica post-transcripcional relacionados con varias funciones celulares (274). Habitualmente las proteínas que reciben una cadena de glúcidos lo hacen para ser secretadas o formar parte de la superficie celular (como podría ser el caso de las proteínas de transmembrana). Estos carbohidratos juegan un papel en el plegamiento de proteínas en el retículo endoplasmático rugoso, en el destino de la proteína en los compartimentos intracelulares y en las interacciones célula-célula y

en el anclaje de glicoproteínas que controlan el contacto con microorganismos en los epitelios. Es más probable que TMIGD1 no se encuentre glicosilada en estado basal en las células que conforman el intestino delgado, antes de considerar que lo que sufre es una desglicosilación (pérdida del carbohidrato añadido), ya que se halla en este estado en todos los sujetos estudiados: controles, pacientes, tejido no inflamado y tejido inflamado. Debe tenerse en cuenta que la única publicación que concluye que TMIGD1 está glicosilada (269), lo hace estudiando su expresión en colon y no en íleon. Es un hecho demostrado que la expresión genética y proteica, así como estructural es muy distinta en estos dos órganos, por lo que la conclusión de este estudio no rebate el hallazgo del estudio de Cattaneo y colaboradores, sino que lo complementa.

Con el conjunto de estas evidencias (añadiendo los hallazgos del análisis global del perfil de expresión de los pacientes con EC) se podría especular que la función de TMIGD1 podría estar relacionada también con la estabilización de los contactos célula-célula para formar *tight junctions* en las células epiteliales y que en los pacientes con EC parece estar disminuida notoriamente. También es posible que la función de TMIGD1 sea distinta cuando está confinada a los *microvilli*; en ese caso podría formar parte de receptores celulares o bien, serviría para fijar sustancias antimicrobianas exocelulares como MUC1 que, precisamente, se sitúa en la superficie apical de las células epiteliales. Por otra parte, cuando se encuentra disperso en el citoplasma (hecho que se ha demostrado en los pacientes con EC de este trabajo), podría desempeñar una función de reorganización del citoesqueleto, como se ha insinuado para TMIGD2, o quizá sea

únicamente consecuencia de la disrupción del epitelio intestinal, propia de la inflamación.

El estudio transcriptómico de los pacientes que presentarán evolutivamente recurrencia post-quirúrgica precoz pone en manifiesto la presencia de cambios singulares relacionados a la remodelación, polarización o transformación celular, así como una elevada actividad de la matriz extracelular (vinculada principalmente a la reparación del tejido intestinal). Estos cambios podrían estar asociados con una inadecuada expresión de TMIGD1.

TMIGD1 podría estar relacionado con el contacto célula-célula para intercambios de información, de función y de señales colaborativas. Uno de los mecanismos más importantes de esta interacción lo marcan las vías del destino celular, en particular la vía *Notch*, ya que su función se fundamenta en la inhibición lateral, fenómeno evolutivo conservado en los mamíferos y que se caracteriza por la influencia que una célula puede ejercer en otra adyacente para decidir su destino y hacer que ésta se diferencie en distintos tipos celulares, según las necesidades del tejido o la características del medio, manteniendo así el equilibrio entre la proliferación y la diferenciación (275). En el presente estudio, los pacientes que presentarán recurrencia post-quirúrgica precoz tienen un bloqueo en la expresión de TMIGD1 y en sus niveles proteínicos, lo que indica un descenso en la diferenciación celular. Por otra parte, si se considera que una de las principales vías de gobierno de este proceso celular es la vía de señalización *Notch*, no es descabellado sugerir la existencia de una interacción entre ambas entidades biológicas, las dos relacionadas

con la recurrencia post-quirúrgica precoz, una a nivel de proteína y la otra a nivel celular. No obstante, estos datos no son concluyentes y serán necesarios estudios adicionales para esclarecer estos aspectos.

La vía de señalización **Notch**, que decide el destino de las células madre y de otras de tipo progenitor junto a la vía Wnt, la BMP, y la vía *Hedgehog*, es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis de las criptas de Lieberkühn a nivel del intestino delgado ya que es responsable del equilibrio entre las estirpes absortivas (enterocito) y las secretoras (células caliciformes, células enteroendócrinas, células penacho - *tuft cells* - o las células de Paneth). La vía *Notch* está influida por factores intrínsecos, que son los factores de transcripción expresados por las células y por factores extrínsecos, que provienen del microambiente local y que incluyen factores de crecimiento, la matriz extracelular (actividad clave que ejerce una profunda influencia en las decisiones del destino celular (276)) y el contacto físico con otras células. Los mamíferos expresan 4 tipos de receptores de *Notch*: NOTCH1 en el epitelio de las criptas de todo el intestino, en algunas células vellosas epiteliales y en el endotelio; NOTCH2 en el epitelio de las criptas del intestino delgado, en las células del músculo liso y en las células presentadoras de antígenos; y NOTCH3-4, que quedan restringidos al endotelio y el mesénquima (277). Por otra parte, también en mamíferos, los ligandos de *Notch* son DLL (*delta-like*) 1, 3 y 4 y *Jagged* 1 y 2. Después de unirse un ligando de *Notch* de una célula al receptor de *Notch* de la célula vecina, el receptor sufre una serie de escisiones proteolíticas liberando al citoplasma celular un fragmento activo: el dominio intracelular del *Notch* (*Notch intracellular domain: NICD*) que entra en

el núcleo celular donde recluta a las proteínas adaptadoras MAML (*master-mind-like proteins*) para iniciar la expresión de genes diana. Es la expresión de estos genes, influidos por varios cofactores, la que determina el destino celular final (275). La vía de señalización Wnt es fundamental para el establecimiento de las células madres en el intestino en desarrollo, así como para el desarrollo de criptas durante el período postnatal. Es una vía que complementa a la vía *Notch* en la diferenciación celular (278). *Notch* dirige hacia la proliferación celular si la señal de Wnt es alta, mientras que si la señal de Wnt es baja, *Notch* dirige el destino hacia la diferenciación enterocitaria (279). La inhibición de *Notch* favorece la expansión de todos los tipos celulares con estirpe secretora (280).

Las mutaciones de los componentes de la vía *Notch* pueden causar una producción insuficiente o inmadura de células de estirpe secretora (281), reduciendo la efectividad de la barrera mucosa (282) (lo que podría influir en la traslocación bacteriana) o aumentando la propia vulnerabilidad a la inflamación (283).

Se han identificado componentes de la vía *Notch* alterados en la enfermedad inflamatoria intestinal. Por ejemplo, se ha demostrado que la expresión anormal de Hes1 (*hairy enhancer of split 1*; gen diana de la vía *Notch*) y la represión de Atoh1 (*transcriptional factor atonal homolog 1*: factor de transcripción responsable del destino secretor) (281), así como la expresión aberrante de NICD (284) se han asociado a la depleción de células caliciformes, típica en la colitis ulcerosa. La inflamación se ha asociado a un aumento de la diferenciación de las células caliciformes en la EC y no en la CU. De todas formas, ambas

entidades que comprenden la EI presentan una disminución marcada de las células caliciformes (285). La noxa inflamatoria activa los procesos de regeneración epitelial, lo que se consigue con la activación de las células madre, la proliferación y la diferenciación celular, intentando de esa forma obtener la curación tisular (286,287). En la EC se da el fracaso persistente del conjunto de estos mecanismos inmunológicos y de reparación tisular. La inflamación conduce a la inhibición de la vía *Notch* y esta provoca dos tipos de reacción según el momento en el que sucede (283): en la etapa precoz alivia la inflamación aguda previniendo la disminución del número de células caliciformes (288), mientras que genera citoquinas anti-inflamatorias entre las que se encuentran esteroides, IL-10, óxido nítrico y TGF- β , con la intención de reparar las lesiones tisulares (289). En etapas tardías del proceso inflamatorio la inhibición de *Notch* exagera la enfermedad al alterar la regeneración epitelial (284). Es característico de este momento evolutivo de la inflamación la secreción IL-6 (fundamentalmente desde miofibroblastos intestinales y células dendríticas) lo que perpetúa la inflamación (a través de la vía de activación STAT3), favoreciendo la proliferación de las criptas mediante la producción de epimorfina (290). Se ha demostrado que la expresión de NOTCH1 está marcadamente disminuida en la capa epitelial del tejido inflamado (en comparación al no inflamado del mismo paciente con EC), lo que demuestra que la inflamación sirve de regulador extrínseco de las vías del destino celular (291). Asimismo, en modelos murinos, se ha demostrado que la inhibición de la vía *Notch* favorece el aumento de células caliciformes (292), siendo responsable de la alteración de la microbiota intestinal asociada al

moco que a largo plazo ocasiona inflamación crónica intestinal (293). Por otra parte, se ha visto que el restablecimiento de la vía *Notch* resulta en un aumento de especies de la familia de *Lactobacilli* (294), grupo que ha demostrado su función en el mantenimiento de la homeostasis intestinal (295).

En este estudio, los pacientes que en un futuro desarrollarán recurrencia post-quirúrgica precoz presentan en el estudio transcriptómico una marcada disminución de MALM2 (Figura 22), lo que sugiere una inhibición de la vía *Notch* que se puede confirmar dado el mayor número de células caliciformes en la zona de transición de las criptas que presentan estos pacientes en comparación con aquellos que no presentarán recurrencia (Figura 39). A nivel proteínico los pacientes que presentarán recurrencia tienen mayor expresión de S100A8 (relacionada por la matriz extracelular y el ciclo celular, fundamental para la respuesta inflamatoria aguda y la autofagia, además de ser parte de la calprotectina), CYCLIND1 (gen diana para la proliferación celular, participa tanto en la vía Wnt como en la *Notch*), NOTCH2 (receptor de *Notch* preferentemente de las células epiteliales intestinales, de las células dendríticas y de los macrófagos), CEACAM5 (molécula de adhesión celular, fundamental para los procesos de señalización intracelular y procesos de remodelación y recuperación de la homeostasis celular) y HNF4G (factor de transcripción expresado fundamentalmente en las células epiteliales diferenciadas). Por otra parte, presentan menor expresión de TGF- β (relacionada con la generación de la matriz extracelular y parte de la vía de señalización Wnt), que actúa como citoquina anti-inflamatoria. El análisis transcriptómico y proteínico señala una

actividad relevante de *Notch* sobre Wnt y BMP en los pacientes que presentarán recurrencia. Esta actividad diferencial de *Notch* se relaciona con la proliferación celular, la matriz extracelular y la adhesión celular probablemente con la intención de conseguir una reparación del tejido que, por un motivo que aún no se conoce, es incapaz de generar un epitelio en buenas condiciones funcionales. Por tanto, parece que la recurrencia post-quirúrgica podría ser la consecuencia la pérdida del equilibrio homeostático entre proliferación y diferenciación en la línea epitelial y subepitelial del intestino.

Otro dato que corrobora estos hallazgos proviene del estudio genómico de este trabajo que sugiere que los pacientes que desarrollarán recurrencia presentan una apoptosis deficitaria (TNF-SFR6/RTEL1, TNFS11). Existen estudios donde se ha constatado que NOTCH1 se encuentra muy disminuido en el tejido intestinal inflamado de los pacientes con EC, se activa gracias al tratamiento anti-TNF α consiguiendo a la vez una potente inducción de la apoptosis (291). Es conocido como los inhibidores del TNF α constituyen uno de los tratamientos eficaces para la prevención de la recurrencia post-quirúrgica (296,297). En este mismo sentido, los pacientes que desarrollarán recurrencia post-quirúrgica precoz también exhiben la presencia de SNP en genes claves de la regulación de la autofagia (IRF1, IRGM). La autofagia interviene en distintos procesos celulares de recuperación de la homeostasis celular, de transformación celular y en la defensa intracelular frente a microorganismos. Estos procesos están íntimamente regulados por mecanismos moleculares entre los que se pueden incluir las vías de

destino celular, entre otras. Pero por otra parte, algunas cepas agresivas de *E. coli* también pueden bloquear la autofagia mediante la modificación de la expresión de miRNA en el tejido intestinal de los pacientes con EC (233). En cualquier caso, las alteraciones genéticas pueden facilitar la infección de las células intestinales, influenciando en su función celular (por ejemplo, en la proliferación y definición de los linajes celulares definitivos) y aumentando el estrés celular, lo que a su vez puede hacer ineficaz otros mecanismos de defensa como la secreción de sustancias antimicrobianas mal formadas (mal plegadas), incapaces de ejercer el control de la microbiota intestinal.

Las células caliciformes, productoras de moco, actúan además como importadores antigénicos, recolectando antígenos luminales y presentándolos a las células dendríticas de la *lamina propia* (298,299). Ya se ha demostrado como los márgenes de resección, así como el tejido inflamado de las piezas quirúrgicas de los pacientes con EC, presentan una mayor concentración de moco. Se ha especulado que el aumento de moco es beneficioso en un epitelio intestinal de estructura conservada, mientras que en los pacientes con EC, ante la pérdida de vellosidades, este aumento de moco puede ser nocivo (300). Es posible que el aumento de las células caliciformes en los pacientes que presentarán recurrencia post-quirúrgica precoz responda a la necesidad del epitelio en reparación para hacer frente a los microorganismos y antígenos luminales, intentando generar una barrera bien cimentada. Es interesante cómo la activación (y no la inhibición) de *Notch* se ha relacionado con la metaplasia de células caliciformes en el epitelio pulmonar (301), lo que sugiere que la señalización de *Notch* es fundamental para la especificación del linaje

pero el resultado final es propio del contexto. El aumento de las células caliciformes es un hallazgo relevante de este estudio dado que es una alteración histológica precoz y presente al momento de la cirugía de los pacientes con EC que posteriormente tendrán recurrencia. Este hecho podría servir de marcador de riesgo de recurrencia post-quirúrgica (con lo que ello supone de cara a personalizar el tratamiento preventivo posterior), actuando como biomarcador tisular. A pesar de la relevancia de este hallazgo, no se ha podido demostrar que en biopsias de seguimiento posteriores, el aumento o la disminución del número de las células caliciformes se relacione con la presencia de recurrencia endoscópica o con su resolución, respectivamente. Esto probablemente se deba a un problema del tamaño de la muestra, por lo que debería corroborarse en cohortes mayores.

De las vías del destino celular en la EC se ha estudiado la vía Wnt (específicamente una variante de uno de sus co-receptores: LRP6), asociando una mutación funcional de esta vía con en la EC de debut a edades muy tempranas (302), concluyendo en la relevancia del estudio de las vías del destino celular, que aglutinan no solo los procesos inflamatorios *per se* sino también los de reparación. Así mismo se ha demostrado que el NOTCH1 podría ser el vínculo entre la inmunidad innata y la adaptativa a nivel intestinal (303). Todo esto hace que el estudio de las vías del destino celular supongan un abordaje interesante, diferente y poco explorado dentro de la patogenia de la EC. Además, las vías de destino de las células del epitelio intestinal necesitan estar coordinadas con la actividad de la matriz extracelular en la lámina basal; así, las células del epitelio

pueden desplazarse a través del eje cripta-columna vellositaria sobre la lámina basal totalmente recuperada. Parece plausible pensar que el acúmulo de células caliciformes en las zonas de transición en las criptas de los pacientes que desarrollarán recurrencia podría ser debido a cambios en la movilidad de las células epiteliales. No obstante, no se puede descartar la influencia de la microbiota intestinal en la selección del fenotipo celular definitivo a través de la vía *Notch* y en la modulación de la actividad de la matriz extracelular.

El hecho de vincular la genética a los fenotipos de una determinada enfermedad y ver su efecto en tipos celulares relevantes con una función conocida para esa enfermedad es un método adecuado para intentar homogenizar la caracterización de los subfenotipos de EC, que en este trabajo se ha conseguido demostrar. El estudio basado en subtipos celulares específicos consiguen vincular tanto la influencia de factores genéticos como del medio ambiente, de forma más informativa y clínicamente relevante (252). El estudio transcriptómico puede ayudar a avanzar en la medicina personalizada en la EC, y particularmente en el conocimiento del fenómeno de recurrencia post-quirúrgica. El mayor conocimiento de las causas de la heterogeneidad clínica observada en enfermedades como la EC debería permitir un manejo clínico más adecuado y personalizado y, potencialmente, el desarrollo de nuevas terapias basadas en el hallazgo de nuevas dianas.

Como queda reflejado en este trabajo, se está viviendo una época en la que el conocimiento proviene no solo de la profundización que un enfoque “ómico” particular puede aportar de una patología concreta,

sino en la complementación del estudio “ómico” a diversos niveles (integroma) que da una visión tanto profunda como a la vez amplia de una enfermedad. Esto hace que sea el abordaje adecuado para un condición con fisiopatología multifactorial, como la EC. Siendo la recurrencia post-quirúrgica un momento en el que la mayoría de factores implicados han de volver a ponerse en acción para acabar ocasionando la reaparición de lesiones, este es un escenario especialmente atractivo para el estudio a profundidad de las causas de la enfermedad en general y en la aparición del brote inflamatorio en particular.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

1. La definición de tejido sano e inflamado en la muestra quirúrgica se realizó *in situ*, basándose exclusivamente en el aspecto macroscópico de la muestra, no en datos histológicos.
2. Los sujetos control en este estudio son pacientes que han requerido una resección ileocecal por un motivo diferente a la EC. El 80% por un adenocarcinoma de colon derecho. De todas formas, se ha demostrado que el transcriptoma es diferente según se trate de tejido ileal o colónico, incluso distinto según la zona de colon que se estudie (213), lo que hace que el íleon de los sujetos control pueda ser considerado como normal (cosa que además se confirma por histología).
3. Tanto el estudio de TMIGD1 como el de la vía *Notch* se basan en el hallazgo transcriptómico de genes infra-expresados. Aunque se sabe que el estudio de genes infra-expresados limita su utilización como buenos biomarcadores, si éstos participan en una vía de señalización que se aprecia que está notablemente enriquecida, estos genes pueden dirigir la atención hacia mecanismos moleculares alterados en la EC, por lo que constituyen dianas interesantes de estudio (304).
4. A pesar de que en el momento de la resección intestinal, el aumento de las células caliciformes se asocia a la recurrencia post-quirúrgica precoz, en el momento en el que se constata la recurrencia

no se ha visto ninguna diferencia entre las muestras con y sin recurrencia, probablemente por un problema de tamaño muestral, por lo que cabría buscar esta característica en cohortes mayores.

CONCLUSIONES

Las conclusiones del presente trabajo son:

1. A nivel transcriptómico y en comparación a controles, la EC presenta un descenso de funciones claves de desintoxicación celular, en el fortalecimiento de las uniones para-celulares, en el metabolismo energético, así como en funciones reguladoras de la inmunidad innata. Denota, además, tanto una respuesta inflamatoria excesiva como una elevada actividad reparativa a nivel de la matriz extracelular.
2. En este estudio, el patrón de la enfermedad, la indicación quirúrgica, la presencia de enfermedad perianal asociada o el tratamiento al momento de la cirugía no parecen influir en el perfil de expresión de los pacientes con EC.
3. La inflamación intensa puede ocultar vías alteradas ocasionando “ruido de fondo”.
4. Existe un subgrupo de pacientes con EC, sin recurrencia post-quirúrgica precoz, que en este estudio se ha definido como pacientes “problema” y que tiene un perfil de expresión diferencial tanto a controles como al resto de pacientes.
5. La única característica histológica diferencial en las piezas quirúrgicas de aquellos pacientes que evolutivamente presentarían

recurrencia post-quirúrgica precoz es la mayor presencia de adhesión a estructuras vecinas.

6. El estudio genómico revela que la recurrencia puede verse favorecida por alteraciones en la autofagia y en la apoptosis.

7. A nivel transcriptómico los pacientes con recurrencia presentan cambios singulares a nivel del ciclo celular, principalmente por lo que respecta a la remodelación, polarización o transformación celular, así como una elevada actividad de la matriz extracelular, vinculada principalmente a la reparación del tejido intestinal.

8. La expresión de TMIGD1 está disminuida en los pacientes con EC.

9. TMIGD1 se encuentra en los *microvilli* de las células epiteliales polarizadas y bien diferenciadas. Es una proteína que pesa 24 kDa y no está glicosilada.

10. Es posible que los pacientes que no desarrollan recurrencia precoz presenten un mecanismo de regulación post-transcripcional de TMIGD1.

11. Es posible que TMIGD1 esté relacionado con estabilización de los contactos célula-célula en el epitelio y puede formar parte de receptores de reconocimiento o de estructuras para anclar sustancias anti-microbianas.

12. Los pacientes que desarrollarán recurrencia post-quirúrgica precoz presentan una inhibición de la vía *Notch* al momento de la resección intestinal.

13. Además de la vía *Notch* que controla el equilibrio de algunos linajes de células epiteliales, existen otras actividades biológicas relacionadas con la recuperación de la homeostasis intestinal como la proliferación y polarización celular, la matriz extracelular y la adhesión celular, probablemente con la intención de conseguir una reparación del tejido que, por un motivo que aún no se conoce, es ineficaz, consiguiendo un epitelio “mal generado”.

14. El aumento de células caliciformes en el tejido ileal de la pieza de resección de los pacientes que presentarán recurrencia post-quirúrgica podría constituir un biomarcador tisular de recurrencia en el momento de la intervención quirúrgica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lennard-Jones JE. Classification of Inflammatory Bowel Disease. *Scand J Gastroenterol*. 1989;24(suppl 170):2–6.
2. Sands BE. From symptom to diagnosis: clinical distinctions among various forms of intestinal inflammation. *Gastroenterology*. 2004;126(6):1518–32.
3. Nikolaus S, Schreiber S. Diagnostics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2007;133(5):1670–89.
4. Loftus E V. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*. 2004;126(6):1504–17.
5. Romberg-Camps MJL, Dagnelie PC, Kester a DM, Hesselink-van de Kruijs M a M, Cilissen M, Engels LGJB, *et al*. Influence of phenotype at diagnosis and of other potential prognostic factors on the course of inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 2009;104(2):371–83.
6. Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear N, Price a, Carpenter L, *et al*. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut*. 1996;39(5):690–7.
7. Russel MG, Dorant E, Volovics A, Brummer RJ, Pop P, Muris JW, *et al*. High incidence of inflammatory bowel disease in The Netherlands: results of a prospective study. The South Limburg IBD Study Group. *Dis Colon Rectum*. 1998;41:33–40.
8. Martín-de-Carpi J, Rodríguez A, Ramos E, Jiménez S, Martínez-Gómez MJ, Enrique Medina. Increasing incidence of pediatric inflammatory bowel disease in Spain (1996-2009): The SPIRIT registry. *Inflamm Bowel Dis*. 2013;19:73–80.
9. Duricova D, Pedersen N, Elkjaer M, Gamborg M, Munkholm P, Jess T. Overall and cause-specific mortality in Crohn's disease: A meta-analysis of population-based studies. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2010;16(2):347-53.

10. Van Assche G, Dignass A, Panes J, Beaugerie L, Karagiannis J, Allez M, *et al.* The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis.* 2010;4(1):7–27.
11. D'Inca R, Dal Pont E, Di Leo V, Ferronato A, Fries W, Vettorato MG, *et al.* Calprotectin and lactoferrin in the assessment of intestinal inflammation and organic disease. *Int J Colorectal Dis.* 2007;22(4):429–37.
12. Morson B. Histopathology of Crohn's Disease. *Scand J Gastroenterol.* 1971;6:573–5.
13. Farmer R, Hawk W, Turnbull R. Clinical patterns in Crohn's disease: a statistical study of 615 cases. *Gastroenterology.* 1975;68:627635.
14. Greenstein AJ, Lachman P, Sachar DBD, Springhorn J, Heimann T, Janowitz HD, *et al.* Perforating and non-perforating indications for repeated operations in Crohn's disease : evidence for two clinical forms. *Gut.* 1988;29:588–92.
15. Gasche C, Scholmerich J, Brynskov J, D'Haens G, Hanauer SB, Irvine EJ, *et al.* A Simple Classification of Crohn's Disease : Report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm Bowel Dis.* 2000;6(1):8–15.
16. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott ID, Bernstein CN, Brant SR, *et al.* Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol.* 2005;19 Suppl A:5–36.
17. Tarrant K, Barclay M, Frampton C, Geary R. Perianal disease predicts changes in Crohn's disease phenotype-results of a population-based study of inflammatory bowel disease phenotype. *Am J Gastroenterol.* 2008;103(12):3082–93.
18. Jess T, Riis L, Vind I, Winther KV, Borg S, Binder V, *et al.* Changes in clinical characteristics, course, and prognosis of inflammatory bowel disease during the last 5 decades: a population-based study from Copenhagen, Denmark. *Inflamm Bowel Dis.* 2007;13(4):481–9.
19. Ramadas A V, Gunesh S, Thomas G a O, GT W, Hawthorne AB, Williams GT. Natural history of Crohn's disease in a population-based

- cohort from Cardiff (1986-2003): a study of changes in medical treatment and surgical resection rates. *Gut*. 2010;59(9):1200–6.
20. Lakatos PL, Golovics PA, David G, Pandur T, Erdelyi Z, Horvath A, *et al*. Has there been a change in the natural history of Crohn's disease? Surgical rates and medical management in a population-based inception cohort from Western Hungary between 1977-2009. *Am J Gastroenterol*. 2012;107(4):579–88.
 21. Nuij VJ a a, Zelinkova Z, Rijk MCM, Beukers R, Ouwendijk RJT, Quispel R, *et al*. Phenotype of inflammatory bowel disease at diagnosis in the Netherlands: a population-based inception cohort study (the Delta Cohort). *Inflamm Bowel Dis*. 2013;19(10):2215–22.
 22. Henriksen M, Jahnsen J, Lygren I, Aadland E, Schulz T, Vatn MH, *et al*. Clinical course in Crohn's disease: results of a five-year population-based follow-up study (the IBSEN study). *Scand J Gastroenterol*. 2007 May;42(5):602–10.
 23. Lakatos G, Sipos F, Miheller P, Hritz I, Varga MZ, Juhász M, *et al*. The behavior of matrix metalloproteinase-9 in lymphocytic colitis, collagenous colitis and ulcerative colitis. *Pathol Oncol Res*. 2012;18(1):85–91.
 24. Zabana Y, Garcia-Planella E, Van Domselaar M, Mañosa M, Gordillo J, López San Román A, *et al*. Does active smoking really influence the course of Crohn's disease? A retrospective observational study. *J Crohns Colitis*. 2013;7(4):280–5.
 25. Thia K, Sandborn WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Loftus E V. Risk factors associated with Progression to intestinal complications of Crohn's Disease in a Population-Based Cohort. *Gastroenterology*. 2011;139(4):1147–55.
 26. Levine A, Griffiths A, Markowitz J, Wilson DC, Turner D, Russell RK, *et al*. Pediatric modification of the Montreal classification for inflammatory bowel disease: the Paris classification. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17(6):1314–21.
 27. Silverstein MD, Loftus E V., Sandborn WJ, Tremaine WJ, Feagan BG, Nietert PJ, *et al*. Clinical course and costs of care for Crohn's disease: Markov model analysis of a population-based cohort. *Gastroenterology*. 1999;117(1):49–57.

28. Lapidus A, Bernell O, Hellers G, Löfberg R. Clinical Course of Colorectal Crohn's Disease: A 35-Year Follow-up Study of 507 Patients. *Gastroenterology*. 1998;114(6):1151–60.
29. Munkholm P, Langholz E, Davidsen M, Binder V. Disease Activity Courses in a Regional Cohort of Crohn's Disease Patients. *Scand J Gastroenterol*. 1995;(2):699–706.
30. Veloso FT, Ferreira JT, Barros L, Almeida S. Clinical Outcome of Crohn's Disease: Analysis According to the Vienna Classification and Clinical Activity. *Inflamm Bowel Dis*. 2001;7(4):306–13.
31. Beaugerie L, Seksik P, Nion-Larmurier I, Gendre J-P, Cosnes J. Predictors of Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2006;130(3):650–6.
32. Allez M, Lemann M, Bonnet J, Cattan P, Jian R, Modigliani R. Long Term Outcome of Patients With Active Crohn's Disease Exhibiting Extensive and Deep Ulcerations at Colonoscopy. *Am J Gastroenterol*. 2002;97(4):947–53.
33. Loly C, Belaiche J, Louis E. Predictors of severe Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol*. 2008;43(8):948–54.
34. Lichtenstein GR, Olson A, Travers S, Diamond RH, Chen DM, Pritchard ML, *et al*. Factors associated with the development of intestinal strictures or obstructions in patients with Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*. 2006;101(5):1030–8.
35. Louis E, Michel V, Hugot JP, Reenaers C, Fontaine F, Delforge M, *et al*. Early development of stricturing or penetrating pattern in Crohn's disease is influenced by disease location, number of flares, and smoking but not by NOD2/CARD15 genotype. *Gut*. 2003;52(4):552–7.
36. Rieder F, Schleder S, Wolf A, Dirmeier A, Strauch U, Obermeier F, *et al*. Serum anti-glycan antibodies predict complicated Crohn's disease behavior: a cohort study. *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16(8):1367–75.
37. Lakatos P-L. Perianal disease, small bowel disease, smoking, prior steroid or early azathioprine/biological therapy are predictors of disease behavior change in patients with Crohn's disease. *World J Gastroenterol*. 2009;15(28):3504.

38. Cosnes J, Carbonnel F, Carrat F, Beaugerie L, Cattan S, Gendre J-P. Effects of current and former cigarette smoking on the clinical course of Crohn ' s disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 1999;13(11):1403–11.
39. Mazor Y, Maza I, Kaufman E, Ben-Horin S, Karban A, Chowers Y, *et al.* Prediction of disease complication occurrence in Crohn's disease using phenotype and genotype parameters at diagnosis. *J Crohns Colitis.* 2011;5(6):592–7.
40. Cosnes J, Cattan S, Blain A, Beaugerie L, Carbonnel F, Parc R, *et al.* Long-Term Evolution of Disease Behavior of Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2002;8(4):244–50.
41. Zabana Y, Garcia-Planella E, van Domselaar M, Mañosa M, Gordillo J, López-Sanromán A, *et al.* Predictors of favourable outcome in inflammatory Crohn's disease. A retrospective observational study. *Gastroenterol Hepatol.* 2013;36(10):616–23.
42. Peyrin-Biroulet L, Bigard M-A, Malesci A, Danese S. Step-up and top-down approaches to the treatment of Crohn's disease : early may already be too late. *Gastroenterology.* 2008;135(4):1420–2.
43. Peyrin-Biroulet L, Loftus E V, Colombel J-F, Sandborn WJ. Early Crohn disease: a proposed definition for use in disease-modification trials. *Gut.* 2010;59(2):141–7.
44. Loftus E V, Schoenfeld P, Sandborn WJ. The epidemiology and natural history of Crohn's disease in population-based patient cohorts from North America : a systematic review. *Aliment Pharmacol Ther.* 2002;16(1):51–60.
45. Vermeire S, van Assche G, Rutgeerts P. Review article: Altering the natural history of Crohn's disease--evidence for and against current therapies. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007;25(1):3–12.
46. Dignass a, Van Assche G, Lindsay JO, Lémann M, Söderholm J, Colombel JF, *et al.* The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Current management. *J Crohns Colitis.* 2010;4(1):28–62.
47. Association AG. American Gastroenterological Association Institute Technical Review on Corticosteroids, Immunomodulators, and Infliximab in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology.* 2006;130(3):940–87.

48. Büning C, Lochs H. Conventional therapy for Crohn ' s disease. *World J Gastroenterol.* 2006;12(30):4794–806.
49. D'Haens G, Baert F, van Assche G, Caenepeel P, Vergauwe P, Tuynman H, *et al.* Early combined immunosuppression or conventional management in patients with newly diagnosed Crohn's disease: an open randomised trial. *Lancet.* 2008;371(9613):660–7.
50. Alós R. Timing of surgery in Crohn's disease: A key issue in the management. *World J Gastroenterol.* 2008;14(36):5532.
51. Aratari A, Papi C, Leandro G, Viscido A, Capurso L, Caprilli R. Early versus late surgery for ileo-caecal Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007;26(10):1303–12.
52. Nordgren S, Fasth S, Öresland T, Hultén L. Long-Term Follow-up in Crohn ' s Disease. Mortality, morbidity, and functional status. *Scan.* 1994;29(2):1122–8.
53. Fichera A, Michelassi F. Surgical Treatment of Crohn's Disease. *J Gastrointest Surg.* 2007;11(January):791–803.
54. Hwang JM, Varma MG. Surgery for inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2008;14(17):2678–90.
55. Romeo E, Jasonni V, Caldaro T, Barabino A, Mattioli G, Vignola S, *et al.* Strictureplasty and intestinal resection : different options in complicated pediatric-onset Crohn's disease. *J Pediatr Surg.* 2012;47(5):944–8.
56. Reese GE, Purkayastha S, Tilney HS, von Roon A, Yamamoto T, Tekkis PP. Strictureplasty vs resection in small bowel Crohn's disease : an evaluation of short-term outcomes and recurrence. *Colorectal Dis.* 2006;9(8):686–94.
57. Lee ECG, Papaioannou N. Minimal surgery for chronic obstruction in patients with extensive or universal Crohn ' s disease. *Ann R Coll Surg Engl.* 1982;64(4):229–33.
58. Ambe R, Campbell L, Cagir B. A Comprehensive Review of Strictureplasty Techniques in Crohn's Disease : Types , Indications , Comparisons , and Safety. *J Gastrointest Surg.* 2012;16(1):209–17.

59. Kessler H, Mudter J, Hohenberger W. Recent results of laparoscopic surgery in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2011;17(9):1116–25.
60. Tilney HS, Constantinides VA, Heriot AG, Nicolaou M, Athanasiou T, Ziprin P, *et al.* Comparison of laparoscopic and open ileocecal resection for Crohn's disease: a metaanalysis. *Surg Endosc.* 2006;20(7):1036–44.
61. Tan JY, Tjandra JJ. Laparoscopic surgery for Crohn's disease: A meta-analysis. *Dis Colon Rectum.* 2007;50(5):576–85.
62. Group HS. Hand-assisted laparoscopic surgery vs standard laparoscopic surgery for colorectal disease: a prospective randomized trial. *Surg Endosc.* 2000;14(10):896–901.
63. Rutgeerts P, Geboes K, Vantrappen G, Kerremans R. Natural history of recurrent Crohn's disease at the ileocolonic anastomosis after curative surgery. *Gut.* 1984;25(6):665–72.
64. De Dombal FT, Burton I, Goligher JC. Recurrence of Crohn's disease after primary excisional surgery. *Gut.* 1971;12(7):519–27.
65. Rutgeerts P, Geboes K, Vantrappen G, Beyls J, Kerremans R, Hiele M. Predictability of the Postoperative Course of Crohn's Disease. *Gastroenterology.* 1990;99(4):956–63.
66. Arnott I, Watts D, Ghosh S. Review article : is clinical remission the optimum therapeutic goal in the treatment of Crohn's disease ? *Aliment Pharmacol Ther.* 2002;16(5):857–67.
67. Barber KW, Waugh JM, Beahrs OH, Sauer WG. Indications for and the Results of the Surgical Treatment of Regional Enteritis. *Ann Surg.* 1962;156(3):472–80.
68. Pallotta N, Giovannone M, Pezzotti P, Gigliozzi A, Barberani F, Piacentino D, *et al.* Ultrasonographic detection and assessment of the severity of Crohn's disease recurrence after ileal resection. *BMC Gastroenterol.* 2010;10:69.
69. Koilakou S, Sailer J, Peloschek P, Ferlitsch A, Vogelsang H, Miehsler W, *et al.* Endoscopy and MR enteroclysis: equivalent tools in predicting clinical recurrence in patients with Crohn's disease after ileocolic resection. *Inflamm Bowel Dis.* 2010;16(2):198–203.

70. Rispo A, Bucci L, Pesce G, Sabbatini F, de Palma GD, Grassia R, *et al.* Bowel sonography for the diagnosis and grading of postsurgical recurrence of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2006;12(6):486–90.
71. Low RN, Francis IR, Politoske D, Bennett M. Crohn's disease evaluation: comparison of contrast-enhanced MR imaging and single-phase helical CT scanning. *J Magn Reson Imaging.* 2000;11(2):127–35.
72. Chardavoigne R, Flint G, Pollack S, Wise L. Factors affecting recurrence following resection for Crohn's disease. *Dis Colon Rectum.* 1986;29(8):495–502.
73. Ahmed T, Rieder F, Fiocchi C, Achkar J-P. Pathogenesis of postoperative recurrence in Crohn's disease. *Gut.* 2011;60(4):553–62.
74. Haens GD, Rutgeerts P. Postoperative Recurrence of Crohn's Disease: Pathophysiology and Prevention. *Inflamm Bowel Dis.* 1999;5(4):295–303.
75. Haens GRD, Geboes K, Peeters M, Baert F, Penninckx F, Rutgeerts P. Early Lesions of Recurrent Crohn's Disease Caused by Infusion of Intestinal Contents in Excluded Ileum. *Gastroenterology.* 1998;114(2):262–7.
76. Buisson a, Chevaux J-B, Allen PB, Bommelaer G, Peyrin-Biroulet L. Review article: the natural history of postoperative Crohn's disease recurrence. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012;35(6):625–33.
77. De Cruz P, Kamm M a, Prideaux L, Allen PB, Desmond P V, Cruz P De. Postoperative Recurrent Luminal Crohn's Disease: A Systematic Review. *Inflamm Bowel Dis.* 2012;18(4):758–77.
78. Domènech E, Mañosa M, Lobatón T, Cabré E. Optimizing postoperative Crohn's disease treatment. *Ann Gastroenterol.* 2014;27(4):1–7.
79. Cottone M, Rosselli M, Orlando A, Oliva L, Puleo A, Cappello M, *et al.* Smoking habits and recurrence in Crohn's Disease. *Gastroenterology.* 1994;106(3):643–8.

80. Reese GE, Nanidis T, Borysiewicz C, Yamamoto T, Orchard T, Tekkis PP. The effect of smoking after surgery for Crohn's disease: a meta-analysis of observational studies. *Int J Colorectal Dis.* 2008;23(12):1213–21.
81. Ryan WR, Allan RN, Yamamoto T, Keighley MRB. Crohn's disease patients who quit smoking have a reduced risk of reoperation for recurrence. *Am J Surg.* 2004;187(2):219–25.
82. Cosnes J, Beaugerie L, Carbonnel F, Gendre JP. Smoking cessation and the course of Crohn's disease: an intervention study. *Gastroenterology.* 2001;120(5):1093–9.
83. Chamberlin WM, Naser SA. Integrating theories of the etiology of Crohn's Disease On the etiology of Crohn ' s Disease : Questioning the Hypotheses. *Med Sci Monit.* 2006;12(2):27–33.
84. Marks DJB, Segal AW. Innate immunity in inflammatory bowel disease : a disease hypothesis. *J Pathol.* 2008;214(2):260–6.
85. Van Kruiningen HJ. Where are the weapons of mass destruction – the *Mycobacterium paratuberculosis* in Crohn's disease? *J Crohns Colitis.* 2011;5(6):638–44.
86. Maloy KJ, Powrie F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature.* 2011;474(7351):298–306.
87. Achkar J, Hanauer SB. Medical Therapy to Reduce Postoperative Crohn's Disease Recurrence. *Am J Gastroenterol.* 2000;95(5):1139–46.
88. Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med.* 2009;361(21):2066–78.
89. Cheroutre H, Madakamutil L. Acquired and natural memory T cells join forces at the mucosal front line. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(4):290–300.
90. Garrett WS, Gordon JI, Glimcher LH. Homeostasis and inflammation in the intestine. *Cell.* 2010;140(6):859–70.
91. Radtke F, Clevers H. Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science.* 2005;307(5717):1904–9.

92. Gersemann M. Crohn's disease-Defect in innate defence. *World J Gastroenterol*. 2008;14(36):5499.
93. Rakoff-Nahoum S, Bousvaros A. Innate and adaptive immune connections in inflammatory bowel diseases. *Curr Opin Gastroenterol*. 2010;26(6):572–7.
94. Mayne CG, Williams CB. Induced and natural regulatory T cells in the development of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2013;19(8):1772–88.
95. Fritz T, Niederreiter L, Adolph T, Blumberg RS, Kaser A. Crohn's disease: NOD2, autophagy and ER stress converge. *Gut*. 2011;60(11):1580–8.
96. Hansen J, Gulati A, Sartor RB. The role of mucosal immunity and host genetics in defining intestinal commensal bacteria. *Curr Opin Gastroenterol*. 2010;26(6):564–71.
97. Frank DN, St Amand AL, Feldman R a, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* . 2007;104(34):13780–5.
98. Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson D A, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. 2005;307(5717):1915–20.
99. Goodman WA, Pizarro TT. Regulatory cell populations in the intestinal mucosa. *Curr Opin Gastroenterol*. 2013;29(6):614–20.
100. Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2008;134(2):577–94.
101. Bäckhed F. 99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: the normal gut microbiota in health and disease. *Clin Exp Immunol*. 2010;160(1):80–4.
102. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, *et al*. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. 2009;457(7228):480–4.

103. Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, Suda W, Nagano Y, Nishikawa H, *et al.* Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature*. 2013;500(7461):232–6.
104. Llopis M, Antolin M, Carol M, Borrueal N, Casellas F, Martinez C, *et al.* *Lactobacillus casei* downregulates commensals' inflammatory signals in Crohn's disease mucosa. *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15(2):275–83.
105. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG, Gratadoux J-J, *et al.* *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:16731–6.
106. Ng SC, Benjamin JL, McCarthy NE, Hedin CRH, Koutsoumpas A, Plamondon S, *et al.* Relationship between human intestinal dendritic cells, gut microbiota, and disease activity in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17(10):2027–37.
107. Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease : cause and immunobiology. *Lancet*. 2007;369(9573):1627–40.
108. Zorzi F, Monteleone I, Sarra M, Calabrese E, Marafini I, Cretella M, *et al.* Distinct profiles of effector cytokines mark the different phases of Crohn's disease. *PLoS One*. 2013;8(1):e54562.
109. Desreumaux P, Brandt E, Gambiez L, Emille D, Geboes K, Klein O, *et al.* Distinct Cytokine Patterns in Early and Chronic Ileal Lesions of Crohn's Disease. *Gastroenterology*. 1997;113(1):118–26.
110. D'Andrea A, Ma X, Aste-Amezaga M, Paganin C, Trinchieri G. Stimulatory and inhibitory effects of interleukin (IL)-4 and IL-13 on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: priming for IL-12 and tumor necrosis factor alpha production. *J Exp Med*. 1995;181(2):537–46.
111. Dubucquoi S, Janin A, Klein O, Desreumaux P, Quandalle P, Cortot A, *et al.* Activated eosinophils and interleukin 5 expression in early recurrence of Crohn's disease. *Gut*. 1995;37(2):242–6.
112. Onali S, Petruzzello C, Calabrese E, Condino G, Zorzi F, Sica GS, *et al.* Frequency, pattern, and risk factors of postoperative recurrence of Crohn's disease after resection different from ileo-colonic. *J Gastrointest Surg*. 2009;13(2):246–52.

113. Yamamoto T, Umegae S, Kitagawa T, Matsumoto K. Mucosal cytokine production during remission after resection for Crohn's disease and its relationship to future relapse. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004;19(6):671–8.
114. Meresse B, Rutgeerts P, Malchow H, Dubucquoi S, Dessaint J, Cohard M, *et al.* Low ileal interleukin 10 concentrations are predictive of endoscopic recurrence in patients with Crohn's disease. *Gut.* 2002;50(1):25–9.
115. Scarpa M, Bortolami M, Morgan SL, Kotsafti A, Ferraro S, Ruffolo C, *et al.* TGF-beta1 and IGF-1 production and recurrence of Crohn's disease after ileo-colonic resection. *J Surg Res.* 2009;152(1):26–34.
116. Nagel E, Bartels M, Pichlmayr R. Scanning electron-microscopic lesions in Crohn's disease: Relevance for the interpretation of postoperative recurrence. *Gastroenterology.* 1995;108(2):376–82.
117. Ferrante M, de Hertogh G, Hlavaty T, D'Haens G, Penninckx F, D'Hoore A, *et al.* The value of myenteric plexitis to predict early postoperative Crohn's disease recurrence. *Gastroenterology.* 2006;130(6):1595–606.
118. Ng SC, Lied GA, Kamm M a, Sandhu F, Guenther T, Arebi N. Predictive value and clinical significance of myenteric plexitis in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2009;15(10):1499–507.
119. Maunoury V, Mordon S, Geboes K, Klein O, Debaert A, Cortot A, *et al.* Early Vascular Changes in Crohn's Disease: An Endoscopic Fluorescence Study. *Endoscopy.* 2000;32(9):700–5.
120. Rahier J-F, Dubuquoy L, Colombel J-F, Jouret-Mourin A, Delos M, Ferrante M, *et al.* Decreased lymphatic vessel density is associated with postoperative endoscopic recurrence in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2013;19(10):2084–90.
121. Guo R, Zhou Q, Proulx ST, Wood R, Ji R-C, Ritchlin CT, *et al.* Inhibition of lymphangiogenesis and lymphatic drainage via vascular endothelial growth factor receptor 3 blockade increases the severity of inflammation in a mouse model of chronic inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009;60(9):2666–76.
122. Lindberg E, Järnerot G, Huitfeldt B. Smoking in Crohn's disease: effect on localisation and clinical course. *Gut.* 1992;33(6):779–82.

123. D'Argenio V, Precone V, Casaburi G, Miele E, Martinelli M, Staiano A, *et al.* An altered gut microbiome profile in a child affected by Crohn's disease normalized after nutritional therapy. *Am J Gastroenterol.* 2013;108(5):851–2.
124. Kostic AD, Xavier RJ, Gevers D. The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead. *Gastroenterology.* 2014;146(6):1489–99.
125. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen Y-Y, Keilbaugh SA, *et al.* Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. *Science.* 2011;334(6052):105–8.
126. Dominguez-Bello MG, Blaser MJ, Ley RE, Knight R. Development of the human gastrointestinal microbiota and insights from high-throughput sequencing. *Gastroenterology.* 2011;140(6):1713–9.
127. Claesson MJ, Cusack S, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, de Weerd H, Flannery E, *et al.* Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108 Suppl :4586–91.
128. Hunter P. The secret garden's gardeners. Research increasingly appreciates the crucial role of gut viruses for human health and disease. *EMBO Rep.* 2013;14(8):683–5.
129. Ott SJ, Kühbacher T, Musfeldt M, Rosenstiel P, Hellmig S, Rehman A, *et al.* Fungi and inflammatory bowel diseases: Alterations of composition and diversity. *Scand J Gastroenterol.* 2008;43(7):831–41.
130. Hooper L V. Commensal Host-Bacterial Relationships in the Gut. *Science.* 2001;292(5519):1115–8.
131. Clavel T, Haller D. Bacteria- and host-derived mechanisms to control intestinal epithelial cell homeostasis: Implications for chronic inflammation. *Inflammatory Bowel Diseases.* 2007;13(9):1153–64.
132. Spor A, Koren O, Ley R. Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. *Nat Rev Microbiol.* 2011;9(4):279–90.

133. Kraus TA, Toy L, Chan L, Childs J, Mayer L. Failure to induce oral tolerance to a soluble protein in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2004;126(7):1771–8.
134. Swidsinski A, Loening-Baucke V, Herber A. Mucosal flora in Crohn ' s disease and ulcerative colitis - an overview. *J Physiol Pharmacol*. 2009;60(suppl. 6):61–71.
135. Marchesi JR, Holmes E, Khan F, Kochhar S, Scanlan P, Shanahan F, *et al*. Rapid and noninvasive metabonomic characterization of inflammatory bowel disease. *J Proteome Res*. 2007;6(2):546–51.
136. Hecht GA. Inflammatory Bowel Disease — Live Transmission. *N Engl J Med*. 2010;358(5):528–30.
137. Cong Y, Brandwein SL, McCabe RP, Lazenby A, Birkenmeier EH, Sundberg JP, *et al*. CD4+ T cells reactive to enteric bacterial antigens in spontaneously colitic C3H/HeJBir mice: increased T helper cell type 1 response and ability to transfer disease. *J Exp Med*. 1998;187(6):855–64.
138. Eckburg PB, Relman DA. The role of microbes in Crohn's disease. *Clin Infect Dis*. 2007;44(2):256–62.
139. Harper PH, Lee EC, Kettlewell MG, Bennett MK, Jewell DP. Role of the faecal stream in the maintenance of Crohn's colitis. *Gut*. 1985;26(3):279–84.
140. Gionchetti P, Amadini C, Rizzello F, Venturi A, Poggioli G, Campieri M. Probiotics for the treatment of postoperative complications following intestinal surgery. *Bailliere's Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2003;17(5):821–31.
141. D'Haens GR, Vermeire S, Van Assche G, Noman M, Aerden I, Van Olmen G, *et al*. Therapy of metronidazole with azathioprine to prevent postoperative recurrence of Crohn's disease: a controlled randomized trial. *Gastroenterology*. 2008;135(4):1123–9.
142. Macdonald TT, Monteleone G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science*. 2005;307(5717):1920–5.
143. Kucharzik T, Maaser C, Lügering A, Kagnoff M, Mayer L, Targan S, *et al*. Recent understanding of IBD pathogenesis: implications for future therapies. *Inflamm Bowel Dis*. 2006 Nov;12(11):1068–83.

144. Sartor RB. Does *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis cause Crohn's disease? *Gut*.;54(7):896–8.
145. Barnich N, Carvalho FA, Glasser A, Darcha C, Jantscheff P, Allez M, *et al.* CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E. coli*, supporting ileal mucosa colonization in Crohn's disease. *J Clin Invest*. 2007;117(6):1566–74.
146. Caprilli R. Why does Crohn's disease usually occur in terminal ileum? *J Crohns Colitis*. 2008;2(4):352–6.
147. Shih DQ, Targan SR. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2008;14(3):390–400.
148. Stappenbeck TS, Rioux JD, Mizoguchi A, Saitoh T, Huett A, Darfeuille-Michaud A, *et al.* Crohn disease: A current perspective on genetics, autophagy and immunity. *Autophagy*. 2011;7(4):355–74.
149. Issa M, Vijayapal A, Graham MB, Beaulieu DB, Otterson MF, Lundeen S, *et al.* Impact of *Clostridium difficile* on inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007;5(3):345–51.
150. Rabizadeh S, Rhee KJ, Wu S, Huso D, Gan CM, Golub JE, *et al.* Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: A potential instigator of colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13(12):1475–83.
151. Schultsz C, Van den Berg FM, Kate FWT, Tytgat GNJ, Dankert J. The intestinal mucus layer from patients with inflammatory bowel disease harbors high numbers of bacteria compared with controls. *Gastroenterology*. 1999;117(5):1089–97.
152. Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G, Sutren M, Pochart P, Marteau P, *et al.* Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut*. 2003;52(2):237–42.
153. Joossens M, Huys G, Cnockaert M, De Preter V, Verbeke K, Rutgeerts P, *et al.* Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut*. 2011;60(5):631–7.
154. Dey N, Soergel D a W, Repo S, Brenner SE. Association of gut microbiota with post-operative clinical course in Crohn's disease. *BMC Gastroenterol*. 2013;13:131.

155. Juste C, Kreil DP, Beauvallet C, Guillot A, Vaca S, Carapito C, *et al.* Bacterial protein signals are associated with Crohn's disease. *Gut*. 2014;63(10):1566–77.
156. Seksik P, Sokol H, Lepage P, Vasquez N, Manichanh C, Mangin I, *et al.* Review article: the role of bacteria in onset and perpetuation of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006;24 Suppl 3:11–8.
157. De Cruz P, Kang S, Wagner J, Buckley M, Sim WH, Prideaux L, *et al.* Specific Mucosa-Associated Microbiota in Crohn's Disease at the Time of Resection are Associated with Early Disease Recurrence: A Pilot Study. *J Gastroenterol Hepatol*. 2015;30(2):268–78.
158. Rutgeerts P, Goboos K, Peeters M, Hiele M, Penninckx F, Aerts R, *et al.* Effect of faecal stream diversion on recurrence of Crohn's disease in the neoterminal ileum. *Lancet*. 1991;338(8770):771–4.
159. Cameron JL, Hamilton SR, Coleman J, Sitzmann J V, Bayless TM. Patterns of heal Recurrence in Crohn's Disease A Prospective Randomized Study. *Ann Surg*. 1992;5(215):546–51.
160. Rutgeerts P, Hiele M, Geboos K, Peeters M, Penninckx F, Aerts R, *et al.* Controlled trial of metronidazole treatment for prevention of crohn's recurrence after ileal resection. *Gastroenterology*. 1995 108(6):1617–21.
161. Benjamin JL, Hedin CRH, Koutsoumpas A, Ng SC, McCarthy NE, Prescott NJ, *et al.* Smokers with active Crohn's disease have a clinically relevant dysbiosis of the gastrointestinal microbiota. *Inflamm Bowel Dis*. 2012;18(6):1092–100.
162. Muruganathan A, Tozer P, Bernardo D, Hart A, Knight S, Whelan K, *et al.* P463 Clinical risk factors for Crohn's disease postoperative recurrence are reflected in alterations in mucosally adherent microbiota at surgical resection. *J Crohn's Colitis*. 2012 Feb;6(Cdi):S193.
163. Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, Lederman E, Di Martino P, Desreumaux P, *et al.* Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1998;115(6):1405–13.

164. Keighley MR, Arabi Y, Dimock F, Burdon DW, Allan RN, Alexander-Williams J. Influence of inflammatory bowel disease on intestinal microflora. *Gut*. 1978 Dec;19(12):1099–104.
165. Neut C, Bulois P, Desreumaux P, Membré JM, Lederman E, Gambiez L, *et al*. Changes in the bacterial flora of the neoterminal ileum after ileocolonic resection for Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*. 2002;97(4):939–46.
166. Cummings JH, Macfarlane GT. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J Appl Bacteriol*. 1991;70(6):443–59.
167. Nguyen KA, Cao Y, Chen JR, Townsend CM, Ko TC. Dietary fiber enhances a tumor suppressor signaling pathway in the gut. *Ann Surg*. 2006;243(5):619–25; discussion 625–7.
168. Vanhoutvin SALW, Troost FJ, Hamer HM, Lindsey PJ, Koek GH, Jonkers DMAE, *et al*. Butyrate-induced transcriptional changes in human colonic mucosa. *PLoS One*. 2009;4(8):e6759.
169. Rigby RJ, Hunt MR, Scull BP, Simmons JG, Speck KE, Helmrath M A, *et al*. A new animal model of postsurgical bowel inflammation and fibrosis: the effect of commensal microflora. *Gut*. 2009;58(8):1104–12.
170. Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD. Regional ileitis; a pathologic and clinical entity. *Am J Med*. 1952;13(5):583–90.
171. Hugot JP, Zouali H, Lesage S, Thomas G. Etiology of the inflammatory bowel diseases. *Int J Colorectal Dis*. 1999 Mar;14(1):2–9.
172. Hendrickson BA, Gokhale R, Cho JH. Clinical Aspects and Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(1):79–94.
173. Podolsky DK. Inflammatory Bowel Disease. *N Engl J Med*. 2002;347(6):417–29.
174. Mathew CG, Lewis CM. Genetics of inflammatory bowel disease: progress and prospects. *Hum Mol Genet*. 2004;13 Spec No:R161–8.

175. Hugot J, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Ce J, Macrykk J, *et al.* Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001;411(6937):599–603.
176. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, *et al.* A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001;411(6837):603–6.
177. Barreau F, Meinzer U, Chareyre F, Berrebi D, Niwa-Kawakita M, Dussailant M, *et al.* CARD15/NOD2 is required for Peyer's patches homeostasis in mice. *PLoS One*. 2007;2(6):e523.
178. Gutiérrez A, Scharl M, Sempere L, Holler E, Zapater P, Almenta I, *et al.* Genetic susceptibility to increased bacterial translocation influences the response to biological therapy in patients with Crohn's disease. *Gut*. 2014 ;63(2):272–80.
179. Colhoun HM, McKeigue PM, Smith GD. Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. *Lancet*. 2003;361(9360):865–72.
180. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, *et al.* A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*. 2001;409(6822):928–33.
181. Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, Gibbs RA, *et al.* A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*. 2007;449(7164):851–61.
182. Syvänen A-C. Toward genome-wide SNP genotyping. *Nat Genet*. 2005;37 Suppl:S5–10.
183. Yamazaki K, McGovern D, Ragoussis J, Paolucci M, Butler H, Jewell D, *et al.* Single nucleotide polymorphisms in TNFSF15 confer susceptibility to Crohn's disease. *Hum Mol Genet*. 2005;14(22):3499–506.
184. Turner S, Armstrong LL, Bradford Y, Carlson CS, Crawford DC, Crenshaw AT, *et al.* Quality control procedures for genome-wide association studies. *Curr Protoc Hum Genet*. 2011;Chapter 1:Unit1 19.

185. Alonso A, Domènech E, Julià A, Panés J, García-Sánchez V, Mateu P, *et al.* Identification of risk Loci for Crohn's disease phenotypes using a genome-wide association study. *Gastroenterology*. 2015;148(4):794–805.
186. Van Limbergen J, Radford-Smith G, Satsangi J. Advances in IBD genetics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014;11(6):372–85.
187. Zhernakova A, van Diemen CC, Wijmenga C. Detecting shared pathogenesis from the shared genetics of immune-related diseases. *Nat Rev Genet*. 2009;10(1):43–55.
188. Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, Silverberg MS, Goyette P, Huett A, *et al.* Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet*. 2007;39(5):596–604.
189. Singh SB, Davis AS, Taylor GA, Deretic V. Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science*. 2006;313(5792):1438–41.
190. Lapaquette P, Glasser AL, Huett A, Xavier RJ, Darfeuille-Michaud A. Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly. *Cell Microbiol*. 2010;12(1):99–113.
191. Singh SB, Ornatowski W, Vergne I, Naylor J, Delgado M, Roberts E, *et al.* Human IRGM regulates autophagy and cell-autonomous immunity functions through mitochondria. *Nat Cell Biol*. 2010;12(12):1154–65.
192. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, *et al.* A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science*. 2006;314(5804):1461–3.
193. Yen D, Cheung J, Scheerens H, Poulet F, McClanahan T, McKenzie B, *et al.* IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest*. 2006;116(5):1310–6.
194. Cho JH, Weaver CT. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2007;133(4):1327–39.
195. Mannon PJ, Fuss IJ, Mayer L, Elson CO, Sandborn WJ, Present D, *et al.* Anti-Interleukin-12 Antibody for Active Crohn's Disease. *N Engl J Med*. 2004;351(20):2069–79.

196. Sandborn WJ, Gasink C, Gao L-L, Blank M a, Johannis J, Guzzo C, *et al.* Ustekinumab induction and maintenance therapy in refractory Crohn's disease. *N Engl J Med.* 2012;367:1519–28.
197. Carvalho A, Bishop KS, Han DY, Ellett S, Jesuthasan A, Lam WJ, *et al.* The role of vitamin D level and related single nucleotide polymorphisms in Crohn's disease. *Nutrients.* 2013;5(10):3898–909.
198. Parkes M, Cortes A, van Heel D A, Brown M A. Genetic insights into common pathways and complex relationships among immune-mediated diseases. *Nat Rev Genet.* 2013;14(9):661–73.
199. Ventham NT, Kennedy NA, Nimmo ER, Satsangi J. Beyond gene discovery in inflammatory bowel disease: the emerging role of epigenetics. *Gastroenterology.* 2013;145(2):293–308.
200. Manolio T a, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorff LA, Hunter DJ, *et al.* Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature.* 2009;461(7265):747–53.
201. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, *et al.* Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature.* 2012;491(7422):119–24.
202. Liu JZ, Anderson CA. Genetic studies of Crohn's disease: Past, present and future. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2014;28(3):373–86.
203. Yang J, Benyamin B, McEvoy BP, Gordon S, Henders AK, *et al.* Common {SNPs} explain a large proportion of the heritability for human height. *Nat Gen.* 2010;42(7):565–9.
204. Renz H, von Mutius E, Brandtzaeg P, Cookson WO, Autenrieth IB, Haller D. Gene-environment interactions in chronic inflammatory disease. *Nat Immunol.* 2011;12(4):273–7.
205. Dunham I, Kundaje A, Aldred SF, Collins PJ, Davis CA, Doyle F, *et al.* An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature.* 2012;489(7414):57–74.
206. Strober W, Fuss I, Mannon P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest.* 2007;117(3):514–21.

207. Polytarchou C, Koukos G, Iliopoulos D. Systems biology in inflammatory bowel diseases: ready for prime time. *Curr Opin Gastroenterol*. 2014;30(4):339–46.
208. Watts DJ, Strogatz SH. Collective dynamics of “small-world” networks. *Nature*. 1998;393(6684):440–2.
209. Tavazoie S, Hughes JD, Campbell MJ, Cho RJ, Church GM. Systematic determination of genetic network architecture. *Nat Genet*. 1999 Jul;22(3):281–5.
210. Gossage L, Eisen T. Targeting multiple kinase pathways: A change in paradigm. *Clin Cancer Res*. 2010;16(7):1973–8.
211. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*. 2009;10(1):57–63.
212. Sánchez-Pla A, Reverter F, Ruíz de Villa MC, Comabella M. Transcriptomics: mRNA and alternative splicing. *J Neuroimmunol*. Elsevier B.V.; 2012;248(1-2):23–31.
213. Zhang T, Song B, Zhu W, Xu X, Gong QQ, Morando C, *et al*. An Ileal Crohn’s Disease Gene Signature Based on Whole Human Genome Expression Profiles of Disease Unaffected Ileal Mucosal Biopsies. Ravel J, editor. *PLoS One*. 2012;7(5):e37139.
214. Wu F, Dassopoulos T, Cope L, Maitra A, Brant SR, Harris ML, *et al*. Genome-wide gene expression differences in Crohn’s disease and ulcerative colitis from endoscopic pinch biopsies: insights into distinctive pathogenesis. *Inflamm Bowel Dis*. 2007 Jul;13(7):807–21.
215. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet*. 2011;12(12):861–74.
216. McKenna LB, Schug J, Vourekas A, McKenna JB, Bramswig NC, Friedman JR, *et al*. MicroRNAs control intestinal epithelial differentiation, architecture, and barrier function. *Gastroenterology*. 2010;139(5):1654–64.
217. Brest P, Lapaquette P, Souidi M, Lebrigand K, Cesaro A, Vouret-Craviari V, *et al*. A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn’s disease. *Nat Genet*. 2011;43(3):242–5.

218. Coskun M, Bjerrum JT, Seidelin JB, Nielsen OH. MicroRNAs in inflammatory bowel disease - pathogenesis, diagnostics and therapeutics. *World J Gastroenterol.* 2012;18(34):4629–34.
219. Wu F, Guo NJ, Tian H, Marohn M, Gearhart S, Bayless TM, *et al.* Peripheral blood MicroRNAs distinguish active ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17(1):241–50.
220. Chen Y, Ge W, Xu L, Qu C, Zhu M, Zhang W, *et al.* miR-200b is involved in intestinal fibrosis of Crohn's disease. *Int J Mol Med.* 2012;29(4):601–6.
221. Pekow JR, Kwon JH. MicroRNAs in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2012;18(1):187–93.
222. Mukherji S, Ebert MS, Zheng GXY, Tsang JS, Sharp PA, van Oudenaarden A. MicroRNAs can generate thresholds in target gene expression. *Nat Genet.* 2011;43(9):854–9.
223. Zwiers A, Kraal L, van de Pouw Kraan TCTM, Wurdinger T, Bouma G, Kraal G. Cutting edge: a variant of the IL-23R gene associated with inflammatory bowel disease induces loss of microRNA regulation and enhanced protein production. *J Immunol.* 2012;188(4):1573–7.
224. Stylianou E. Epigenetics: the fine tuner in IBD? *Curr Opin Gastroenterol.* 2013;29(4):997–1003.
225. Feil R, Fraga MF. Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nat Rev Genet.* 2012;13(2):97–109.
226. Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature.* 1997;389(6648):251–60.
227. Kouzarides T. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell.* 2007;128(4):693–705.
228. Hardison RC. Genome-wide epigenetic data facilitate understanding of disease susceptibility association studies. *J Biol Chem.* 2012;287(37):30932–40.
229. Wu F, Zhang S, Dassopoulos T, Harris ML, Bayless TM, Meltzer SJ, *et al.* Identification of microRNAs associated with ileal and colonic Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2010;16(10):1729–38.

230. Sadler T, Scarpa M, Rieder F, West G, Stylianou E. Cytokine-induced chromatin modifications of the type I collagen alpha 2 gene during intestinal endothelial-to-mesenchymal transition. *Inflamm Bowel Dis.* 2013;19(7):1354–64.
231. Schaible TD, Harris RA, Dowd SE, Smith CW, Kellermayer R. Maternal methyl-donor supplementation induces prolonged murine offspring colitis susceptibility in association with mucosal epigenetic and microbiomic changes. *Hum Mol Genet.* 2011;20(9):1687–96.
232. Brain O, Owens BMJ, Pichulik T, Allan P, Khatamzas E, Leslie A, *et al.* The intracellular sensor NOD2 induces microRNA-29 expression in human dendritic cells to limit IL-23 release. *Immunity.* 2013;39(3):521–36.
233. Nguyen HTT, Dalmaso G, Müller S, Carrière J, Seibold F, Darfeuille-Michaud A. Crohn's disease-associated adherent invasive escherichia coli modulate levels of microRNAs in intestinal epithelial cells to reduce autophagy. *Gastroenterology.* 2014;146(2):508–19.
234. Lu C, Chen J, Xu HG, Zhou X, He Q, Li YL, *et al.* MIR106B and MIR93 prevent removal of bacteria from epithelial cells by disrupting ATG16L1-mediated autophagy. *Gastroenterology.* 2014;146(1):188–99.
235. Tyers M, Mann M. From genomics to proteomics. *Nature.* 2003;422(6928):193–7.
236. Bonetta L. Protein-protein interactions: Interactome under construction. *Nature.* 2010;468(7325):851–4.
237. Alex P, Gucek M, Li X. Applications of proteomics in the study of inflammatory bowel diseases: Current status and future directions with available technologies. *Inflamm Bowel Dis.* 2009;15(4):616–29.
238. Iskandar HN, Ciorba MA. Biomarkers in inflammatory bowel disease: Current practices and recent advances. *Transl Res.* 2012;159(4):313–25.
239. Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G. Decoding Cell Death Signals in Inflammation and Immunity. *Cell.* 2010;140(6):798–804.

240. Rubartelli A, Lotze MT. Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends Immunol.* 2007;28(10):429–36.
241. Rock KL, Latz E, Ontiveros F, Kono H. The sterile inflammatory response. *Annu Rev Immunol.* 2010;28:321–42.
242. Fiocchi C. Genes and “In-Vironment”: How will our concepts on the pathophysiology of inflammatory bowel disease develop in the future? *Dig Dis.* 2013;30(suppl 3):2–11.
243. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature.* 2011;474(7351):307–17.
244. Büning C, Genschel J, Bühner S, Krüger S, Kling K, Dignass A, *et al.* Mutations in the NOD2/CARD15 gene in Crohn’s disease are associated with ileocecal resection and are a risk factor for reoperation. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004;19(10):1073–8.
245. Alvarez-Lobos M, Arostegui JI, Sans M, Tassies D, Plaza S, Delgado S, *et al.* Crohn's Disease Patients Carrying Nod2/CARD15 Gene Variants Have an Increased and Early Need for First Surgery due to Stricturing Disease and Higher Rate of Surgical Recurrence. *Ann Surg.* 2005 Nov [;242(5):693–700.
246. Ahmad T, Armuzzi A, Bunce M, Mulcahy-Hawes K, Marshall SE, Orchard TR, *et al.* The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn’s disease. *Gastroenterology.* 2002;122(4):854–66.
247. Maconi G, Colombo E, Sampietro GM, Lamboglia F, D’Incá R, Daperno M, *et al.* CARD15 gene variants and risk of reoperation in Crohn’s disease patients. *Am J Gastroenterol.* 2009;104(10):2483–2483.
248. Solon JG, Burke JP, Walsh SR, Coffey JC. The effect of NOD2 polymorphism on postsurgical recurrence in Crohn’s disease: a systematic review and meta-analysis of available literature. *Inflamm Bowel Dis.* 2013;19(5):1099–105.
249. Fowler SA, Ananthakrishnan AN, Gardet A, Stevens CR, Korzenik JR, Sands BE, *et al.* SMAD3 gene variant is a risk factor for recurrent surgery in patients with Crohn’s disease. *J Crohns Colitis.* 2014;8(8):845–51.

250. Sehgal R, Berg A, Polinski JI, Hegarty JP, Lin Z, McKenna KJ, *et al.* Mutations in IRGM are associated with more frequent need for surgery in patients with ileocolonic Crohn's disease. *Dis Colon Rectum*. 2012;55(2):115–21.
251. Germain A, Guéant R, Chamaillard M, Bresler L, Guéant J-L, Peyrin-Biroulet L. CARD8 gene variant is a risk factor for recurrent surgery in patients with Crohn's disease. *Dig Liver Dis. Editrice Gastroenterologica Italiana*; 2015;15:S1590–8658(15)00419–3.
252. VanDussen KL, Liu T-C, Li D, Towfic F, Modiano N, Winter R, *et al.* Genetic variants synthesize to produce paneth cell phenotypes that define subtypes of Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2014;146(1):200–9.
253. Meijer MJW, Mieremet-ooms MAC, Hogezaand RA Van, Lamers CBHW, Hommes DW, Verspaget HW. Role of matrix metalloproteinase , tissue inhibitor of metalloproteinase and tumor necrosis factor- α single nucleotide gene polymorphisms in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2007;13(21):2960–6.
254. Bohn E, Bechtold O, Zahir N, Frick J-S, Reimann J, Jilge B, *et al.* Host gene expression in the colon of gnotobiotic interleukin-2-deficient mice colonized with commensal colitogenic or noncolitogenic bacterial strains: common patterns and bacteria strain specific signatures. *Inflamm Bowel Dis*. 2006;12(9):853–62.
255. Domènech E, Mañosa M, Bernal I, Garcia-Planella E, Cabré E, Piñol M, *et al.* Impact of azathioprine on the prevention of postoperative Crohn's disease recurrence: results of a prospective, observational, long-term follow-up study. *Inflamm Bowel Dis*. 2008;14(4):508–13.
256. Wilcoxon F. Individual comparisons of grouped data by ranking methods. *J Econ Entomol*. 1946;39:269.
257. R Development Core Team RFFSC. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. 2008. p. 2673. Available from: <http://www.r-project.org>
258. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL. Gene set enrichment analysis : A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *PNAS*. 2005;102(43):15545–50.

259. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson K-F, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, *et al.* PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet.* 2003;34(3):267–73.
260. Tabas-Madrid D, Nogales-Cadenas R, Pascual-Montano A. GeneCodis3: A non-redundant and modular enrichment analysis tool for functional genomics. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(W1).
261. Nogales-Cadenas R, Carmona-Saez P, Vazquez M, Vicente C, Yang X, Tirado F, *et al.* GeneCodis: Interpreting gene lists through enrichment analysis and integration of diverse biological information. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(SUPPL. 2):W317–22.
262. Carmona-Saez P, Chagoyen M, Tirado F, Carazo JM, Pascual-Montano A. GENECODIS: a web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists. *Genome Biol.* 2007;8(1):R3.
263. LaBaer J, Ramachandran N. Protein microarrays as tools for functional proteomics. *Current Opinion in Chemical Biology.* 2005. p. 14–9.
264. Yang FF, Huang Y, Li QB, Dai JH, Fu Z. Single nucleotide polymorphisms in the ORM1-like 3 gene associated with childhood asthma in a Chinese population. *Genet Mol Res.* 2012;11(4):4646–53.
265. Berce V, Kozmus CEP, Potočnik U. Association among ORMDL3 gene expression, 17q21 polymorphism and response to treatment with inhaled corticosteroids in children with asthma. *Pharmacogenomics J.* 2013;13(6):523–9.
266. McGovern D, Gardet A, Törkvist L, Goyette P, Essers J, Taylor K, *et al.* Genome-wide association identifies multiple ulcerative colitis susceptibility loci. *Nat Genet.* 2010;42(4):332–7.
267. Huff CD, Witherspoon DJ, Zhang Y, Gatenbee C, Denson LA, Kugathasan S, *et al.* Crohn's disease and genetic hitchhiking at IBD5. *Mol Biol Evol.* 2012;29(1):101–11.
268. Franchimont N, Reenaers C, Lambert C, Belaiche J, Bours V, Malaise M, *et al.* Increased expression of receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL), its receptor RANK and its decoy receptor osteoprotegerin in the colon of Crohn's disease patients. *Clin Exp Immunol.* 2004;138(3):491–8.

269. Cattaneo E, Laczko E, Buffoli F, Zorzi F, Bianco MA, Menigatti M, *et al.* Preinvasive colorectal lesion transcriptomes correlate with endoscopic morphology (polypoid vs. nonpolypoid). *EMBO Mol Med.* 2011;3(6):334–47.
270. Roberts DL, O’Dwyer ST, Stern PL, Renehan AG. Global gene expression in pseudomyxoma peritonei , with parallel development of two immortalized cell lines. *Oncotarget.* 2015;6(13):10786–800.
271. Rahimi N, Rezazadeh K, Mahoney JE, Hartsough E, Meyer RD. Identification of IGPR-1 as a novel adhesion molecule involved in angiogenesis. *Molecular Biology of the Cell.* 2012. p. 1646–56.
272. Zhu Y, Yao S, Iliopoulou BP, Han X, Augustine MM, Xu H, *et al.* B7-H5 costimulates human T cells via CD28H. *Nat Commun.* 2013;4:2043.
273. Clark HF, Gurney AL, Abaya E, Baker K, Baldwin D, Brush J, *et al.* The secreted protein discovery initiative (SPDI), a large-scale effort to identify novel human secreted and transmembrane proteins: A bioinformatics assessment. *Genome Re.* 2003;13(10):2265–70.
274. Pejaver V, Hsu W-L, Xin F, Dunker AK, Uversky VN, Radivojac P. The structural and functional signatures of proteins that undergo multiple events of post-translational modification. *Protein Sci.* 2014;23(8):1077–93.
275. Sancho R, Cremona CA, Behrens A. Stem cell and progenitor fate in the mammalian intestine : Notch and lateral inhibition in homeostasis and disease. *EMBO Rep.* 2015;16(5):571–81.
276. Watt FM, Huck WTS. Role of the extracellular matrix in regulating stem cell fate. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(8):467–73.
277. Vooijs M, Liu Z, Kopan R. Notch: Architect, landscaper, and guardian of the intestine. *Gastroenterology.* 2011;141(2):448–59.
278. Crosnier C, Stamatakis D, Lewis J. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat Rev Genet.* 2006;7(5):349–59.
279. Medema JP, Vermeulen L. Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature.* 2011;474(7351):318–26.

280. VanDussen KL, Carulli a. J, Keeley TM, Patel SR, Puthoff BJ, Magness ST, *et al.* Notch signaling modulates proliferation and differentiation of intestinal crypt base columnar stem cells. *Development*. 2012;139(3):488–97.
281. Zheng X, Tsuchiya K, Okamoto R, Iwasaki M, Kano Y, Sakamoto N, *et al.* Suppression of *hath1* gene expression directly regulated by *hes1* via notch signaling is associated with goblet cell depletion in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17(11):2251–60.
282. Pope JL, Bhat A a, Sharma A, Ahmad R, Krishnan M, Washington MK, *et al.* Claudin-1 regulates intestinal epithelial homeostasis through the modulation of Notch-signalling. *Gut*. 2014;63(4):622–34.
283. Obata Y, Takahashi D, Ebisawa M, Kakiguchi K, Yonemura S, Jinnohara T, *et al.* Epithelial cell-intrinsic Notch signaling plays an essential role in the maintenance of gut immune homeostasis. *J Immunol*. 2012;188(5):2427–36.
284. Okamoto R, Tsuchiya K, Nemoto Y, Akiyama J, Nakamura T, Kanai T, *et al.* Requirement of Notch activation during regeneration of the intestinal epithelia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009;296(1):G23–35.
285. Gersemann M, Becker S, Kübler I, Koslowski M, Wang G, Herrlinger KR, *et al.* Differences in goblet cell differentiation between Crohn's disease and ulcerative colitis. *Differentiation*. 2009;77(1):84–94.
286. Taniguchi K, Wu L-W, Grivennikov SI, de Jong PR, Lian I, Yu F-X, *et al.* A gp130–Src–YAP module links inflammation to epithelial regeneration. *Nature*. 2015;519(7541):57–62.
287. Kizil C, Kyritsis N, Brand M. Effects of inflammation on stem cells : together they strive ? *EMBO Rep*. 2015;16(4):416–26.
288. Shinoda M, Shin-Ya M, Naito Y, Kishida T, Ito R, Suzuki N, *et al.* Early-stage blocking of Notch signaling inhibits the depletion of goblet cells in dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. *J Gastroenterol*. 2010;45(6):608–17.
289. Liddiard K, Rosas M, Davies LC, Jones SA., Taylor PR. Macrophage heterogeneity and acute inflammation. *Eur J Immunol*. 2011;41(9):2503–8.

290. Shaker A, Swietlicki EA, Wang L, Jiang S, Onal B, Bala S, *et al.* Epimorphin deletion protects mice from inflammation-induced colon carcinogenesis and alters stem cell niche myofibroblast secretion. *J Clin Invest.* 2010;120(6):2081–93.
291. Werner L, Berndt U, Paclik D, Danese S, Schirbel a., Sturm a. TNF inhibitors restrict T cell activation and cycling via Notch-1 signalling in inflammatory bowel disease. *Gut.* 2012;61(7):1016–27.
292. Tsai Y-H, VanDussen KL, Sawey ET, Wade AW, Kasper C, Rakshit S, *et al.* ADAM10 Regulates Notch Function in Intestinal Stem Cells of Mice. *Gastroenterology.* 2014;147(4):822–34.
293. Guilmeau S, Flandez M, Bancroft L, Sellers RS, Tear B, Stanley P, *et al.* Intestinal Deletion of Pofut1 in the Mouse Inactivates Notch Signaling and Causes Enterocolitis. *Gastroenterology.* 2008;135(3):849–60.
294. Piazzì G, D’Argenio G, Prossomariti A, Lembo V, Mazzone G, Candela M, *et al.* Eicosapentaenoic acid free fatty acid prevents and suppresses colonic neoplasia in colitis-associated colorectal cancer acting on Notch signaling and gut microbiota. *Int J cancer.* 2014;135(9):2004–13.
295. Vlasova AN, Chattha KS, Kandasamy S, Liu Z, Esseili M, Shao L, *et al.* Lactobacilli and Bifidobacteria Promote Immune Homeostasis by Modulating Innate Immune Responses to Human Rotavirus in Neonatal Gnotobiotic Pigs. *PLoS One.* 2013;8(10):e76962.
296. Regueiro M, Schraut W, Baidoo L, Kip KE, Sepulveda AR, Pesci M, *et al.* Infliximab prevents Crohn’s disease recurrence after ileal resection. *Gastroenterology.* 2009;136(2):441–50.
297. De Cruz P, Kamm M, Hamilton A, Ritchie K, Krejany E, Gorelik A, *et al.* Crohn’s disease management after intestinal resection: a randomised trial. *Lancet.* 2015;385(9976):1406–17.
298. McDole JR, Wheeler LW, McDonald KG, Wang B, Konjufca V, Knoop KA, *et al.* Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine. *Nature.* 2012;483(7389):345–9.
299. Howe SE, Lickteig DJ, Plunkett KN, Ryerse JS, Konjufca V. The uptake of soluble and particulate antigens by epithelial cells in the mouse small intestine. *PLoS One.* 2014;9(1):e86656.

300. Dvorak A, Dickersin GR. Crohn's disease: transmission electron microscopic studies. *Hum Pathol.* 1980;11(supp):561–71.
301. Guseh JS, Bores SA, Stanger BZ, Zhou Q, Anderson WJ, Melton DA, *et al.* Notch signaling promotes airway mucous metaplasia and inhibits alveolar development. *Development.* 2009;136(10):1751–9.
302. Koslowski MJ, Teltschik Z, Beisner J, Schaeffeler E, Wang G, Kübler I, *et al.* Association of a functional variant in the Wnt co-receptor LRP6 with early onset ileal Crohn's disease. *PLoS Genet.* 2012;8(2):e1002523.
303. Mathern DR, Laitman LE, Hovhannisyan Z, Dunkin D, Farsio S, Malik TJ, *et al.* Mouse and human Notch-1 regulate mucosal immune responses. *Mucosal Immunol.* 2014;7(4):995–1005.
304. Clark PM, Dawany N, Dampier W, Byers SW, Pestell RG, Tozeren A. Bioinformatics analysis reveals transcriptome and microRNA signatures and drug repositioning targets for IBD and other autoimmune diseases. *Inflamm Bowel Dis.* 2012;18(12):2315–33.
305. Menghini R, Casagrande V, Marino a, Marchetti V, Cardellini M, Stoehr R, *et al.* MiR-216a: a link between endothelial dysfunction and autophagy. *Cell Death Dis.* 2014;5(1):e1029.