UNIVERSITAT DE BARCELONA

Modulación de genes y miRNAs desregulados en la enfermedad inflamatoria intestinal por vesiculas extracelulares de probióticos y microbiota comensal

Yenifer Olivo Martínez

Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència ***Reconeixement- CompartIgual 4.0. Espanya de Creative Commons***.

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia ***Reconocimiento - CompartirIgual 4.0. España de Creative* Commons**.

This doctoral thesis is licensed under the ***Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0. Spain License***.



UNIVERSITAT DE BARCELONA

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y FISIOLOGIA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGIA

TESIS DOCTORAL

MODULACIÓN DE GENES Y miRNAs DESREGULADOS EN LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL POR VESICULAS EXTRACELULARES DE PROBIÓTICOS Y MICROBIOTA COMENSAL

Yenifer Olivo Martínez

2024

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y FISIOLOGIA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGIA

MODULACIÓN DE GENES Y miRNAs DESREGULADOS EN LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL POR VESICULAS EXTRACELULARES DE PROBIÓTICOS Y MICROBIOTA COMENSAL

Memoria presentada por Yenifer Olivo Martínez para optar al título de Doctor por la Universidad de Barcelona

Directoras

Dra. Laura Baldomà LLavinés

Dra. Josefa Badía Palacín

Yenifer Olivo Martínez

2024

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica y Fisiología de la Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación de la Universidad de Barcelona, y ha sido financiada por:

Ministerio de Economía y Competitividad, España

Ministerio de Ciencia e Innovación, España

Proyectos de investigación:

PID2019-107327RB-100 y PID2022-1371920B-100





Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, Colombia.

Programa de Becas para Doctorado Internacional

MINCIENCIAS/Convocatoria No. 860 de 2019- Doctorados en el Exterior



"El talento y el ingenio solo te llevarán hasta cierto punto, pero la curiosidad y la perseverancia pueden llevarte más allá de tus sueños."

J.K. Rowling

RESUMEN GENERAL

La microbiota intestinal desempeña múltiples funciones esenciales para el huésped, tales como el desarrollo del sistema inmunológico, la modulación de la barrera epitelial intestinal y las respuestas inmunes y de defensa. Un desequilibrio en la composición y diversidad de la microbiota intestinal, condición conocida como disbiosis, altera la homeostasis intestinal contribuyendo al desarrollo de diversas enfermedades, como la enfermedad inflamatoria intestinal (EII). La composición de la microbiota está modulada por el perfil genético del huésped, y ciertos polimorfismos han sido vinculados con la EII. Existen evidencias de que una respuesta inmunitaria desregulada del huésped a los componentes de la microbiota tiene un efecto directo en esta patología. En consecuencia, se han desarrollado diversas estrategias nutricionales y terapéuticas orientadas al microbioma para restaurar la homeostasis intestinal en estos pacientes, favoreciendo perfiles antinflamatorios y de reparación de la mucosa intestinal.

En este contexto, los postbióticos se están considerando como una nueva estrategia para el tratamiento de EII. Las vesículas extracelulares (EVs) derivadas de cepas probióticas y de la microbiota comensal han surgido como candidatos prometedores a nuevos postbióticos. La investigación en este campo ha proporcionado evidencia científica de que las EVs median las funciones de la microbiota al transportar y entregar moléculas efectoras a las células huésped, modulando así las vías de señalización y los procesos celulares, incluyendo las respuestas inmunes y de defensa, entre otros. En particular, nuestro grupo de investigación ha demostrado diversas propiedades beneficiosas asociadas a las EVs derivadas de bacterias intestinales. Nuestro modelo de estudio es *Escherichia coli*, una especie colonizadora natural del intestino, en particular el probiótico *E. coli Nissle* 1917 (EcN) y la cepa comensal EcoR12. Aunque se ha avanzado en esta temática, son necesarias más investigaciones que permitan dilucidar el papel de los postbióticos, y en particular de las EVs de probióticos, en el tratamiento de la EII. Por lo tanto, objetivo principal de esta tesis fue **evaluar los mecanismos moleculares que subyacen al efecto de las EVs de probióticos y microbiota en la modulación de genes y miRNAs desregulados en la EII.**

En primer lugar, evaluamos los mecanismos moleculares implicados en la modulación de la integridad y reparación de la barrera intestinal por EVs de la microbiota a través de la regulación diferencial de miR-7-5p y su gen diana TFF3, ambos desregulados en EII (Capítulo 1). Planteamos dos enfoques experimentales. El primer enfoque consistió en un modelo *in vitro* de células LS174T (modelo de células calciformes) estimuladas con EVs de la microbiota, evaluando los efectos sobre la expresión de genes y miR-7-5p mediante RT-qPCR y el uso de inhibidores de las vías de TLR2 o PI3K. En el segundo enfoque, evaluamos el impacto posterior de este estimulo en la función de la barrera epitelial utilizando medios condicionados obtenidos de las células LS174T estimuladas por EVs para tratar las monocapas de Caco-2. Los efectos de fortalecimiento de la barrera se evaluaron analizando la expresión y distribución subcelular de proteínas de unión estrecha, y los efectos de reparación se evaluaron mediante ensayos de curación de heridas. Los resultados mostraron una regulación diferencial de TFF3 en LS174T a través de EVs del probiótico EcN y el comensal EcoR12. Las EVs de EcN activaron la producción de TFF3 a través de TLR2 y regularon negativamente miR7-5-p a través de la vía de señalización de PI3K. En consecuencia, el TFF3 secretado en respuesta las EVs de EcN promovió el refuerzo de la barrera epitelial intestinal y la curación de heridas en células Caco-2. Las EVs de EcoR12 no desencadenaron estos efectos. Este estudio aporta evidencia científica sobre la regulación diferencial de TFF3 y miR-7-5p por EVs de la microbiota y su impacto en la función y reparación de la barrera epitelial intestinal. TFF3 emerge como un objetivo terapéutico potencial en el tratamiento de la EII.

A continuación, nos centramos en genes y miRNAs del sistema serotoninérgico. La serotonina, también conocida como 5-hidroxitriptamina (5-HT), es un mediador clave de la función intestinal. En este tejido, modula el sistema nervioso entérico, las respuestas inmunes, inflamación, motilidad intestinal, integridad de la barrera, y su desregulación se asocia con la gravedad de la EII. En este sentido, realizamos un enfoque experimental utilizando un modelo *in vitro* de células Caco-2 tratadas con IL-1β para inducir un estado inflamatorio. Posteriormente, evaluamos el impacto de las EVs de EcN y EcoR12 en la modulación de genes relacionados con el sistema serotoninérgico (Capítulo 2). Los efectos se evaluaron mediante RT-qPCR, ELISA y microscopía confocal de

inmunofluorescencia. Los efectos antiinflamatorios se evaluaron a través de la medición de citocinas proinflamatorias y enzimas relacionadas con el estrés oxidativo, así como las alteraciones inducidas por IL-1β en las uniones estrechas epiteliales. Además, analizamos la regulación de los miRNAs miR-24 y miR-200a que regulan el mRNA de SERT a nivel postranscripcional. Los resultados mostraron efectos específicos según la cepa. Este estudio demuestra que las EVs de la cepa probiótica EcN atenúan las alteraciones inducidas por la IL-1β, incidiendo en el metabolismo de la serotonina, el estrés oxidativo y la integridad de la barrera. Además, proporcionamos evidencia sobre los mecanismos moleculares que subyacen a la disminución de los niveles de serotonina libre en condiciones inflamatorias mediados por las EVs de EcN a través de la regulación de SERT, miR-200a y miR-24, sugiriendo su potencial aplicación como postbiótico en la EII. Este estudio es el primero en demostrar la regulación de estos miRNAs por EVs derivadas de probióticos.

Finalmente, nos planteamos evaluar la capacidad de las EVs de las cepas en estudio para contrarrestar y/o prevenir la expresión alterada del transportador de di/tripéptidos PepT1 en condiciones inflamatorias mediante la regulación de miR-92b y/o miR-193a-3p. Estos miRNAs son reguladores de PepT1 colónico y contribuyen a mantener la homeostasis intestinal. (Capítulo 3). Para analizar la regulación de la expresión de PepT1 por EVs de la microbiota, utilizamos el modelo de inflamación inducida por interleucina IL-1β en células Caco-2. Evaluamos los efectos mediante el análisis de los niveles relativos de mRNA de PepT1 y los dos miRNAs reguladores mediante RT-qPCR. Además, determinamos los niveles de proteína PepT1 mediante ELISA y microscopía confocal de inmunofluorescencia. Evaluamos también el impacto de las EVs de EcN y EcoR12 en la expresión de PepT1 en condiciones de inducción por el sustrato natural Tri-DAP, con el objetivo de dilucidar cómo funcionan los mecanismos reguladores en condiciones tanto fisiológicas como patológicas. Este estudio demuestra que las EVs del probiótico EcN mejoran la inflamación en las células epiteliales intestinales mediante la regulación positiva de miR-193a-3p y la posterior regulación negativa de la proteína PepT1.

En conclusión, los datos presentados en esta tesis indican que las EVs derivadas del probiótico EcN tienen un potencial significativo como postbiótico en el tratamiento de

la EII por su capacidad de restaurar la homeostasis intestinal a varios niveles. Por un lado, promueven un perfil antiinflamatorio por regulación de los receptores inmunes TLR4 y NOD1, biodisponibilidad de serotonina y expresión del transportador PepT1 involucrado en la entrada de péptidos bacterianos con actividad proinflamatoria. Por otro lado, mejoran la función y reparación de la barrera intestinal, a través de la regulación de MUC2, TFF3 y proteínas de unión estrecha.

GENERAL SUMMARY

The gut microbiota plays crucial roles in the physiology of the gastrointestinal tract. Among other functions, the gut microbiota contributes to the development of the host immune system, maintenance of the intestinal epithelial barrier, immune and defense responses. Imbalances in the composition and diversity of the microbiota, a condition known as intestinal dysbiosis, negatively impacts on intestinal homeostasis, contributing to the development of a wide diversity of diseases, such as inflammatory bowel disease (IBD). The composition of the microbiota is modulated by the host's genetic profile, and certain polymorphisms have been associated with IBD. There is evidence that a dysregulated immune response of the host to microbiota components has a direct effect on this pathology. Consequently, nutritional and therapeutic strategies based on the gut microbiome have been developed to restore intestinal homeostasis in these patients, promoting anti-inflammatory barrier repairing profiles.

In this context, postbiotics are being considered as a novel strategy for the treatment of IBD. Extracellular vesicles (EVs) derived from probiotic and gut microbiota strains have emerged as promising candidates for novel postbiotics. Research in this field has provided scientific evidence that EVs mediate microbiota functions by transporting and delivering effector molecules to host cells. These bacterial molecules modulate signaling pathways and cellular processes, including immune responses and defense mechanisms, among others. In particular, our research group has demonstrated several beneficial properties associated to microbiota derived EVs. Our model of gut microbiota is *Escherichia coli*, a naturally colonizing species in the intestine, specifically the probiotic *E. coli* Nissle 1917 (EcN) and the commensal strain EcoR12. Although progress has been made in this field, further research is needed to elucidate the role of postbiotics, particularly probiotic EVs, in the treatment of IBD. Therefore, the main objective of this thesis was **to evaluate the molecular mechanisms underlying the effects of probiotic and microbiota derived EVs on the modulation of dysregulated genes and miRNAs in IBD.**

Firts, we evaluated the molecular mechanisms involved in the modulation of intestinal barrier integrity and repair by microbiota-derived EVs through the differential

regulation of miR-7-5p and its target gene TFF3. Both are dysregulated in IBD (Chapter 1). The first approach consisted of an *in vitro* model using LS174T goblet cells stimulated with microbiota-derived EVs. The effects on the expression of genes and miRNAs were evaluated using RT-qPCR and inhibitors of the TLR2 or PI3K pathways. In the second approach, we evaluated the subsequent impact of this stimulus on epithelial barrier function. To this end, conditioned media from control and vesicle-stimulated LS174T cells were used to treat Caco-2 monolayers. The barrier-strengthening effects were evaluated by analyzing the expression and subcellular distribution of tight junction proteins, and the repairing effects were assessed using wound-healing assays. The results showed a differential regulation of TFF3 in LS174T by EVs from the probiotic EcN and the commensal EcoR12. EcN EVs activated the TFF3 production through TLR2 and downregulated miR7-5-p through the PI3K signaling pathway. Consistently, high levels of secreted TFF3 in response to EcN EVs reinforced the tight junctions and stimulated wound healing in Caco-2 cells. EcoR12 EVs did not cause these effects. This study provides scientific evidence on the differential regulation of TFF3 mediated by microbiota EVs and its impact on the function and repair of the intestinal epithelial barrier. TFF3 is emerging as a potential therapeutic target in the treatment of IBD.

Next, we focus on genes of the serotoninergic system. Serotonin, also known as 5-hydroxytryptamine (5-HT), is a key mediator of intestinal function. In this tissue, it modulates the enteric nervous system, immune responses, inflammation, gut motility, and barrier integrity and its dysregulation is associated with the severity of IBD. In this regard, we conducted an experimental approach using an *in vitro* model of Caco-2 cells treated with IL-1β to induce an inflammatory state. Subsequently, we evaluated the impact of EVs from EcN and EcoR12 on the modulation of genes related to the serotonergic system (Chapter 2). The effects were evaluated using RT-qPCR, ELISA, and confocal immunofluorescence microscopy. To further investigate the regulatory mechanisms of the serotonergic system, we examined the anti-inflammatory effects by measuring pro-inflammatory cytokines and enzymes related to oxidative stress, as well as IL-1β-induced alterations in epithelial tight junctions. Additionally, we analyzed the regulation of miRNAs that target SERT mRNA. We found strain-specific effects. This study

proves that EVs from the probiotic strain EcN attenuate IL-1β-induced alterations, impacting serotonin metabolism, oxidative stress, and barrier integrity. Furthermore, this study provided evidence of the molecular mechanisms underlying the reduction in free serotonin levels under inflammatory conditions, mediated by EVs through the regulation of SERT, miR-200a, and miR-24. These findings suggest the potential application of EcN EVs as a postbiotic treatment for IBD. This study revealed for the first time the regulation of miR-24 and miR-200a by probiotic-derived EVs.

Finally, we sought to evaluate whether EVs isolated from the probiotic EcN and the commensal EcoR12 could counteract/prevent altered PepT1 expression under inflammatory conditions through the regulation of miR92b and miR-193a-3p. These miRNAs are regulators of colonic PepT1 and contribute to the maintenance of intestinal homeostasis (Chapter 3). To analyze the regulation of PepT1 expression by microbiota-derived EVs, we used the interleukin IL-1β-induced inflammation model in Caco-2 cells. The effects of bacterial EVs were evaluated by analyzing the relative levels of Pept1 mRNA and the two regulatory miRNAs by RT-qPCR, and the PepT1 protein levels by ELISA and immunofluorescence confocal microscopy. The Influence of microbiota EVs on PepT1 expression was also analyzed under conditions of induction by the natural transporter substrate Tri-DAP to elucidate how the regulatory mechanisms function under both physiological and pathological conditions. This study demonstrates that EVs from the probiotic EcN improve inflammation in intestinal epithelial cells through upregulation of miR-193a-3p and subsequent downregulation of PepT1 protein.

In conclusion, the data presented in this thesis indicate that EVs derived from the probiotic EcN have significant potential as a postbiotic treatment for IBD due to their ability to restore intestinal homeostasis at multiple levels. On one hand, they promote an anti-inflammatory profile by regulating immune receptors TLR4 and NOD1, serotonin bioavailability, and the expression of the PepT1 transporter involved in the entry of bacterial peptides with pro-inflammatory activity. On the other hand, they enhance the function and repair of the intestinal barrier through the regulation of MUC2, TFF3, and tight junction proteins.

RESUM GENERAL

La microbiota intestinal exerceix múltiples funcions essencials per l'hoste, com son el desenvolupament del sistema immunitari, la modulació de la barrera epitelial intestinal i les respostes immunes i de defensa. Un desequilibri en la composició i diversitat de la microbiota, condició coneguda com a disbiosi, altera la homeòstasi intestinal contribuint al desenvolupament de diverses malalties, com ara la malaltia inflamatòria intestinal (EII). La composició de la microbiota està modulada pel perfil genètic de l'amfitrió, i certs polimorfismes s'han associat amb la EII. Hi ha evidències que una resposta immune desregulada de l'hoste front els components de la microbiota té un efecte directe en aquesta patologia. En conseqüència, s'han desenvolupat diverses estratègies nutricionals i terapèutiques orientades al microbioma per restaurar la homeòstasi intestinal en aquests pacients, afavorint perfils antiinflamatoris i de reparació de la mucosa intestinal.

En aquest context, els postbiòtics estan emergint com una estratègia innovadora per al tractament de la EII. Les vesícules extracel·lulars (EVs) derivades de soques probiòtiques i de la microbiota intestinal es postulen com a candidats prometedors de nous postbiòtics. La recerca en aquest camp ha proporcionat evidència científica sobre el rol de les EVs com a mediadors de les funcions de la microbiota transportant i lliurant molècules efectores a les cèl·lules hoste, les quals modulen vies de senyalització i processos cel·lulars, incloent les respostes immunitàries i els mecanismes de defensa, entre altres. En particular, el nostre grup de recerca ha contribuït a l'estudi de diverses propietats beneficioses associades a les EVs derivades de la microbiota. El nostre model d'estudi és *Escherichia coli*, una espècie que colonitza naturalment l'intestí, específicament la soca probiòtica *E. coli* Nissle 1917 (EcN) i la soca comensal EcoR12. Tot i que s'ha avançat en aquest camp, cal més recerca per explorar el paper dels postbiòtics, especialment les EVs de soques probiòtiques, en el tractament de la EII. En aquest context, l'objectiu principal d'aquesta tesi va ser **avaluar els mecanismes moleculars responsables dels efectes de les EVs derivades de probiòtics i de la microbiota comensal en la modulació dels gens i miRNAs desregulats en la EII.**

En primer lloc, vam avaluar els mecanismes implicats en la modulació de la integritat de la barrera intestinal i la seva reparació mitjançant EVs derivades de la microbiota, a través de la regulació diferencial de miR-7-5p i el seu gen diana TFF3, ambdós desregulats en la EII (Capítol 1). Amb aquesta finalitat vàrem abordar dues aproximacions. La primera consistia en un model in vitro utilitzant cèl·lules caliciformes LS174T estimulades amb EVs derivades de la soques bacterianes en estudi, avaluant els efectes sobre l'expressió de gens i miR-7-5p mitjançant RT-qPCR i l'us d'inhibidors de les vies de TLR2 o PI3K. La segona aproximació consistia en avaluar l'impacte posterior d'aquest estímul sobre la funció de la barrera epitelial. Amb aquesta finalitat, monocapes de cèl·lules Caco-2 van ser tractades amb el medi condicionat obtingut de cèl·lules LS174T estimulades amb les EVs. Els efectes de reforçament de la barrera es van avaluar analitzant l'expressió i distribució subcel·lular de proteïnes de les unions estretes (*tight junctions*), i els efectes de reparació es van avaluar mitjançant assaigs de cicatrització de ferides. Els resultats van mostrar una regulació diferencial del TFF3 en cèl·lules LS174T per les EVs del probiòtic EcN i de la soca comensal EcoR12. Les EVs d'EcN van activar la producció de TFF3 a través de TLR2 i van inhibir l'expressió de miR7-5-p a través de la via de senyalització de PI3K. En conseqüència, els alts nivells de TFF3 secretat en resposta a les EVs de EcN van promoure el reforç de la barrera epitelial i la cicatrització de ferides en les cèl·lules Caco-2. Les EVs d'EcoR12 no van causar aquests efectes. Aquest estudi proporciona evidència científica sobre la regulació diferencial de TFF3 i miR-7-5p mitjançada per les EVs de la microbiota i el seu impacte en la funció i reparació de la barrera epitelial intestinal. Es important destacar que TFF3 està emergint com a possible diana terapèutica en el tractament de la EII.

A continuació en vàrem centrar en gens i micro-RNAs dels sistema metabòlic de la serotonina. La serotonina, també coneguda com a 5-hidroxitriptamina (5-HT), és un mediador clau de la funció intestinal. En aquest teixit, modula el sistema nerviós entèric, les respostes immune, la inflamació, la motilitat intestinal i la integritat de la barrera, i la seva desregulació està associada amb la gravetat de la EII. En aquest sentit, vam dur a terme una aproximació experimental utilitzant un model in vitro de cèl·lules Caco-2 tractades amb IL-1β per induir un estat inflamatori. Posteriorment, vam avaluar l'impacte

de les EVs d'EcN i EcoR12 en la modulació dels gens relacionats la síntesi, degradació i recaptació de serotonina mitjançant RT-qPCR, ELISA i microscòpia confocal d' immunofluorescència (Capítol 2). Es van avaluat també els efectes antiinflamatoris per quantificació de citocines proinflamatòries i enzims relacionats amb l'estrès oxidatiu, així com les alteracions induïdes per IL-1β en les unions estretes epitelials. A més, vam analitzar la regulació dels miRNAs miR-24 i miR-200a, que regulen el mRNA de transportador de serotonina SERT a nivell post-transcripcional. Els resultats van demostrar efectes específics segons la soca productora de les EVs. Aquest estudi demostra que les EVs de la soca probiòtica EcN atenuen les alteracions induïdes per IL-1β sobre el metabolisme de la serotonina, l'estrès oxidatiu i la integritat de la barrera. A més, proporciona evidència dels mecanismes moleculars que porten a disminuir els nivells lliures de serotonina en condicions inflamatòries per acció de les EVs del probiòtic EcN, a través de la regulació de SERT, miR-200a i miR-24. Aquests resultats suggereixen l'aplicació potencial de les EVs de EcN com a tractament postbiòtic per a la EII. Aquest estudi va demostrar per primera vegada la regulació de miR-24 i miR-200a per EVs derivades de probiòtics.

Finalment, ens vàrem plantejar avaluar si les EVs aïllades de les soques en estudi podrien també contrarestar/prevenir l'expressió alterada del transportador de di/tripeptids PepT1 en condicions inflamatòries a través de la regulació de miR92b i miR-193a-3p. Aquests miRNAs són reguladors de PepT1 i contribueixen al manteniment de la homeòstasi intestinal (Capítol 3). Per analitzar la regulació de l'expressió de PepT1 per part EVs derivades de la microbiota, vam utilitzar el model d'inflamació induïda per IL-1β en cèl·lules Caco-2. Els efectes de les EVs bacterianes van ser avaluats analitzant els nivells relatius de l'mRNA de PepT1 i els dos miRNAs reguladors mitjançant RT-qPCR, i els nivells de la proteïna PepT1 mitjançant ELISA i microscòpia confocal d'immunofluorescència. També es va analitzar la influència de les EVs de la microbiota en l'expressió de PepT1 en condicions d'inducció pel substrat natural d'aquest transportador, el Tri-DAP, per esbrinar com funcionen els mecanismes reguladors en condicions tant fisiològiques com patològiques. Aquest estudi demostra que els EV del probiòtic EcN milloren la inflamació

de les cèl·lules epitelials intestinals mitjançant la regulació de miR-193a-3p i la posterior regulació a la baixa de la proteïna PepT1.

En conclusió, les dades presentades en aquesta tesi indiquen que les EVs derivades del probiòtic EcN tenen un potencial significatiu com a postbiòtic en el tractament de la malaltia inflamatòria intestinal per la seva capacitat de restaurar la homeòstasi intestinal a diversos nivells. D'una banda, promouen un perfil antiinflamatori mitjançant la regulació dels receptors immunitaris TLR4 i NOD1, la biodisponibilitat de la serotonina i l'expressió del transportador PepT1 implicat en l'entrada de pèptids bacterians amb activitat proinflamatòria. D'altra banda, milloren la funció i reparació de la barrera intestinal a través de la regulació de MUC2, TFF3 i proteïnes de les unions estretes.

ABREVIATURAS

5H-T: 5-hidroxitriptamina /Serotonina

AIEC: E. coli adherente-invasiva

Akt: Proteína cinasa

AMPK: Proteína Cinasa Activada por AMP

AMPs: Péptidos Antimicrobianos

CD: Enfermedad de Crohn

DCs: Células dendríticas

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DSS: Sal Sódica del Sulfato de Dextrano

EcN: *Escherichia coli* Nissle 1917

EGF: Factor de Crecimiento Epidérmico

EVs: Vesículas Extracelulares

fMLP:N-formilmetionil-leucil-fenilalanina

FCGBP: Proteína de Unión a IgGFc

GALT: Tejido Linfoide asociado al Intestino

GPCR: Receptor Acoplado a Proteínas G

GRAS: Generalmente Reconocido como Seguro

IL-: Interleucinas

IFN: Interferón

iNOS: Enzima Oxido Sintasa Inducible

IRGM: GTPasa M Relacionada con la Inmunidad

JAK: Janus cinasa

LPS: Lipopolisacárido

MAMPs: Patrones Moleculares Propios de Microbios

MAPK: Cinasas Activadas por Mitógenos

MAO: Monoamino Oxidasa

miRNA: microRNA

MUC: Mucina

NOD: Dominio de Oligomerización por Unión a Nucleótidos

NF-KB: Factor nuclear Kappa B

NK: Natural Killer

OMV: Vesículas de la Membrana Externa

PAMPs: Patrones Moleculares Propios de Patógenos

PepT-1: Transportador de Péptidos 1

PGN: Peptidoglicano

PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinasa

PSA: Polisacárido A

RNA: Ácido Ribonucleico

SCFAs: Ácidos Grasos de Cadena Corta

SERT: Transportador de Serotonina (recaptación)

sIgA2: Inmunoglobulina A2 Secretora

SNP: Polimorfismos de un solo Nucleótido

TGF: Factor de Crecimiento Transformante

Th: T helper/ células T colaboradoras

TFF3: Factor Trefoil 3

TGF: Factor de Crecimiento Transformante

TLRs: Receptores Tipo Toll

TJ: Proteínas de unión estrecha

TNBS: Ácido Trinitrobenceno Sulfónico

TNF: Factor de Necrosis Tumoral

TpH: Triptófano Hidroxilasa

Treg: Células T Reguladoras

Tri-DAP: Ácido L-Ala-γ-D-Glu-mDAP

UC: Colitis Ulcerosa

VMAT1: Transportador Vesicular de Monoaminas 1

ZO: Zónula Ocludens

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN 37
1.1. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL 39
1.1.1. Patogénesis 39
1.1.1.1. Predisposición genética 39
1.1.1.2. Factores Ambientales 40
1.1.1.3. Respuesta Inmune 41
1.1.1.4. Microbiota 46
1.1.1.4.1. Funciones de la Microbiota 48
1.1.1.4.2. La microbiota y su rol en la patogénesis de la EII 56
1.1.2. Diagnóstico 57
1.1.3. Tratamiento 58
1.2. EPITELIO INTESTINAL: ESTRUCTURA Y FUNCIÓN. 61
1.2.1. Fisiología del epitelio Intestinal 61
1.2.2. Disfunción de la Barrera Epitelial Intestinal durante la EII 66
1.3. miRNAs DESREGULADOS EN LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL 69
1.4. GENES DESREGULADOS EN LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL 71
1.4.1. Péptido Trefoil 3 (TFF3) 71
1.4.1.1. Estructura y Expresión 71
1.4.1.2. Funciones y vías de señalización 71
1.4.1.3. Implicaciones de la Microbiota en la expresión de TFF3 74
1.4.1.4. TFF3 y Enfermedad Inflamatoria Intestinal 75
1.4.1.5. MicroRNAs en la regulación de TFF3 76
1.4.2. Genes Implicados en el Metabolismo de Serotonina 77
1.4.2.1. Metabolismo de 5-HT en el intestino 77
1.4.2.2. Síntesis endógena de 5-HT 77
1.4.2.3. Liberación y reabsorción de 5-HT 78
1.4.2.4. Receptores y Señalización 79
1.4.2.5. Microbiota y su implicación en la síntesis de 5-HT Intestinal 80
1.4.2.6. 5-HT y Enfermedad Inflamatoria Intestinal 82
1.4.2.7. miRNAs en la regulación de SERT 85
1.4.3. PepT-1; Transportador de Péptidos 1 (SLC15A1) 86
1.4.3.1. Estructura, función y expresión de PepT1 86

1.4.3.2. Reguladores de PepT1 ..... *87*

1.4.3.3. Regulación de PepT-1 por la Microbiota *88*

1.4.3.4. PepT-1 y Enfermedad Inflamatoria Intestinal *89*

1.4.3.5. miRNAs en la regulación de PepT-1 ..... *92*

1.5. ESTRATEGIAS TERAPEUTICAS EN LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL BASADAS EN EL MICROBIOMA 93

1.5.1. *Escherichia coli* Nissle 1917 93

1.5.2. Postbióticos 95

1.5.2.1. Vesículas Extracelulares (EVs) de probióticos y microbiota. 96

2. OBJETIVOS 103

3. CAPÍTULO 1 109

Modulación de la integridad y reparación de la barrera intestinal por EVs de la microbiota mediante la regulación diferencial de TFF3 en células caliciformes LS174T

4. CAPÍTULO 2 135

Modulación de genes relacionados con la serotonina mediante EVs del probiótico Escherichia coli Nissle 1917 en un modelo de inflamación inducida por IL-1β en células epiteliales intestinales.

5. CAPITULO 3 163

Extracellular vesicles of the probiotic Escherichia coli Nissle 1917 reduce PepT1 levels in IL-1β-treated Caco-2 cells via upregulation of miR-193a-3p

6. DISCUSIÓN 191

7. CONCLUSIONES 215

8. REFERENCIAS 221

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Interconexión entre la barrera epitelial intestinal y la inmunidad innata y adaptativa. 45
Figura 2. Distribución de la microbiota en el sistema gastrointestinal. 47
Figura 3. Interacción entre la microbiota y el epitelio intestinal: Receptores, reconocimiento celular y modulación inmune. 55
Figura 4. Estructura y Función de la Mucosa Gastrointestinal. 64
Figura 5. Complejos de Unión Intercelular en el Epitelio Intestinal. 66
Figura 6. Estructura de la mucosa intestinal en condiciones normales y durante la EII. . 68
Figura 7. Descripción esquemática de la biosíntesis de microRNA (miRNA) canónicos y no canónicos. 70
Figura 8. Funciones de TFF3 74
Figura 9. Representación Esquemática del Sistema Serotoninérgico Intestinal. 79
Figura 10. Disbiosis intestinal, respuesta inmune y su efecto en el aumento de 5H-T. ... 85
Figura 11. Mecanismo de Transporte de PepT1. 88
Figura 12. Modelo del papel de hPepT1 en la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD).91
Figura 13. Efecto antiinflamatorio de EcN sobre IEC en EII. 95
Figura 14. Las EVs bacterianas modulan el sistema inmunitario en condiciones de EII para mejorar la función de la barrera inmunitaria intestinal. 97
Figura 15. Composición y funciones de los EVs de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. 99
Figura 16. Resumen grafico de los aportes relevantes acorde con el **Capítulo 1** de esta tesis. 199
Figura 17. Resumen grafico de los aportes relevantes acorde con el **Capítulo 2** de esta tesis. 206
Figura 18. Resumen grafico de los aportes relevantes acorde con el **Capítulo 3** de esta tesis. 210
Figura 19. Resumen gráfico de los aportes relevantes de este trabajo de tesis. 213

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los PRR, según su localización, ligando y origen 43

Tabla 2. Células epiteliales intestinales: tipos, función y localización 62

Tabla 3. Posibles aplicaciones terapéuticas de las EVs en la EII. 101



1. INTRODUCCIÓN

1.1. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es una enfermedad heterogénea, crónica, recidivante y multifactorial que implica factores ambientales, estilos de vida, cambios en la respuesta inmune local y sistémica, cambios en la composición de la microbiota y desencadenantes ambientales en individuos con predisposición genética subyacente [1,2]. Las dos principales formas de EII son la enfermedad de Crohn (CD) y la colitis ulcerosa (UC). Ambas se caracterizan por la inflamación persistente en el lumen del sistema gastrointestinal, pero difieren en cuanto a la ubicación y la naturaleza de la inflamación. Mientras que la CD causa inflamación que puede afectar todo el grosor de la pared intestinal, lo que se conoce como afectación transmural, la UC se caracteriza por la inflamación de la mucosa y se limita al colon [3]. Tradicionalmente, EII se ha concebido como una afección prevalente en el mundo occidental. No obstante, datos recopilados en la última década revelan un notable incremento en la incidencia de la EII a nivel mundial. En el norte de Europa la CD tuvo una incidencia entre el 2010 y el 2019 de 6.3 por 100.000 en contraste en el sur de Europa cuya incidencia fue de 3,6 por 100.000 habitantes. Por su parte la incidencia de la UC en el norte y el sur de Europa fue de 11.4 y 8.0 respectivamente [4,5]. La prevalencia e incidencia de EII en adultos y niños ha aumentado en todo el mundo durante las últimas décadas, normalmente se presenta entre los 20 y 30 años y del 5 al 15% se diagnostica entre los 50 y 60 años, con una incidencia similar tanto en hombres como mujeres [6].

1.1.1. Patogénesis

Aunque la etiología de la EII sigue siendo en gran medida desconocida, implica una compleja interacción entre factores genéticos, ambientales, microbianos y las respuestas inmunitarias.

1.1.1.1. Predisposición genética

En la actualidad se dispone de más información sobre las implicaciones genéticas de la EII debido a los avances tecnológicos en el análisis y secuenciación del DNA,

principalmente los estudios de asociación del genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés) que identifican polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) [7].

El primer gen identificado que se relaciona con la susceptibilidad para la CD fue *NOD2*, que codifica el receptor que interactúa con el muramil dipéptido (MDP), un motivo conservado presente en el peptidoglicano de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. La activación de NOD2 por MDP induce la autofagia que controla la replicación bacteriana, la presentación de antígenos y modula respuestas inmunitarias innatas y adaptativas [8]. Las investigaciones recientes han identificado 163 SNP asociados a la EII, 110 asociados a ambas patologías, 30 son específicos de CD y solo 23 de la UC [9]. Se ha demostrado el papel de la autofagia en las respuestas inmunes en la EII. En este caso destacan genes como *ATG16L1* (esencial para todas las formas de autofagia) o *IRGM* (conduce a una reducción de la expresión de proteínas) [10,11]. Se sabe que las células epiteliales y las células dendríticas que contienen variantes *ATG16L1* y *NOD2* muestran defectos en la autofagia antibacteriana [10]. También se ha observado una fuerte asociación entre la EII y el gen *IL23R*, que codifica una subunidad del receptor de la citoquina proinflamatoria interleucina (IL)-23 y responsable de la activación de células Th17. La implicación del eje IL-23/Th17 está bien establecida en la patogénesis de la EII, habiéndose identificado los loci para los genes de susceptibilidad *IL23R*, *IL12B*, *JAK2* y *STAT3* tanto en UC como en CD [12,13]. Otros genes de susceptibilidad en EII que regulan la función inmunitaria son *CARD9, IL1R2, REL, SMAD3* y *PRDM1*. El aumento constante en la identificación de loci genéticos de susceptibilidad asociados con la EII demuestra que las influencias genéticas desempeñan un papel crucial en la patogénesis de esta enfermedad [14].

1.1.1.2. Factores Ambientales

Los factores ambientales predisponen a la patogénesis de la EII, entre ellos el tabaquismo, la dieta, las drogas, la geografía, el estrés social, entre otros. El tabaquismo es el indicador ambiental más estudiado y se ha demostrado que aumenta el riesgo de recaídas en la CD. Además, estos pacientes presentan desregulación significativa de su microbiota intestinal [15].

Recientemente se ha vinculado la deficiencia de vitamina D con la EII y la respuesta inmunológica. En un estudio con pacientes diagnosticados de EII se evidenciaron niveles bajos de vitamina D [16]. En modelos de ratones, la deficiencia de vitamina D se relaciona con mayor susceptibilidad a la colitis inducida por la sal sódica del sulfato de dextrano (DSS) [17]. Otro factor ambiental relacionado con la EII son los tratamientos farmacológicos. Algunos fármacos como la aspirina y los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos tienen un efecto sobre la aparición o recaída de la EII [18]. El uso de antibióticos también influye en el riesgo de EII a través de su efecto sobre la microbiota intestinal [19].

El estrés tiene un impacto en el sistema gastrointestinal y desempeña un papel importante en el desarrollo y exacerbación de la EII. Esta relación es compleja y puede variar de una persona a otra. Diversas investigaciones han demostrado que los individuos con niveles más bajos de estrés presentan un menor riesgo de padecer EII y menor número de recaídas sintomáticas [20] .

1.1.1.3. Respuesta Inmune

Los antígenos luminales entran en contacto inicialmente con la mucosa intestinal. En condiciones fisiológicas tanto la microbiota como antígenos de la dieta estimulan el tejido linfoide asociado al intestino (GALT), formado por las placas de Peyer, los ganglios linfáticos mesentéricos y los folículos linfoides dentro de la lámina propia. Tras la estimulación, las células GALT se activan y las moléculas reguladoras contrarrestan la inflamación local para mantener la homeostasis intestinal controlada (Figura 1) [21]. La desregulación del sistema inmunológico de las mucosas se ha asociado con la patogénesis de la EII [22,23]. Por su parte, la susceptibilidad genética y la exposición a factores ambientales favorecen la activación de la respuesta inmune frente a bacterias, quienes atraviesan el epitelio intestinal y entran en contacto con el sistema inmune debido al daño ocasionado en la barrera epitelial intestinal [24].

Los estudios para entender la patogénesis de la EII confirman que la alteración de la respuesta inmune innata y adaptativa contribuyen a una respuesta inflamatoria intestinal anormal en esta enfermedad. En la CD, está mediada por la respuesta Th1,

mientras que, en la UC, se ha asociado a la activación de Th2. También se han analizado otros componentes como la integridad de la barrera epitelial, la detección de microorganismos por el sistema inmune innato, la autofagia y la activación de las vías de señalización [25].

- *Inmunidad innata*

La inmunidad innata intestinal es ejercida por neutrófilos, monocitos, macrófagos y células dendríticas, células linfoides innatas y células *Natural Killer* (NK). Estas células se caracterizan por su capacidad de producir una reacción rápida e inespecífica como constituyentes de la primera línea de defensa. Las células inmunitarias innatas defienden el epitelio intestinal de microorganismos patógenos y preservan la tolerancia inmunitaria frente a la microbiota intestinal. Su desequilibro favorece el desarrollo de EII [26]. Su activación se desencadena mediante el reconocimiento de antígenos microbianos, mediado por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs). Estos receptores, detectan patrones moleculares propios de microbios (MAMPs) y de patógenos (PAMPs) como LPS, peptidoglicano, DNA, lipoproteínas, carbohidratos, así como otras estructuras (Tabla 1). Entre ellos destacan los receptores Toll-like (TLR). Los receptores TLR son proteínas transmembrana localizadas en la membrana celular que reconocen componentes extracelulares de bacterias, virus u hongos. Los TLR intracelulares, por otro lado, se encuentran principalmente en las membranas de endosomas y lisosomas, donde reconocen DNA o RNA microbiano internalizado. Otros receptores PRRs son citosólicos. Este grupo incluye las proteínas con dominio de oligomerización por unión a nucleótidos 1 (NOD1) y NOD2 que son activadas por fragmentos de peptidoglicano bacteriano. Tras su activación los PRRs desencadenan una cascada intracelular con aumento en la secreción de citocinas y quimiocinas que conllevan a la activación y producción de mediadores proinflamatorios [27].

Se sabe que los PRRs se expresan en varios tipos celulares, incluidas las células epiteliales intestinales (IEC), monocitos, macrófagos o células dendríticas, y además se encuentran significativamente alterados en la EII [26,28]. En este contexto, se ha demostrado que las mutaciones en NOD2 que alteran su función, limitan la respuesta

intestinal frente al peptidoglicano [29]. Diversos estudios sugieren que la pérdida de función de NOD2 lleva a la desregulación de TLR2, lo que conduce a la activación de vías inflamatorias y respuestas Th-1 excesivas. La deficiencia en NOD2 se ha relacionado también con alteraciones en la función de la barrera epitelial derivadas de la incapacidad de producir péptidos antibacterianos (criptidinas), lo que facilita la entrada de productos microbianos y disminuye la resistencia a la infección e invasión por parte de patógenos [30].

La señalización de TLRs, se divide en dos tipos de vías. Una de las vías necesita de la proteína adaptadora (TIRAP) que contiene el dominio del receptor Toll-1 (TIR), una proteína cinasa y un factor de transcripción para transferir la señal. Es dependiente de MyD88 para activar NF-κB y MAPK (proteína cinasa activada por mitógenos) para controlar la respuesta inflamatoria. La proteína TIRAP es la que recluta a MyD88 y se encuentra en la vía de señalización de TLR1, TLR2, TLR4 y TLR6. Por su parte, la otra vía es independiente de MyD88 e involucra a la proteína TRIF que forma parte de las vías de señalización de TLR3 y TLR4 [31]. En individuos sanos, los TLRs presentan una expresión reducida en comparación con los pacientes con EII, respaldando su papel en el desarrollo de la respuesta inflamatoria exacerbada [28].

Tabla 1. Clasificación de los PRR, según su localización, ligando y origen

Receptor	Localización	Ligando	Origen del ligando
		Receptores Toll-like (TLR)	
TLR1	Membrana plasmática	Lipoproteínas triaciladas	Bacterias
TLR2	Membrana plasmática	Lipoproteína	Bacterias, virus, parásitos
TLR3	Endolisosoma	dsRNA	Virus
TLR4	Membrana plasmática	LPS	Bacterias, virus, parásitos
TLR5	Membrana plasmática	Flagelina	Bacterias
TLR6	Membrana plasmática	Lipoproteínas diaciladas	Bacterias, virus
TLR7/8	Endolisosoma	ssRNA	Virus
TLR9	Endolisosoma	CpG-ADN	Bacterias, virus
TLR10	Endolisosoma	Desconocido	Desconocido
TLR11	Membrana plasmática	Molécula similar a la profilina	Protozoos
		Receptores tipo NOD (NLR)	
NOD1	Citoplasma	iE-DAP	Bacterias
NOD2	Citoplasma	MDP	Bacterias

Esta tabla resume los principales PPRs encontrados en células humanas según su localización, ligando y origen. Extraído de la cita [27].

TLR2 forma heterodímeros con TLR1 o TLR6 para transmitir la señal. El heterodímero TLR2/6 reconoce lipopéptidos diacilados, mientras que TLR1/2 puede reconocer lipopéptidos triacilados [27]. La inhibición de la señalización de TLR2/6 desempeña un papel beneficioso al ralentizar la progresión de la EII. En modelos *in vivo* e *in vitro* la estimulación de TLR2/6 en células dendríticas se asoció con respuestas inmunes supresoras [32]. En otro estudio, la activación de TLR6 estimuló las respuestas Th1 y Th17, en pacientes con EII y generó mayor cronicidad en la colitis experimental de ratones [33]. Por su parte TLR4, induce una respuesta inflamatoria que en algunas ocasiones proporciona protección contra las bacterias invasoras y promueve la integridad de la mucosa y a su vez está implicado en la ulceración de los tejidos. Se ha demostrado su elevada expresión en pacientes con UC [34].

Los macrófagos y las células dendríticas son células presentadoras de antígenos que pueden activar la respuesta inmune tras la secreción de citocinas proinflamatorias (IL-6, IL-10, IL-12, IL-23, factor de crecimiento transformante (TGF) β o factor de necrosis tumoral (TNF) α). Por su parte las células dendríticas son esenciales para comunicar las respuestas inmunes innatas y adaptativas presentando los antígenos en los ganglios linfáticos mesentéricos, donde tiene lugar la diferenciación de linfocitos T vírgenes [35].

- *Inmunidad Adaptativa*

La inmunidad adaptativa es específica y dependiente de las células activadas. Los linfocitos T $CD4^+$ proliferan en tejidos linfoides secundarios y se diferencian en células T colaboradoras (Th) en presencia de antígenos y citocinas. Th1, Th2, Treg y Th17 son los subtipos principales. Por ejemplo, Th1 se diferencia después de la exposición a IL-12 secretado por células dendríticas. Esto lleva a la activación de citocinas efectoras como IL-6, TNF-α e IFN-γ, que están directamente implicados en la fisiopatología de la EII. La maduración de las células Th2 se debe principalmente a la secreción de citoquinas por parte de los macrófagos y su activación está relacionada con la UC [23,36].

El desequilibrio entre las citoquinas liberadas por Th1 y Th2 en la mucosa intestinal determina la intensidad y duración de la respuesta inflamatoria en la colitis experimental. Por ejemplo, la IL-12 induce la respuesta Th1 y desencadena la producción de IFN-γ,

mientras que la activación de las células Th2 lleva a liberar IL-4, IL-5 e IL-13. La desregulación de la respuesta inmune Th1 induce la inflamación intestinal en pacientes con CD, asociada con una respuesta de IFN-γ dirigida por IL-12. Por su parte, en la UC las células NK expresan mayores niveles de IL-13 por activación de la respuesta Th2 con respecto a los pacientes con CD [23]. Sin embargo, se ha demostrado que la IL-13 en la colitis experimental tiene un efecto antiinflamatorio [37]. La CD se caracteriza por una respuesta inmune Th1, mientras que la UC se considera como una enfermedad mediada por Th2 [38].

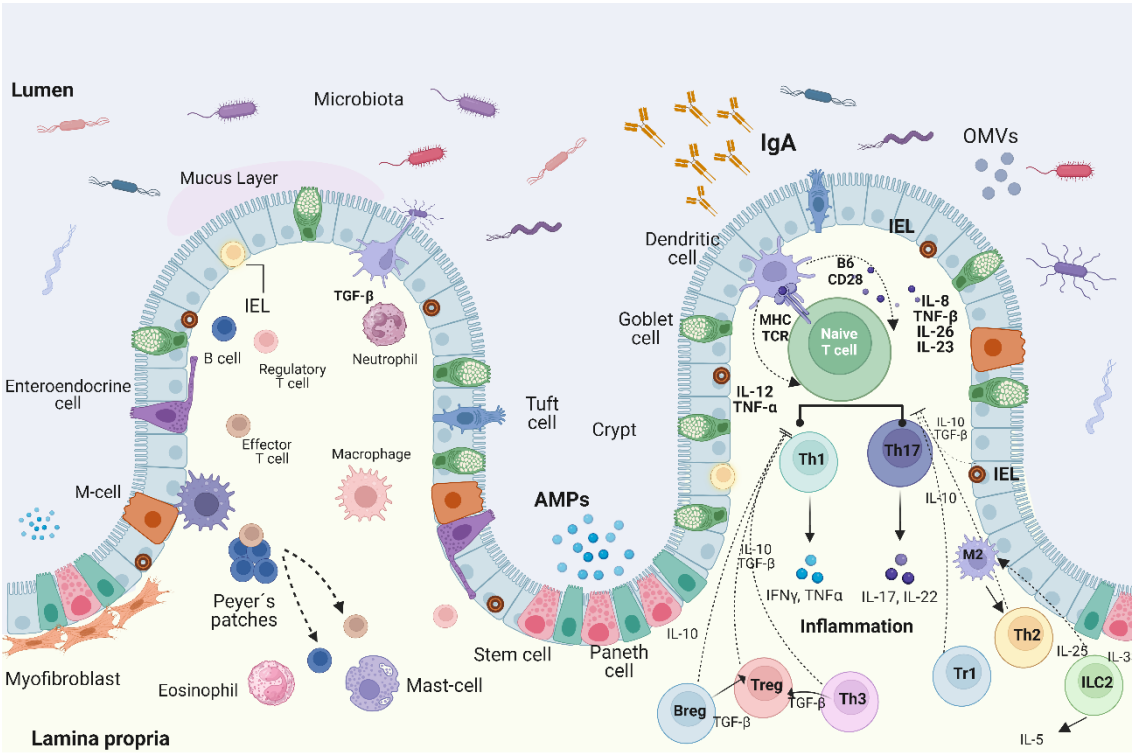


Figura 1. Interconexión entre la barrera epitelial intestinal y la inmunidad innata y adaptativa.

La microbiota, ubicada en la proximidad del epitelio intestinal, desempeña un papel central en la prevención de enfermedades intestinales al mantener la homeostasis de la mucosa. Esta función se ve respaldada por la robustez de la barrera epitelial intestinal, que actúa como primera línea de defensa contra patógenos mediante complejos mecanismos como uniones estrechas, secreción de mucus, y producción de IgA secretora (sIgA) y péptidos antimicrobianos (AMPs) por las células plasmáticas y las células de Paneth, respectivamente. La respuesta inmune innata, caracterizada por el reclutamiento y la activación de diversos tipos celulares (macrófagos, células dendríticas (Dc) y células linfoides innatas (ILC)), colabora en la detección y eliminación de amenazas. Las células reguladoras inmunes (M2, DCs CD103+, ILC3 e ILC2) desempeñan roles cruciales al modular la inflamación y promover la diferenciación de células T reguladoras (Treg), cuya función supresora es vital para mantener la tolerancia inmunológica. Esta intrincada red de interacciones y regulaciones garantiza la homeostasis intestinal y previene el desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas y tumores asociados al intestino. **Ilustración propia creada con biorender.com y adaptado de Peterson et al.** [39]

Las células Th17 por su parte, son un subconjunto de células T caracterizadas por la producción de grandes cantidades de IL-17, IL-21 e IL-22. Son inducidas por una combinación de IL-6 y TGF-β, y su expansión es promovida por IL-23. En la EII, la activación excesiva de Th17 desencadena una respuesta inmunitaria inapropiada y crónica generando una inflamación persistente. Se han detectado altos niveles de transcripción de IL-17A en la mucosa de pacientes con CD y UC en comparación con el intestino normal [40,41]. La IL-17 y la IL-22 producidas por estas células, inician y amplifica la señal inflamatoria local y promueven la activación de mecanismos contrarreguladores dirigidos a las IEC [23]. Así mismo, IL-23 estimula la producción de IFN-γ y contribuye al aumento de la inflamación presente en la EII [42]. Finalmente, las células Treg se diferencian tras la exposición a IL-10 y TGF-β (Figura 1) [36].

1.1.1.4. Microbiota

Microbiota Intestinal humana

El tracto gastrointestinal humano se divide en: (i) tracto gastrointestinal superior constituido por la boca, el esófago, el estómago, el duodeno, el yeyuno y el íleon (intestino delgado), y (ii) el sistema gastrointestinal inferior formado por el colon, el recto y el ano (intestino grueso). Su función principal es la digestión y absorción de nutrientes [43]. El tracto gastrointestinal esta colonizado por cientos de billones de microorganismos tales como bacterias, virus, hongos y eucariotas unicelulares que en su conjunto conforman la microbiota intestinal. Esta comunidad microbiana está formada de aproximadamente 1.150 especies bacterianas y cada huésped individual tiene aproximadamente 160 especies, [44,45]. Su composición difiere entre individuos, siendo los filos bacterianos predominantes Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria y Actinobacterias y además se ve fuertemente influenciada por los nutrientes, así como por componentes inmunológicos (Figura 2) [46].

La microbiota intestinal desempeña múltiples funciones beneficiosas a nivel fisiológico. Es esencial para el desarrollo inmunológico del huésped y la modulación de la barrera epitelial intestinal y las respuestas inmunes y de defensa [47]. Un desequilibrio en

la composición y diversidad de la microbiota desencadenan la disbiosis intestinal y puede alterar las respuestas equilibradas del huésped y contribuir al desarrollo de diferentes enfermedades, como el cáncer, trastornos autoinmunes, metabólicos o neurológicos. Se ha demostrado que tiene un rol importante en la patogénesis de la EII [48].

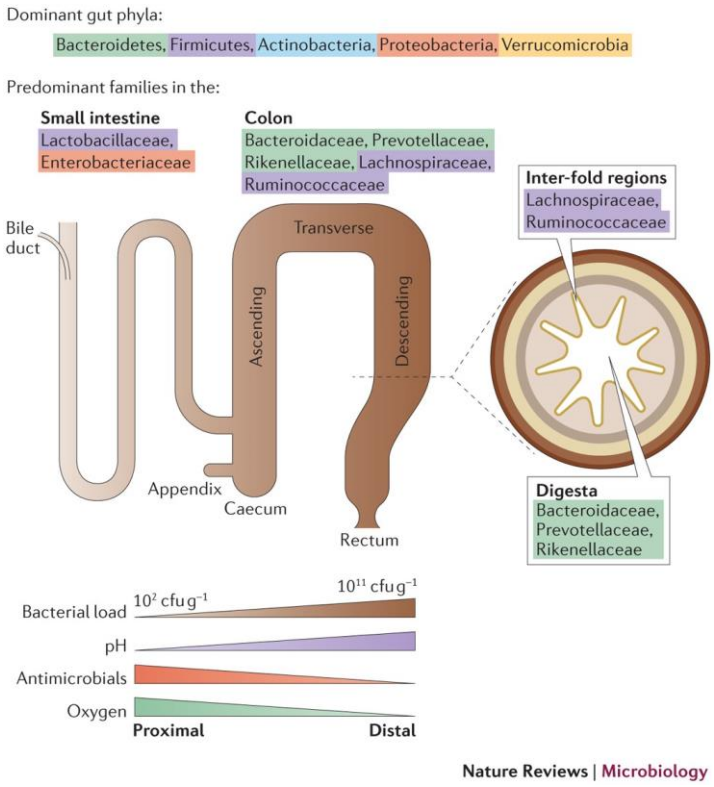


Figura 2. Distribución de la microbiota en el sistema gastrointestinal.
En el intestino delgado, destacan Lactobacillaceae y Enterobacteriaceae, mientras que el colon se caracteriza por la presencia de especies de las familias Bacteroidaceae, Prevotellaceae, Rikenellaceae, Lachnospiraceae y Ruminococcaceae. Las diferencias en la densidad bacteriana se atribuyen a factores como el oxígeno, péptidos antimicrobianos y pH. En una sección transversal del colon, Bacteroidaceae, Prevotellaceae y Rikenellaceae dominan, mientras que Lachnospiraceae y Ruminococcaceae ocupan regiones específicas. Los colores corresponden a los filos relevantes. UFC: unidades formadoras de colonias. Tomado de Donaldson et al. [49]

Las funciones de la microbiota intestinal se clasifican en cuatro categorías principales: función protectora y antimicrobiana, función metabólica, función inmunológica y función de barrera estructural y epitelial.

1.1.1.4.1. Funciones de la Microbiota

- *Función protectora y antimicrobiana*

La microbiota intestinal y sus productos metabólicos desempeñan un papel fundamental en la protección del huésped contra la invasión y colonización de microorganismos patógenos mediante diversos mecanismos [50]. En primer lugar, la microbiota intestinal compite con los patógenos por el espacio, los nutrientes esenciales y factores de crecimiento en el intestino, limitando así su capacidad de crecimiento y adherencia al epitelio [51,52]. Por otro lado, la microbiota intestinal sintetiza diversos componentes, como ácidos grasos de cadena corta, ácido láctico, peróxido de hidrógeno y péptidos antimicrobianos (AMPs) que interfieren en el crecimiento de determinados microorganismos [53]. Por ejemplo, el ácido butírico inhibe el crecimiento de *Clostridium difficile* [54].

Los péptidos antimicrobianos (AMP), también llamados bacteriocinas, son péptidos pequeños y termoestables producidos para competir con otras bacterias e inhibir el desarrollo de los patógenos a través de una acción directa, neutralizando su crecimiento (efecto bacteriostático) o su viabilidad celular (efecto bactericida) [55]. Las bacteriocinas se clasifican: (i) microcinas y colicinas, que son bacteriocinas secretadas por enterobacterias, con pesos moleculares bajos y altos, respectivamente; y (ii) lantibióticos, que son bacteriocinas secretadas por bacterias Gram-positivas [56].

Otro mecanismo que ha desarrollado la microbiota intestinal es prevenir el crecimiento excesivo de cepas patógenas induciendo la síntesis y liberación de proteínas con actividad antibacteriana por parte de células específicas del huésped, como las células de Paneth, a través de la activación de PRRs, aunque algunas se expresan de forma constitutiva [57]. Estas proteínas pertenecen a diversas familias, entre las que destacan las defensinas, catelicidinas, lectinas tipo C y la lipocalina 1 [58]. Estas proteínas secretadas por el epitelio son retenidas en la capa de mucus limitando el acceso de los microorganismos hacia el epitelio [59]. Entre las cepas comensales, *Bacteroides* y *Lactobacillus* son géneros clave en el contexto de protección antimicrobiana [60,61].

Otra proteína con función protectora que previene el crecimiento excesivo de cepas patógenas y limita el acceso de las bacterias al epitelio es la producción local de la inmunoglobulina A2 secretora (sIgA2) [62]. Las células dendríticas son capaces de reconocer las bacterias en la superficie e inducir la diferenciación de células B plasmáticas productoras de IgA [63], las cuales secretan dímeros de IgA que acceden al lumen intestinal y recubren a los microorganismos [64]. Este mecanismo restringe la translocación de microbios intestinales desde la luz intestinal a la circulación y, por lo tanto, previene una respuesta inmune sistémica [57,65].

- *Función Metabólica*

La microbiota intestinal interviene en los diferentes procesos metabólicos que influyen directamente en el aprovechamiento de los nutrientes, la regulación del peso corporal y la homeostasis energética. Dentro de estos procesos, los metabolitos microbianos producidos por la microbiota, influyen tanto en la comunidad microbiana como en la homeostasis del huésped [66]. La microbiota intestinal realiza esta función mediante dos mecanismos principales: la digestión y fermentación de componentes de la dieta que el hospedero no puede asimilar, y la influencia en el metabolismo de los lípidos, los carbohidratos y las proteínas [67]. A continuación, se describen algunas de las funciones metabólicas clave de la microbiota intestinal:

Fermentación de fibras no digeribles: La microbiota fermenta fibras y otros carbohidratos no digeribles por el huésped, como la fibra, los almidones resistentes y los polifenoles, produciendo ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) como acetato, propionato y butirato, así como vitaminas y otros metabolitos que pueden ser absorbidos y utilizados por el hospedero [68]. Los SCFAs más abundantes y mejor estudiados son el acetato, el propionato y el butirato, los cuales son utilizados como fuente de energía por las IECs [69,70] y también son reconocidos como mediadores metabólicos e inmunológicos con propiedades antiinflamatorias a nivel de células T, neutrófilos y macrófagos [71–74]. El butirato es el principal sustrato energético a nivel del colon, y es esencial para su mantenimiento y función [75].

Los SCFAs pueden modular la actividad de las IECs, inhibiendo la producción de sustancias proinflamatorias, como TNF-α o IL-6 [74,76], y estimulando la producción de sustancias antiinflamatorias, como IL-10 [77,78] o TGF-β [76]. Se ha demostrado que los SCFAs ejercen sus efectos inmunomoduladores a través de la activación de receptores como GPCR41 y GPCR43 presentes en las células epiteliales intestinales [79]. La unión de los SCFAs a estos receptores desencadena una serie de eventos intracelulares a través de rutas de señalización, que conducen a la activación de cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la posterior producción de quimiocinas y citocinas [80].

Metabolismo de proteínas y aminoácidos: Estudios recientes han demostrado que, a nivel del colon humano, existe una elevada diversidad microbiana con una gran variedad de actividades proteolíticas que se encargan de degradar tanto las proteínas provenientes de la dieta como las proteínas endógenas producidas por el huésped [81]. El resultado de este proceso es la formación de péptidos, aminoácidos y compuestos nitrogenados, que pueden tener un impacto significativo a nivel fisiológico. Las principales bacterias proteolíticas pertenecen principalmente a los géneros *Bacteroides, Clostridium, Propionibacterium, Fusobacterium, Streptococcus* y *Lactobacillus* [82]. Asimismo, la microbiota intestinal puede degradar, absorber y sintetizar algunos aminoácidos que el organismo no puede producir o que tiene en déficit, como la alanina, arginina, cisteína, glutamina, glicina, histidina, prolina, serina y tirosina. La degradación de aminoácidos por las bacterias intestinales se asocia con un aumento de las concentraciones de ácidos grasos de cadena ramificada, fenol, derivados del indol y amoníaco [83].

Síntesis de vitaminas: Algunas cepas de la microbiota intestinal tienen la capacidad de sintetizar vitaminas esenciales, como la vitamina K [84], necesaria para la coagulación sanguínea y hasta 8 vitaminas del complejo B, como la B12, que es importante para el metabolismo de proteínas y participa en la formación de glóbulos rojos y en el mantenimiento del sistema nervioso [85]. Estas vitaminas son imprescindibles para el funcionamiento de diversas reacciones metabólicas. Las principales bacterias relacionadas con la biosíntesis *de novo* de vitaminas corresponden a bacterias ácido-lácticas (BAL) presentes en los alimentos [86] y bacterias comensales del intestino

humano, pertenecientes al género *Bifidobacterium* (e.g. *Bifidobacterium bifidum y Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) [85,87].

Metabolismo de Lípidos: La microbiota intestinal tiene la capacidad de intervenir en el metabolismo de los lípidos que el huésped consume o produce, modulando su absorción, su almacenamiento y su degradación [88]. La microbiota intestinal realiza esta función mediante tres mecanismos principales: la hidrólisis de los triglicéridos, la síntesis de ácidos grasos de cadena corta y la regulación de la expresión de genes y hormonas implicados en el metabolismo lipídico [67]. Entre los géneros bacterianos más implicados en el metabolismo lipídico se encuentran *Bacteroides*, *Bifidobacterium* y *Clostridium*, que poseen diversas enzimas capaces de hidrolizar y oxidar los lípidos [89–91].

La microbiota intestinal produce enzimas, como las lipasas y las esterasas, que hidrolizan los triglicéridos en ácidos grasos y glicerol, liberando ácidos grasos libres y monoglicéridos. Estos productos pueden ser absorbidos por las células epiteliales del intestino o utilizados por la propia microbiota como sustratos energéticos [92]. También se ha demostrado que la microbiota intestinal puede alterar el metabolismo de los lípidos, afectando a la síntesis, absorción y oxidación de los ácidos grasos, así como la regulación de colesterol y triglicéridos [93]. Además, tiene la capacidad de modular la expresión de genes y hormonas relacionados con este proceso, afectando la absorción, almacenamiento y consumo de grasas [92]. Este control extenso se refleja en sus efectos sobre el equilibrio energético, apetito, sensibilidad a la insulina y el riesgo de desarrollar condiciones como obesidad, diabetes y otras enfermedades metabólicas [92,94].

Los ácidos biliares también son metabolizados por la microbiota, que los convierte en metabolitos secundarios. Los ácidos biliares son moléculas que se producen en el hígado a partir del colesterol, se almacenan en la vesícula biliar y tienen efectos sobre la absorción intestinal de lípidos, la regulación del colesterol, la inflamación y el cáncer de colon. Los ácidos biliares son esenciales para la digestión y la absorción de grasas, colesterol y vitaminas liposolubles [95–97]. La microbiota intestinal tiene la capacidad de modificar la estructura y la función de los ácidos biliares, generando una gran variedad de derivados (30 ácidos biliares diferentes). Los ácidos biliares se clasifican en primarios y

secundarios, según su origen y su estructura. Los ácidos biliares primarios son el ácido cólico y el ácido quenodesoxicólico, que se sintetizan en el hígado [95]. Los ácidos biliares secundarios son el ácido desoxicólico y el ácido litocólico, que se forman por la modificación enzimática de los ácidos biliares primarios por parte de la microbiota intestinal, mediante procesos de desconjugación, deshidroxilación, deshidrogenación y epimerización [95,96]. Estas modificaciones alteran las propiedades fisicoquímicas, biológicas y fisiológicas de los ácidos biliares, afectando a su solubilidad, su afinidad por los receptores, su actividad antimicrobiana y su recirculación enterohepática [97].

Ya que los ácidos biliares presentan actividad antimicrobiana, en función de la cantidad y el tipo de bilis liberada en el intestino, influyen en la composición de la microbiota intestinal favoreciendo o limitando el crecimiento de ciertos géneros bacterianos. Niveles bajos de sales biliares favorecen la proliferación de bacterias Gram-negativas (incluido bacterias entéricas patógenas), mientras que niveles elevados de sales biliares favorecen la proliferación de bacterias Gram-positivas, y reducción de las bacterias Gram-negativas, como las del género *Bacteroides* [98].

Otros nutrientes: la microbiota intestinal puede producir o aumentar la biodisponibilidad de otros nutrientes, como las poliaminas, que son moléculas que intervienen en la proliferación y diferenciación celular, y los minerales, como el hierro, calcio, magnesio, cobre y zinc, que son necesarios para el mantenimiento de la estructura y función de las células y los tejidos [99,100].

- *Función protectora de la barrera epitelial*

La microbiota intestinal desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal, que es esencial para prevenir la translocación bacteriana y sus toxinas [50,59]. Los mecanismos mediante los cuales la microbiota mejora la función de la barrera intestinal incluyen la regulación de proteínas de unión estrecha [101] y la prevención de la apoptosis de las células epiteliales intestinales, fortaleciendo así la barrera física del intestino [102]. Además, la microbiota está involucrada en el desarrollo de la microvasculatura intestinal al inducir la expresión del factor de transcripción angiogenina-3, que es un potente estimulador de nuevos vasos

sanguíneos a través del proceso de angiogénesis. Este efecto contribuye a la función de barrera asegurando una adecuada irrigación sanguínea y nutrientes a las células intestinales [103].

Se ha descrito que ciertos microorganismos presentes en la microbiota, como *E. coli* Nissle, secretan proteínas como TcpC, que inducen la expresión de proteínas de unión estrecha como claudina-14, fortaleciendo así la barrera epitelial y protegiendo contra la permeabilidad intestinal aumentada [101]. Además, la microbiota puede secretar proteínas que interfieren con las vías de señalización de citoquinas proinflamatorias y previenen la apoptosis de las IEC inducida por citoquinas, evitando así la ruptura de la barrera. Algunos microorganismos, como *Akkermansia muciniphila,* han sido asociados con niveles incrementados de endocannabinoides, los cuales regulan diversas funciones de la barrera intestinal, incluyendo la motilidad intestinal y la permeabilidad de la barrera. Por este mecanismo disminuyen la endotoxemia metabólica [104].

Por otro lado, en condiciones experimentales empleando modelos de IECs, se ha observado que algunas cepas de la microbiota inducen la expresión de β-defensina-2 humana (HBD-2). Esta inducción a su vez regula al alza la expresión de las mucinas MUC2 y MUC3, lo que contribuye significativamente a la formación y mantenimiento estructural de la capa de mucus [105].

- *Función inmunológica*

La microbiota intestinal establece una compleja red de comunicación dinámica y bidireccional con el sistema inmunológico del huésped. Desde el nacimiento hasta la madurez, las bacterias intestinales participan en el desarrollo y funcionamiento del sistema inmunitario intestinal. Esta relación simbiótica es crucial, ya que la microbiota no solo coexiste con el huésped, sino que también es un componente esencial para la regulación del sistema inmune, y su influencia se ejerce a través de varios mecanismos: facilita el desarrollo de tejidos inmunitarios, modula las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas para mantener un equilibrio entre la defensa contra patógenos y la tolerancia a microorganismos beneficiosos, y promueve la producción de IgA secretora para neutralizar patógenos. Además, las células dendríticas (DCs) en la lámina propia ayudan a

inducir la tolerancia inmunológica y mantener un estado antiinflamatorio, previniendo así enfermedades autoinmunes y crónicas. Estos mecanismos resaltan la importancia de una microbiota equilibrada para la homeostasis inmunológica y, en general, para mantener el equilibrio entre la salud y la enfermedad [106].

La microbiota intestinal es fundamental para el desarrollo y la maduración del sistema inmunológico intestinal. Estimula el desarrollo y la diferenciación de las células GALT, que constituye la mayor parte del sistema inmunológico del organismo. Además, modula la tolerancia activando la inmunidad innata y adaptativa frente a los patógenos. En este contexto, se ha demostrado que la microbiota intestinal favorece la diferenciación de las subpoblaciones de células T, las cuales tienen distintas funciones en la protección frente a la infección, reparación de tejidos, inflamación y tolerancia inmunológica. La microbiota induce las respuestas de las células T colaboradoras (Th, T helper), incluyendo Th1 (inmunidad proinflamatoria y protectora contra patógenos), Th2 (reparación contra nematodos dañinos para los tejidos), Th22 (protección de los tejidos), Th17 (respuesta proinflamatoria y antimicrobiana) y Treg (respuestas tolerogénicas) [52,107]. Las células Treg son esenciales para la homeostasis intestinal, interactuando con la microbiota para proteger contra la inflamación y promover la tolerancia inmunológica. El polisacárido A (PSA) y los SCFAs son ejemplos de cómo la microbiota puede influir en la activación de las poblaciones Treg [108]. Estudios en ratones han demostrado que el PSA de *B. fragilis* protege contra la colitis mediante la señalización de TLR2, limitando respuestas Th17 e induciendo la activación de Treg, que liberan IL-10 [109]. Además, se ha observado que la microbiota intestinal puede modular el cambio de clase de sIgA por medio de respuestas de células T reguladoras específicas para comensales. Este mecanismo adicional resalta la interacción compleja entre la microbiota y el sistema inmune [110]. En este contexto, estudios realizados en ratones libres de gérmenes han mostrado que la reintroducción de la microbiota intestinal de ratones colonizados en estos animales mejora sus respuestas inmunológicas y reduce la inflamación. Además, se ha demostrado que los ratones libres de gérmenes tienen niveles más altos de corticosterona en comparación con los ratones con una microbiota equilibrada [111,112].

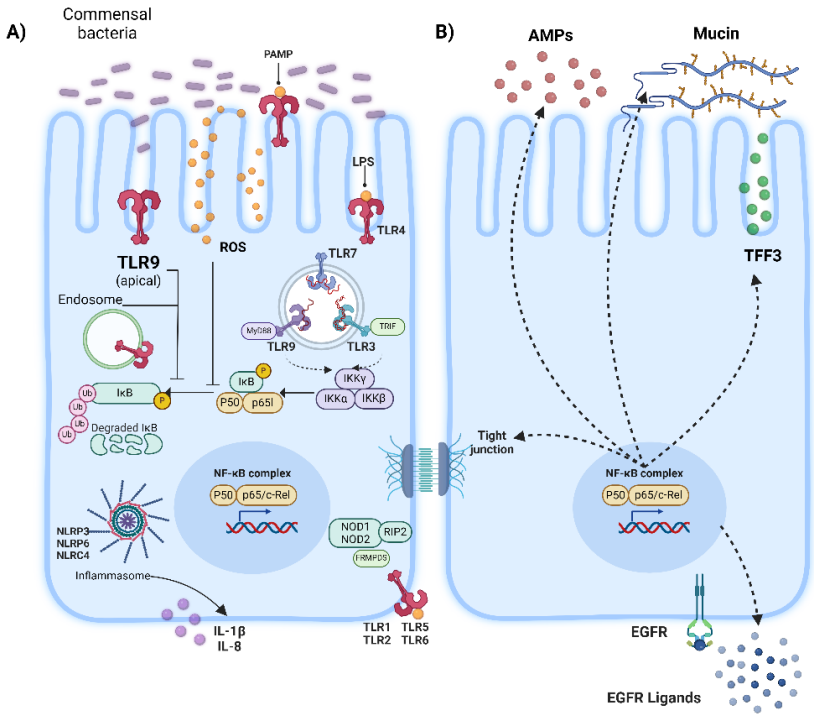


Figura 3. Interacción entre la microbiota y el epitelio intestinal: Receptores, reconocimiento celular y modulación inmune.

(A) *Los receptores TLR y NOD expresados en las IEC reconocen motivos moleculares específicos de bacterias comensales y patógenos, activando vías de señalización que involucran a MYD88 y TRIF, así como moléculas como NF-κB.* ***(B)*** *La integración de este reconocimiento por parte de las IEC desencadena la liberación de factores relacionados con la reparación, fortalecimiento de la función de barrera y regulación inmune (TFF3, EGFR, IL-25, TGFϐ- y, etc).* ***Abreviaturas:*** *EGFR, Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico; MYD88, Respuesta Primaria de Diferenciación Mieloide 88; TRIF, Adaptador Conteniendo el Dominio TIR que Induce Interferón-ϐ; ROS, Especies Reactivas de Oxígeno; IκB, Inhibidor de κB; NLRP, Contenido del dominio de unión a nucleótidos y repetición rica en leucina con dominio pirina.* **Ilustración propia creada con biorender.com y adaptado de Peterson et al.** [39]

La microbiota intestinal y la respuesta inmune innata están estrechamente interconectadas. Conjuntamente con el epitelio intestinal crean una barrera física y bioquímica que actúa como la primera línea de defensa del huésped contra las infecciones, al tiempo que la microbiota promueve la tolerancia inmunológica y previene la inflamación desregulada. Los microorganismos de la microbiota intestinal interactúan con el sistema inmune innato a través de los receptores PRRs, como TLRs y proteínas NOD. La interacción de los PRRs con sus ligandos específicos inicia una cascada de señalización que lleva a la activación de factores de transcripción (NF-kappaß y otros) (Figura 3a). Estos factores estimulan la secreción de citocinas y quimioquinas que actúan como sensores

generando la respuesta innata y adaptativa, una mayor producción de mucina y péptidos antimicrobianos (AMPs) que ayudan a controlar la población microbiana intestinal, modular la apoptosis, así como las respuestas inmunorreguladoras mediadas por las diversas moléculas generadas (Ver Figura 3b) [60].

1.1.1.4.2. La microbiota y su rol en la patogénesis de la EII

Las alteraciones en la microbiota intestinal han estado implicadas en la patogénesis y el desarrollo de muchas enfermedades, especialmente en la EII [113]. La composición de la microbiota está modulada por el perfil genético del huésped, y se dispone de evidencias que una respuesta inmunitaria desregulada del huésped a los componentes de la microbiota tiene un efecto directo en esta patología [114]. En los pacientes con CD existe una disminución de la diversidad bacteriana, acompañado de un aumento en la abundancia de Bacteroidetes y Proteobacterias [114–116]. En la UC se ha reportado una reducción de *Clostridium spp.* y un aumento de *E. coli* adherente-invasiva (AIEC) [117]. De hecho, la presencia de ambas especies son un indicador de disbiosis en pacientes con EII [118,119]. Se ha demostrado en modelos *in vitro* (células Caco-2 y HT-29-19A) que *E. coli* AIEC estimula la regulación transcripcional positiva de los TLR, con inducción de una respuesta inflamatoria leve [120]. Además, reduce la proliferación de las células HT-29 [121]. Por su parte *E. coli* O157 enterohemorrágica estimula TLR5 y la vía de señalización del complejo TLR4/MD-2 para aumentar la producción de IL-8 en IEC, exacerbando así la EII [122].

En la EII destaca también la disminución en las poblaciones de anaeróbios obligados, incluido *Faecalibacterium prausnitzii,* quien cuenta con propiedades antiinflamatorias y también *Roseburia intestinalis*. Ambos están específicamente asociados con la producción de SCFAs. La disminución de SCFAs tiene un efecto negativo en la proliferación celular y la respuesta inmunitaria [123,124]. Además, los niveles disminuidos de butirato aumentan la producción de células Treg, disminuyen la actividad antibacteriana de los macrófagos y agravan la colitis [125,126]. Por su parte, el polisacárido capsular PSA, producido por *Bacteroides fragilis* suprime la producción de IL-17 y mejora la colitis experimental [127].

En la actualidad existe evidencia científica sobre el papel de los patobiontes en el aumento de la permeabilidad intestinal y regulación de la expresión de genes inflamatorios, que conducen a la alteración del entorno gastrointestinal, promoviendo la disbiosis, alteración del sistema inmune, perdida de la integridad de la capa de mucus y finalmente una inflamación crónica con una respuestas inmunitaria aberrante [128]. En consecuencia, se han desarrollado diversas terapias dirigidas a la microbiota para restaurar la salud del microbioma alterado [129,130]. La mejoría observada en estos pacientes después de la modificación de la microbiota mediante trasplante fecal o el uso de probióticos o postbióticos para reducir la inflamación, respaldan su implicación en el desarrollo de esta enfermedad. Además, sugiere que estas estrategias podrían ser una alternativa segura para el tratamiento de pacientes con EII en la fase inflamatoria aguda [125,131,132].

1.1.2. Diagnóstico

Los principales procedimientos utilizados para establecer un diagnóstico preciso en los pacientes con EII son invasivos e incómodos para la mayoría de los pacientes. Los pacientes con CD presentan a nivel intestinal eritema, patrón vascular alterado, friabilidad, granularidad y pequeñas úlceras superficiales. En la inflamación grave se observan ulceraciones profundas a través de la capa muscular, desprendimientos de mucosa o ulceración limitada a la submucosa [133]. Por su parte, la UC durante la inflamación leve se caracteriza por presentar edema, eritema y vascularización anormal y en los casos más severos aparece como ulceraciones confluentes y empeoramiento de la friabilidad del epitelio [134].

Debido a la necesidad de emplear métodos no invasivos y de uso práctico para diagnosticar la EII, controlar la inflamación y determinar la eficacia de la terapia, se han investigado métodos de imagen como la resonancia magnética nuclear y la tomografía computarizada entre otras [135,136]. También se ha logrado un gran avance en el desarrollo de nuevos biomarcadores para el diagnóstico y seguimiento de la EII. Son diversos los biomarcadores serológicos de inflamación, entre ellos la proteína C reactiva (PCR) [137], los anticuerpos anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) y los anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos perinucleares (p-ANCA) [138]. Las citocinas proinflamatorias

como TNF-α se pueden encontrar en niveles elevados en el tracto gastrointestinal de los pacientes con colitis y tiene un papel importante en la EII, así como IL-6, IL-8, IL-10, IL-17 e IL-22 [139,140]. Las citoquinas IL-10 e IL-22 presentan concentraciones más altas en pacientes activos con UC y CD [141]. Un biomarcador relevante en la EII es la enzima oxido sintasa inducible (iNOS), un mediador de procesos inflamatorios que se encuentra desregulado en la UC [142]. La calprotectina fecal es una proteína liberada por las células del sistema inmune en respuesta a la inflamación en el tracto gastrointestinal, por lo tanto, resulta útil en el diagnóstico de pacientes con EII [143].

También se han estudiado las variaciones genéticas de los pacientes para lograr diferenciar entre la UC y la CD, evidenciando una asociación de ciertas variantes genéticas con cada una de las condiciones de la EII. Además, se han observado cambios en los perfiles de expresión de miRNAs asociados con el origen y desarrollo de la EII, resultando útiles en la detección temprana y el pronóstico de la enfermedad [144].

1.1.3. Tratamiento

En los últimos años se ha producido una expansión en las opciones terapéuticas de la EII. Las terapias antiinflamatorias se consideran el primer paso en el tratamiento de la EII. Estos tratamientos incluyen 5-aminosalicilatos, corticosteroides, inmuno-moduladores, productos biológicos y resección quirúrgica si es necesario. El uso de moléculas biológicas ha permitido lograr avances en el tratamiento farmacológico de la EII, sin embargo, el 40% de los pacientes son refractarios a cualquier tratamiento, teniendo la cirugía como única opción. En la actualidad están surgiendo nuevas estrategias terapéuticas que involucran la mejora de la micro-ecología intestinal, terapia celular y terapia con exosomas, las cuales se aplican no solo para prevenir y tratar las complicaciones, sino también para lograr la cicatrización de la mucosa [145].

- *Aminosalicilatos*

El mecanismo de acción de los aminosaliciliatos radica principalmente en la interferencia con el metabolismo del ácido araquidónico, eliminación de especies reactivas de oxígeno y efectos sobre la función de los glóbulos blancos y la producción de citocinas [2]. El ácido 5-aminosalicílico (5-ASA), por ejemplo, induce la producción

de células Treg en el colon a través de la vía del receptor de hidrocarburos de arilo (AHR), seguido de la activación de TGF-β [146]. Se ha demostrado la eficacia de 5-ASA oral en el tratamiento de la UC [147].

- *Corticosteroides*

Se emplean en la inducción de la remisión en la EII moderada o grave. Inhiben la ciclooxigenasa y actúan en las células inmunitarias reduciendo su capacidad proinflamatoria. Se pueden administrar por vía oral o por vía intravenosa, con numerosos efectos secundarios, por lo que no se recomiendan como terapia de mantenimiento. Algunas investigaciones demuestran su eficacia en el tratamiento la EII y una mayor efectividad que el 5-ASA para el tratamiento de CD [148,149].

- *Inmunomoduladores*

Durante la progresión de la EII, los linfocitos T activados se infiltran en el sitio inflamado de la mucosa intestinal y desencadenan el aumento de citocinas proinflamatorias. Los agentes inmunomoduladores como la azatioprina (AZA) y la 6-mercaptopurina controlan la inflamación intestinal al inhibir la proliferación y activación de los linfocitos T. Su uso está indicado en pacientes cuya terapia con corticosteroides no es efectiva [150]. Se ha demostrado que el AZA tiene un efecto terapéutico favorable tanto para la CD como para UC [151]. Las tiopurinas presentan efectos secundarios adversos, por lo que ha disminuido su uso en la EII [152]. Finalmente, el metotrexato, disminuye la síntesis de citoquinas inflamatorias como IL-2, IL-6, IL-8, inhibiendo así la proliferación de linfocitos T y la respuesta inflamatoria [153].

- *Biológicos*

Los productos biológicos incluyen principalmente inhibidores de citocinas proinflamatorias (TNF-α, IL-12, IL-23) y antagonistas de integrinas. La terapia anti-TNF es una de las más empleadas en pacientes con EII por su rol en la inflamación, la apoptosis, la proliferación y la invasión [154]. Los anticuerpos monoclonales anti-TNF-α, como el infliximab y el adalimumab, ejercen efectos terapéuticos al inhibir las

respuestas inflamatorias asociadas al TNF-α y el daño tisular [155,156]. Existe evidencia científica de su eficacia en el tratamiento de la EII, aunque el 40% de los pacientes que reciben este tratamiento no responden [157].

La terapia anti-integrina bloquea el efecto de la integrina en la superficie de los leucocitos, inhibiendo así la interacción de los leucocitos con la mucosa intestinal y disminuyendo el efecto inflamatorio en la EII [158,159]. El etrolizumab es el anticuerpo mononuclear anti-integrina más utilizados por su selectividad intestinal y doble mecanismo de acción, en inducir y mantener la remisión en pacientes con EII [159].

- *Moléculas pequeñas*

Las moléculas pequeñas son compuestos sintéticos utilizados en el mantenimiento de la remisión en pacientes con EII. En la UC activa (moderada o grave) están indicados los inhibidores de la Janus Cinasa (JAK). Estas moléculas pueden bloquear múltiples vías de señalización e interferir con la acción de varias citocinas. Se ha demostrado su eficiencia en la inducción y mantenimiento de la remisión en pacientes con UC [160].

- *Tratamiento basados en el microbioma*

Los enfoques terapéuticos convencionales para la EII han mostrado una eficacia limitada y efectos secundarios perjudiciales, proporcionando la base para el diseño de estrategias terapéuticas orientadas al microbioma para restaurar la homeostasis intestinal en estos pacientes. En este sentido, la administración de compuestos bioactivos producidos por probióticos o bacterias beneficiosas para el intestino ha ganado un interés creciente en los últimos años [161,162]. Los probiótico pueden modular la composición de la microbiota intestinal y su actividad, así como tener efectos directos sobre la respuesta inmunitaria. Entre ellos, *Akkermansia muciniphila* y *Faecalibacterium prausnitzii* se consideran candidatos prometedores como probióticos de próxima generación [163,164]. En este contexto, los postbióticos se están considerando como una nueva estrategia para el tratamiento de EII. Se explica con más detalle en el apartado 1.5.

1.2. EPITELIO INTESTINAL: ESTRUCTURA Y FUNCIÓN.

1.2.1. Fisiología del epitelio Intestinal

La mucosa intestinal se localiza en la cara interna del intestino, tapizándolo. Está constituida por la capa de mucus, el epitelio intestinal y la lámina propia subyacente, donde se encuentran diversas células inmunitarias en estrecha proximidad con la barrera epitelial. El epitelio desempeña un papel crucial al establecer una barrera física y bioquímica entre la microbiota intestinal y el huésped. A su vez, la microbiota intestinal influye en proteínas clave involucradas en la función de la barrera epitelial, como son las proteínas de unión estrecha, las mucinas y los péptidos antimicrobianos. La regulación de la comunicación entre la luz intestinal y el epitelio resulta fundamental para la absorción de nutrientes, electrolitos y agua. Esta regulación permite que el sistema inmunológico interactúe con la microbiota y realice una adecuada detección y eliminación de microorganismos patógenos (Figura 4) [106].

1.2.1.1. Barrera epitelial Intestinal y componentes celulares

El epitelio intestinal constituye la mayor superficie mucosa del cuerpo, abarcando alrededor de ~400 m^2 con una única capa de células organizadas en criptas y vellosidades. Esta capa epitelial tiene la capacidad de renovarse cada 4-5 días. Esta constante renovación depende de las células madre epiteliales intestinales pluripotentes (IECs pluripotentes) ubicadas en la base de las criptas. Las células madre tras realizar su proceso de división y diferenciación migran hacia la luz intestinal, donde entran en estado apoptótico. Este proceso debe ser regulado y controlado por señales paracrinas que mantienen el equilibro y favorecen una renovación celular estable [39].

Las principales células que constituyen el epitelio son los enterocitos, especializados en funciones metabólicas y digestivas. Sin embargo, también existen otros linajes celulares con funciones especializadas tales como, las células M, células calciformes, células entero-endócrinas y las células de Paneth. Estas células se distribuyen a lo largo del intestino delgado y grueso de manera distinta (Tabla 2) [39].

Las IECs forman una barrera física continua, con uniones estrechas que conectan células adyacentes a través de mecanismos que involucran redes citoplasmáticas que

regulan la permeabilidad intestinal [165]. El epitelio intestinal también lo comprende una población diversa de células con funciones citotóxicas, auxiliares y reguladoras, conocidas como linfocitos intraepiteliales intestinales. De esta manera, existe una serie de interacciones entre las IECs y las células inmunitarias para mantener la homeostasis intestinal, fortalecer la barrera y proteger el organismo frente agresiones externas [166].

Tabla 2. Células epiteliales intestinales: tipos, función y localización

Tipo celular	Localización	Función
Enterocito	Intestino delgado- Colon	Absorción de nutrientes- Barrera física
Células Caliciformes	Intestino delgado- Colon	Secreción de Mucina
Células Paneth	Intestino delgado	Secreción de péptidos antimicrobianos (AMPs)
Células M	Intestino delgado- Colon	Captación y transporte de antígenos a nivel subepitelial
Célula entero-endocrina	Intestino delgado- Colon	Secreción hormonal-Sinapsis nerviosa

Barrera química

La barrera química proporciona una protección pasiva frente a las infecciones, actuando frente a los patógenos e inhibiendo el crecimiento bacteriano a través de la secreción de proteínas y péptidos antimicrobianos y moléculas inmunomoduladoras. Entre los componentes principales destacan los péptidos antimicrobianos (AMP), las proteínas regeneradoras de la familia 3 (Reg III), y las enzimas lisozima y fosfolipasa A2 secretora [167]. Los AMPs son moléculas pequeñas liberadas por las células Paneth con propiedades antimicrobianas que contribuyen en el mantenimiento de la homeostasis intestinal. Las defensinas (α y β defensinas) por su parte, son pequeños péptidos catiónicos secretados por las IECs con actividad antimicrobiana, antifúngica y antiviral [168]. Los AMPs son representativos del sistema inmune innato, sin embargo, algunas proteínas del sistema inmune adaptativo como la inmunoglobulina A secretora (sIgA), también ejercen de barrera química al evitar la adhesión de patógenos a las IEC [169].

Barrera física

Las barreras físicas están formadas principalmente por el mucus que cubre la mucosa intestinal, el glicocálix y las uniones intercelulares. Su principal función es inhibir físicamente la invasión de la mucosa por microrganismos intestinales.

Mucus: La capa de mucus que cubre el epitelio intestinal crea una separación física que impide que las bacterias luminales accedan a las células epiteliales subyacentes [49]. En el colon, la mucina 2 (Muc-2) formadora de gel mucoso crea una capa bien definida, estratificada en dos secciones. La capa interna es muy compacta y físicamente excluye las bacterias luminales. Además, la capa mucosa interna contiene péptidos antimicrobianos y efectores inmunitarios secretados por células epiteliales e inmunitarias que bloquean las bacterias luminales. Esto contribuye a la segregación espacial entre el huésped y las bacterias [170]. La capa mucosa externa es más laxa y sirve como sitio de adhesión para una gran cantidad de bacterias que colonizan el tracto intestinal. Esta capa externa es degradada por bacterias específicas de la microbiota intestinal. Por lo tanto, es necesario renovarla constantemente para preservar la capa mucosa interna. La producción de Muc-2 por las células caliciformes está regulada positivamente por la señalización de TLRs en respuesta a su degradación por comensales o fuentes mecánicas. El Factor Tréfoil 3 (TFF3), y la proteína de unión a IgGFc (FCGBP) también son componentes de la capa mucosa del colon que favorecen el mantenimiento de la integridad de la barrera epitelial [171].

Glicocálix: Es una capa de glucoproteínas, glucolípidos y mucinas transmembrana que recubre la superficie de las células epiteliales intestinales e inhiben el crecimiento y la invasión bacteriana [165].

Uniones intercelulares: El epitelio intestinal actúa como una barrera física que restringe la translocación de bacterias y antígenos luminales hacia los tejidos del huésped sin interferir con el paso de iones a través del espacio paracelular. Un mecanismo importante que rige la función de la barrera epitelial es la formación de uniones estrechas (TJ) entre IEC adyacentes. Las TJ establecen conexiones intercelulares en la parte apical del epitelio polarizado a través de proteínas transmembrana que incluyen ocludina, claudinas,

tricelulina y moléculas de adhesión de unión. Estas proteínas están ancladas al citoesqueleto de actina mediante las proteínas citosólicas zonula occludens (ZO)-1 y ZO-2. Las TJ son estructuras dinámicas que modulan la integridad de la barrera epitelial y la permeabilidad paracelular. Por lo tanto, la expresión y ubicación subcelular de las proteínas TJ están controladas por vías y mecanismos de señalización en respuesta a estímulos externos. Los patógenos entéricos causan alteración de las TJ como parte de sus mecanismos de infección, mientras que ciertas cepas bacterianas refuerzan las estructuras de las TJ como mecanismo para mantener la integridad de la barrera intestinal. Además de las TJ, otras estructuras mantienen la conectividad entre las IEC, a saber, uniones adherentes, uniones en hendidura y desmosomas (Figura 5) [106].

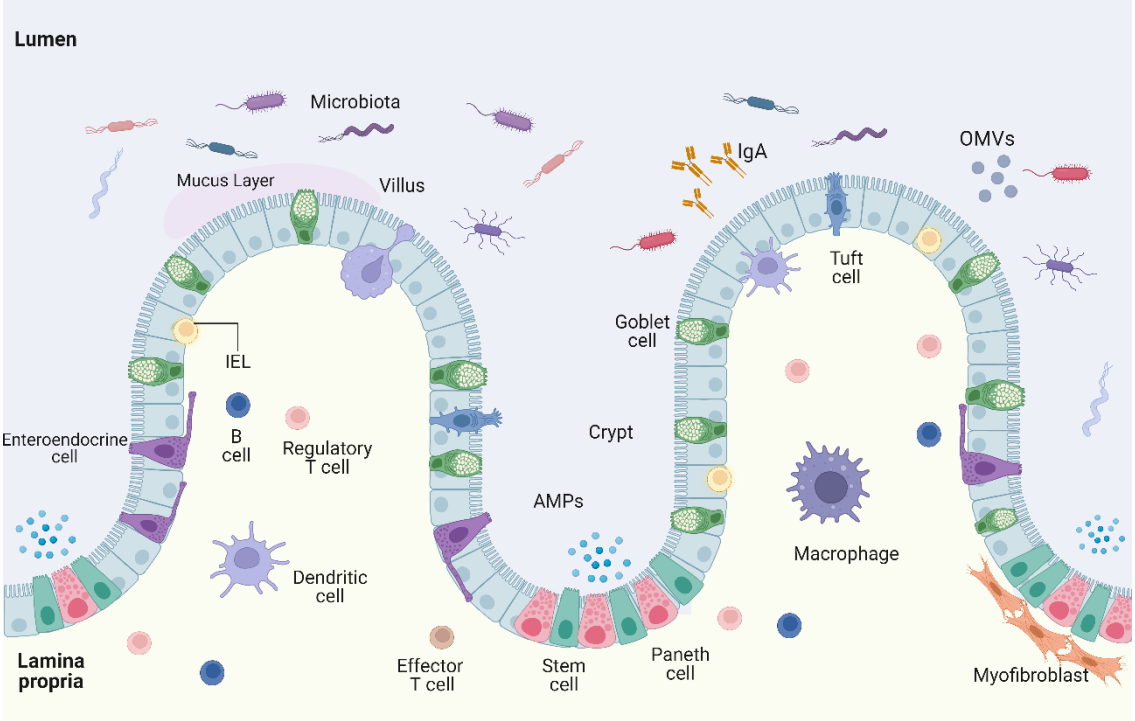


Figura 4. Estructura y Función de la Mucosa Gastrointestinal.

Las células epiteliales intestinales (IEC) constituyen una barrera física y funcional, y se originan a partir de las células madre columnares de la base de la cripta. Durante su migración, se diferencian en diversos tipos celulares como enterocitos, células caliciformes y células de Paneth. Los linfocitos intraepiteliales (IEL) producen moléculas inmunomoduladoras y contribuyen a la función de barrera. Debajo de las IEC, se encuentran células estromales (miofibroblastos), células B, células plasmáticas, macrófagos, células dendríticas y células T en la lámina propia, responsables de mantener una respuesta basal. Las estructuras linfoides regionales como las placas de Peyer (Intestino delgado) también desempeñan un papel crucial en la captura de antígenos y liberación en la cúpula subepitelial. En el colon, la presencia de una capa mucosa interna firme reduce la exposición a los microorganismos. Sin embargo, los patrones moleculares asociados a microorganismos presentes en las vesículas de membrana bacterianas (OMV) pueden eventualmente llegar a los IEC. **Ilustración propia creada con biorender.com y adaptado de Burgueño et al.** [172].

- Uniones estrechas (TJs):

Claudinas: Las claudinas son una gran familia de proteínas TJ que regulan la permeabilidad paracelular. Se han identificado 27 isoformas de claudina en humanos. Algunas tienen una función selladora (como la claudina-1), mientras que otras actúan como canales selectivos o poros para pequeñas moléculas cargadas. Claudina-2, por ejemplo, controla el movimiento de iones y favorece el flujo de agua transepitelial [173].

Ocludina: Forma parte del grupo de proteínas Marvel que, junto con la tricelulina y marvelD3, interactúan con otras proteínas TJ, actina y cinasas intracelulares contribuyendo en el mantenimiento de las uniones estrechas [174].

Zona occludens (ZO): son proteínas periféricas de la membrana celular localizadas en la zónula occludens que conectan las proteínas TJ transmembranales con el citoesqueleto intracelular. Su función principal es favorecer el ensamblaje y mantenimiento de las uniones estrechas y la permeabilidad paracelular. Entre ellas destacan ZO-1, ZO-2 y ZO-3 [175].

- Uniones adherentes y desmosomas: Están ubicadas en la región apical de las células epiteliales, por debajo de las uniones estrechas, y tienen un papel importante en la adhesión y señalización célula-célula. Las cadherinas son moléculas de adhesión celular que contribuyen a la cohesión tisular. Los desmosomas proporcionan la cohesión mecánica del epitelio intestinal, proporcionando estabilidad estructural. Estos complejos de unión se encuentran a lo largo de las membranas laterales debajo de las uniones adherentes [176].

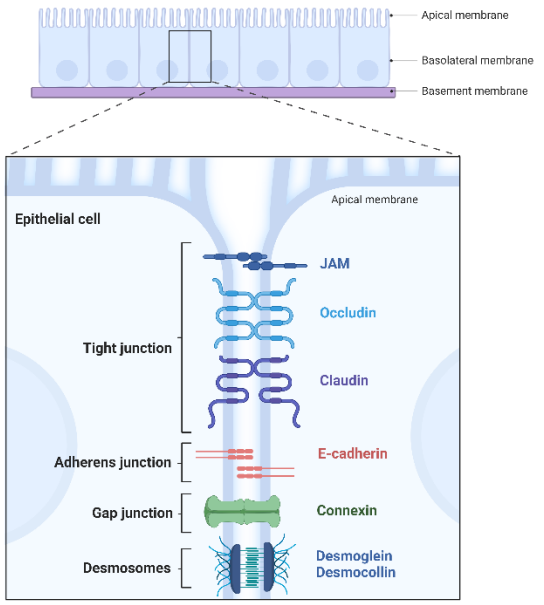


Figura 5. Complejos de Unión Intercelular en el Epitelio Intestinal.

Cada enterocito está conectado con el adyacente por uniones estrechas (TJ), uniones adherentes y desmosomas (desde el lado luminal al de la lámina propia). Las TJ están localizadas en la región apical-lateral de la membrana y constan de tres proteínas transmembrana integrales (claudinas, ocludina y JAM). Estas proteínas están conectadas al citoesqueleto de actina a través de proteínas citosólicas ZO-1, ZO-2, ZO-3. Las uniones adherentes y los desmosomas anclan las células epiteliales entre sí y confieren resistencia mecánica a la barrera epitelial intestinal.

Abreviaturas: *JAM, molécula de adhesión de unión; ZO, zona oclusiva.*

Ilustración propia creada con biorender.com y adaptado de Bhat et al. [177].

1.2.2 Disfunción de la Barrera Epitelial Intestinal durante la EII

La disfunción de la barrera es producto de alteraciones en las uniones intraepiteliales que favorecen la traslocación a través de la vía paracelular de microorganismos, antígenos de la dieta y otras moléculas dañinas para el huésped que activan el sistema inmune y desencadenan una respuesta inflamatoria típica de la EII [178,179]. La disfunción de la barrera puede presentarse de diferentes formas, alteraciones en el proceso de autofagia, aumento de la permeabilidad de la barrera epitelial, alteraciones de los PRR y sus vías de señalización, alteración de la producción de AMP o una capa de mucus defectuosa [180]. Este desequilibrio facilita el contacto directo de la microbiota con el epitelio y sistema inmune subyacente lo que genera una respuesta inflamatoria exacerbada [181].

Determinadas mutaciones o polimorfismos en genes relacionados con la barrera intestinal se han relacionado con la EII, como mencionamos en el apartado 1.1.1. (predisposición genética). La alteración en el inflamosoma NLRP3 también se ha asociado a la patogénesis de la EII. La función de NLRP3 es esencial en el mantenimiento de la homeostasis intestinal y su deficiencia aumenta la susceptibilidad a la colitis inducida por DSS, debido a una expresión reducida de β-defensina, y en consecuencia disbiosis intestinal [182].

Las bacterias alteran directamente la expresión y/o localización de proteínas de unión estrecha de forma dependiente de la cepa, tanto en modelos *in vivo* como *in vitro.* También el aumento de citoquinas proinflamatorias altera la permeabilidad intestinal. Así, se ha demostrado que los mediadores inflamatorios (TNF-α, IFN-γ, IL-1, IL-4, IL-6, IL-13, IL-17) alteran la expresión de claudinas en diferentes líneas celulares (Figura 6) [183].

Como mencionamos anteriormente la mucina Muc-2 forma una capa protectora en la superficie del epitelio intestinal y ayuda a prevenir el contacto directo entre las células epiteliales y los microorganismos presentes en la luz intestinal, controlando así la inducción de la inflamación intestinal [49]. Durante la EII, también se han observado cambios en el grosor, la continuidad y la composición de la capa de mucus. En especial en pacientes con UC, la capa de mucus es más delgada y pierde continuidad. Como segunda línea de defensa frente a las bacterias, encontramos los enterocitos, células caliciformes y células de Paneth, que participan en la secreción de mucus y péptidos antimicrobianos. Los pacientes con EII presentan una expresión defectuosa de péptidos antimicrobianos. Además, se ha evidenciado una marcada reducción de células caliciformes y células de Paneth en la CD [184]. Finalmente, tanto en la UC como en la CD se observa un aumento en la tasa de apoptosis que da lugar a un aumento de la permeabilidad epitelial [180].

Si bien la investigación progresa en este ámbito, aún no está claro si los mecanismos que dan lugar a la disfunción de la barrera son la causa principal de la EII o una consecuencia de una patología subyacente.

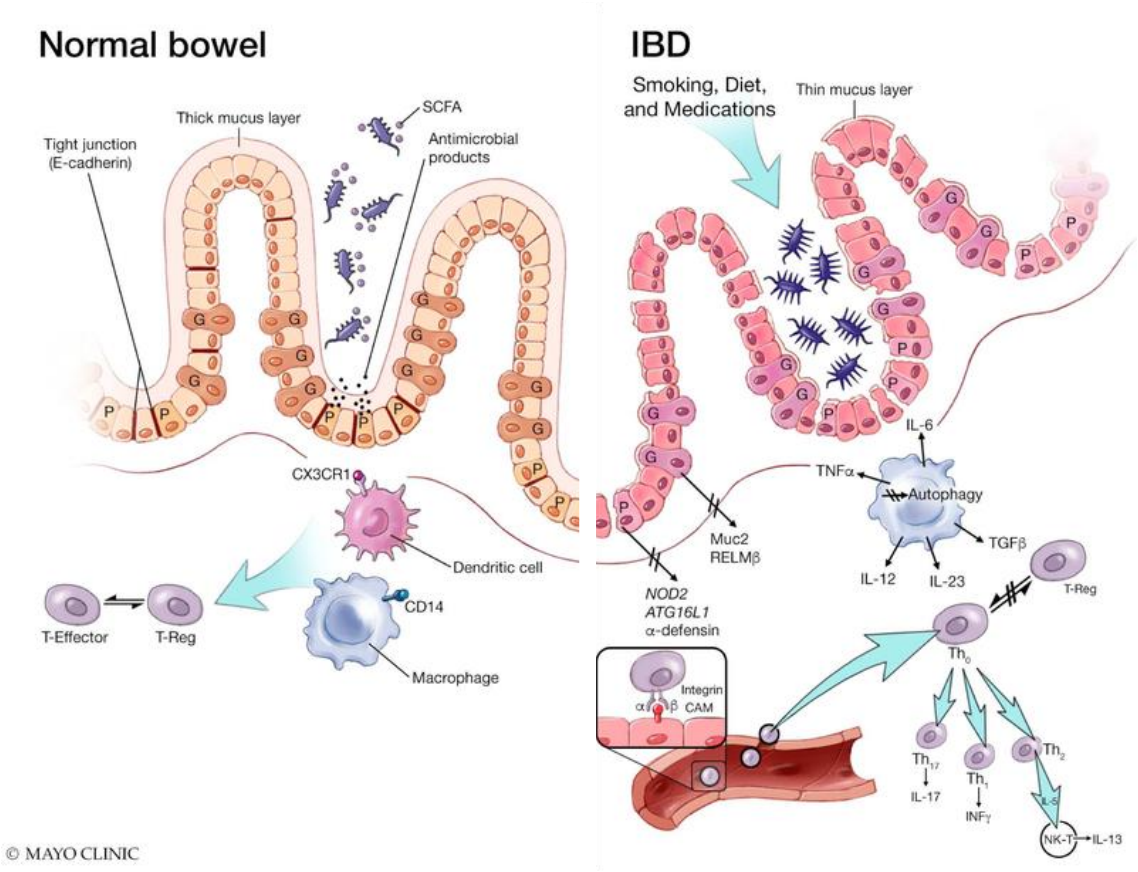


Figura 6. Estructura de la mucosa intestinal en condiciones normales y durante la EII.

Después de la exposición a factores ambientales, los individuos afectados por enfermedad inflamatoria intestinal (EII) desarrollan disbiosis con disminución de las bacterias productoras de ácidos grasos de cadena corta (SCFA) y aumento de las proteobacterias. Esta disfunción se relaciona con cambios en los mecanismos de mantenimiento de la barrera intestinal, como la reducción de la expresión de E-cadherina, el adelgazamiento de la capa mucosa y las disfunciones en proteínas como Muc2, células caliciformes y células de Paneth, incluyendo la alteración en la secreción de productos antimicrobianos y funciones asociadas a genes como NOD2 y ATG16L1. Además, se observa una disminución en la función de macrófagos y células dendríticas, junto con un desequilibrio en la migración y activación de células T, lo que contribuye a la inflamación intestinal en la EII. La mucosa de la EII también presenta anomalías una disminución en la autofagia. Por último, se observa un desequilibrio en el número y actividad de células T efectoras y reguladoras (T-reg), lo que resulta en una activación descontrolada de diferentes linajes de células T en el intestino inflamado Tomado de Dunleavy K et al.[185]

1.3. miRNAs DESREGULADOS EN LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

La expresión alterada de miRNAs contribuye en diversas patologías. En el contexto de la EII, se ha descrito la desregulación de varios miRNAs que controlan la expresión de TLRs [186], citoquinas inflamatorias, proteínas de unión estrecha, apoptosis y disfunción de la barrera epitelial [187–189].

Se han identificado varios miRNAs que regulan autofagia a través de diversos mecanismos y se ha establecido su implicación en EII [190]. Entre ellos, por ejemplo, miR-196 que disminuye la expresión de IRGM e inhibe la autofagia por disminución de los niveles de LC3II. Otros miRNAs como miR-106B y miR-93, miR-30C, miR-130a y miR-142-3p reducen la autofagia a través de la regulación negativa de ATG16L1, lo que interfiere en la eliminación de AIEC en pacientes de CD [191]. Por su parte, NOD2 es regulado por miR-29, para inhibir la liberación de IL-23. Determinadas mutaciones en NOD2, anulan la unión de este miRNA, generando una inflamación exacerbada por influencia de IL-23 [192]. Otros miRNAs que regulan la actividad de NOD, son miR-122, miR-495, miR-512 y miR-671. El uso de estos miRNAs se ha sugerido como estrategia terapéutica en CD [193].

La vía de señalización NFκB, juega un rol importante en la EII y es regulada por diversos miRNAs [194]. El análisis de biopsias de colon en pacientes con UC reveló que miR-126 tiene como diana el mRNA de IκBα, un importante inhibidor de la vía de señalización de NFκB y, por lo tanto, la sobreexpresión de miR-126 favorece la inflamación. En biopsias de colon de pacientes de UC y modelos experimentales murinos, se observa una expresión reducida de miR-124, lo que favorece la expresión y actividad del factor de transcripción STAT3, que a su vez contribuye a la inflamación y patogénesis de UC [195].

También se ha descrito la correlación entre miRNAs desregulados y alteraciones en la barrera intestinal en la EII. Entre ellos, miR-200b dirigido contra TGF-β influye en el daño del epitelio y la patogénesis de la EII [196]. Se han reportados niveles elevados de miR-21 en muestras de pacientes con EII. Los ensayos *in vitro* en diferentes líneas celulares han indicado que miR-21 ejerce un efecto negativo sobre la integridad de la barrera intestinal, regulando las proteínas de unión estrecha a través de la vía de

señalización PTEN/PI3K/Akt. En monocapas de células epiteliales, la sobreexpresión de miR-21 regula negativamente los niveles de ocludina y E-cadherina, y aumenta la producción de prostaglandina E2, IL-6 e IL-8 [197].

En el siguiente apartado se describen otros miRNAs con un rol importante en la patogénesis de la EII conjuntamente con sus genes diana. En concreto, se trata de los miRNAs miR-7-5p (apartado 1.4.1.5), miR-24 and miR-200a (apartado 1.4.2) y miR 193a-3p y miR-92-3p (apartado 1.4.3).

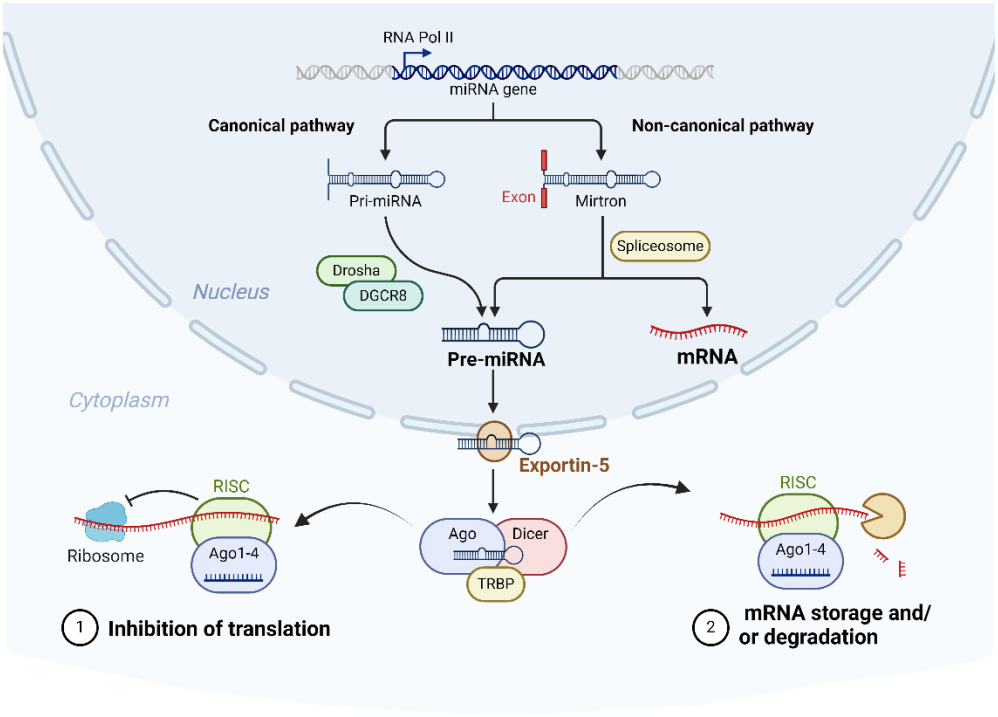


Figura 7. Descripción esquemática de la biosíntesis de microRNA (miRNA) canónicos y no canónicos.

Los microRNA (miRNA) pueden estar codificados por genes individuales (monocistrónicos), como grupos de genes (policistrónicos) o en intrones de genes (intrónicos). En la vía canónica de miRNA El pri-miARN, producto de la transcripción, es procesado por un complejo multiprotéico Drosha/DGCR8. Las horquillas intrónicas de pre-miRNA de la vía no canónica del mirtrón se forman mediante empalme, desramificación y recorte de intrones cortos sin procesamiento de Drosha. Los pre-miRNA generados por las vías canónicas y no canónicas se exportan desde el núcleo a través de Exportina 5, seguido de la escisión de Dicer dentro del complejo de carga RISC (RLC), el desenrollado del dúplex miRNA/miRNA a través de Argonaute y la carga dependiente de TRBP en el complejo silenciador inducido por RNA (RISC). El miRNA maduro unido a RISC guía el complejo para unirse a los mRNA diana, lo que lleva a la escisión del mRNA o la inhibición de la traducción, regulando así la expresión génica. **Ilustración propia creada con biorender.com y adaptado de O'Carroll et al.** [198].

1.4. GENES DESREGULADOS EN LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

1.4.1. Péptido Trefoil 3 (TFF3)

1.4.1.1. Estructura y Expresión

El péptido trefoil 3 (TFF3), también conocido como Factor Trefoil Intestinal (ITF), es un miembro de la familia de los factores trefoil. TFF3 es un péptido secretado, rico en cisteínas que comprende 59 residuos de aminoácidos, tiene un peso molecular de aproximadamente 6,6 kDa en su forma monomérica o 13 kDa en su forma dimérica. TFF3 forma principalmente homodimeros, unidos por puente disulfuro y puede formar parte de complejos de alto peso molecular como heterodímeros con la proteína de unión a IgGFc (FCGBP). FCGBP es un constituyente del mucus intestinal secretado por las células caliciformes [171]. El dominio trébol de TFF3 presenta una estructura de cisteínas altamente conservada ($CX_{9–10}C_9CX_4CCX_{10}C$, $Cys^{I–V}$, $Cys^{II–IV}$ y $Cys^{III–VI}$), que genera tres bucles compactos, formando una estructura similar a un trébol también conocida como dominio P. El dominio P estabiliza y comprime la estructura de TFF3 y contribuye a su resistencia proteolítica y ácida. TFF3 es secretado junto con MUC2 por las células caliciformes intestinales y se distribuye a lo largo de toda la superficie mucosa del intestino delgado y grueso [199]. Actúa sobre los enterocitos epiteliales adyacentes de forma paracrina y desempeña un papel clave en el mantenimiento y reparación de la mucosa intestinal. Como componente integral de la barrera epitelial, los estudios *in vitro* e *in vivo* indican que TFF3 facilita la restitución de la mucosa al favorecer la migración celular, modular el fortalecimiento de las proteínas de unión estrecha, la apoptosis, la angiogénesis y la protección de la mucosa [200].

1.4.1.2. Funciones y vías de señalización

La restitución de la mucosa es un proceso multifacético que abarca al menos los siguientes pasos: (i) reducción de los contactos célula-célula y una transición hacia un fenotipo migratorio, (ii) migración celular; (iii) repolarización y formación de uniones estrechas que contribuyen a la restitución morfológica; y (iv) mejora de la función de barrera, que incluye la resistencia epitelial y la restitución funcional.

Se ha demostrado que TFF3 tiene una función importante en la migración celular, que generalmente surge como respuesta a la re-epitelización de heridas. En la restitución epitelial, tras una lesión superficial, las células epiteliales pierden su polaridad columnar y migran rápidamente al sitio de la lesión. La restitución epitelial eficiente es fisiológicamente importante para prevenir que los antígenos luminales y las bacterias accedan al tejido del huésped y a las células inmunitarias [201]. Cuando el daño de la mucosa se extiende más allá de la superficie, la restitución se complementa con procesos de reparación, proliferación, angiogénesis y remodelación del tejido. En este contexto, se ha demostrado que el péptido TFF3 actúa estimulando la motilidad celular, promoviendo la migración de células viables junto con la glicoproteína MUC2. Este proceso ocurre independientemente del TGF-β que es importante en los procesos de restitución [202]. TFF3 interactúa con MUC2 para mejorar la mucosa en su acción barrera. En un modelo *in vitro* de barrera epitelial se demostró su eficacia en la protección de las células epiteliales, sugiriendo un efecto sinérgico de ambos factores en la protección de la mucosa [64]. Se ha demostrado que la administración vía enteral del monómero TFF3 Ser ^{57} y del dímero TFF3 Cys ^{57} previene la lesión y promueve la curación de la mucosa intestinal inducida por isquemia-reperfusión en ratas inmaduras [203].

La adhesión célula-célula también es un proceso esencial para el mantenimiento de la integridad epitelial y es mediado por la molécula de adhesión E-cadherina. La E-cadherina, por lo general se asocia con la β-catenina, formando el complejo E-cadherina/β-catenina, el cual desempeña un papel crucial en el establecimiento de uniones adherentes. La alteración de este complejo puede generar la pérdida de la adhesión célula-célula. La interrupción de la adhesión entre las células es un paso crítico y necesario para la migración celular. TFF3 regula negativamente la E-cadherina, altera la función de las uniones adherentes y, por lo tanto, facilita la migración celular hacia la herida [64,204].

Por otra parte, las integrinas median las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular, su señalización modula la organización del citoesqueleto e induce un fenotipo migratorio [205]. En ensayos *in vitro*, se ha observado que TFF3 favorece la formación del complejo tetraspaninas/integrina, lo que sugiere su participación en la

regulación de algunas funciones de las integrinas relacionadas con la motilidad y la adhesión celular [200]. El proceso de restitución epitelial necesita de la angiogénesis cuando el daño de la mucosa se extiende más allá de la superficie del epitelio. En este contexto, TFF3 presenta actividad pro-angiogénica al inducir la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular a través de la proteína Src y la activación del factor de transcripción STAT3 [206].

TFF3 promueve la reparación de la lesión epitelial intestinal mediante la regulación de la expresión de proteínas de unión estrecha en las células epiteliales intestinales, reduciendo a su vez, la permeabilidad paracelular [64]. Esto se logra a través de la regulación positiva de la claudina-1 y la redistribución de ZO-1 desde el citoplasma hacia las uniones intercelulares. En el modelo *in vitro* de células Caco-2 tratadas con el factor activador de plaquetas (PAF), TFF3 inhibe la regulación negativa de claudina-1 y ZO-1 y aumenta la resistencia eléctrica transepitelial [207]. Además, en ratones con una baja producción de células caliciformes y disminución en la secreción de TFF3 y MUC2, se ha observado un aumento en la permeabilidad de la mucosa colónica que mejora tras la administración de TFF3 [208].

La migración vuelve vulnerables a las células frente a la apoptosis, un mecanismo de muerte celular programada. Para facilitar una migración que permita la restauración, es crucial contar con factores que eviten la apoptosis y fomenten la supervivencia celular. La existencia de estos elementos garantiza que las células migratorias puedan alcanzar el área dañada y restablecer la integridad de la barrera epitelial [209]. Los ratones deficientes de TFF3 presentan un aumento significativo en el número de células apoptóticas en las criptas colónicas. Además, TFF3 ejerce efectos antiapoptóticos en las células epiteliales intestinales al activar a NF-κB y regular la supervivencia celular a través de diversas vías de señalización incluyendo ERK/MAPK, PI3K/Akt, fosfolipasa C (PLC)/PKC, β-catenina y EGF. Está demostrado que durante el proceso de migración y restitución celular inducido por TFF3, se activan varias vías de señalización principalmente la activación de ERK1/2 [210].

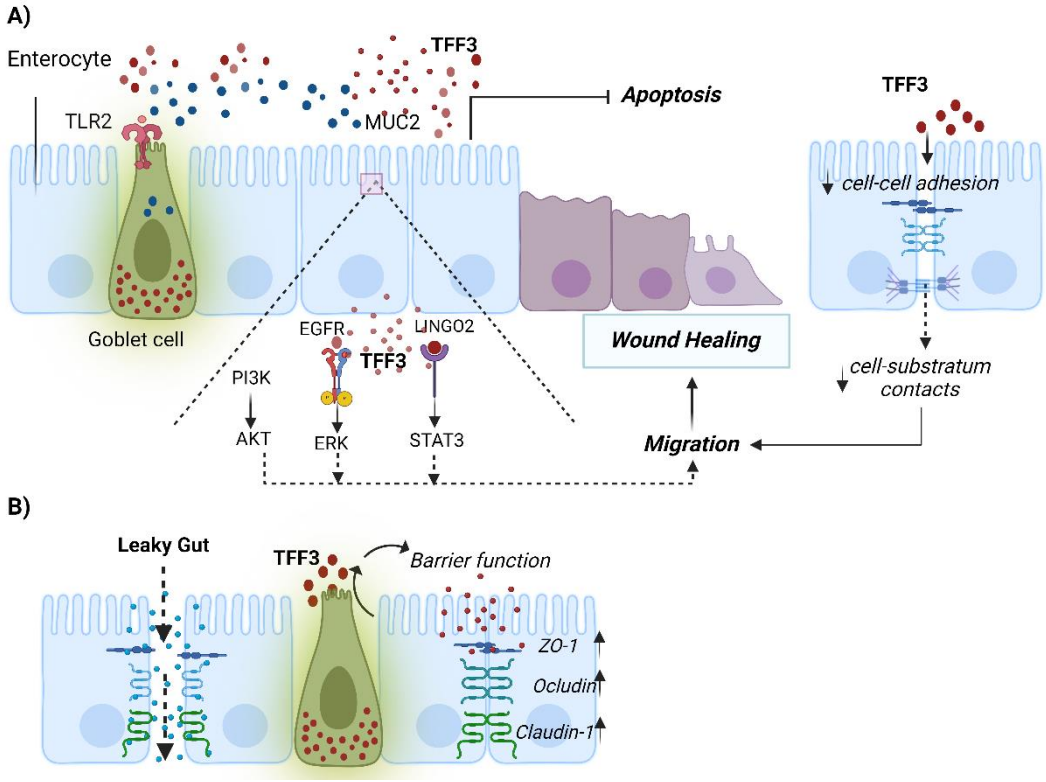


Figura 8. Funciones de TFF3

La secreción de factores trefoil (TFF; círculos rojos) por parte de las células caliciformes está coordinada con la secreción de mucina-2 (círculos azules). El péptido TFF3 secretado actúa sobre las poblaciones de enterocitos adyacentes, ya sea extracelularmente (aumentando la función de barrera) (B) o intracelularmente (eventos transcripcionales y de señalización). La migración celular es el resultado de la interrupción integrada de la adhesión célula-célula y célula-sustrato y de la prevención de la apoptosis a través del desprendimiento celular (A). Ilustración propia creada con biorender.com, adaptado de Yang et al., y Taupin et al. [211,212].

1.4.1.3. Implicaciones de la Microbiota en la expresión de TFF3

Un elemento esencial de la simbiosis huésped-microbiota es la barrera mucosa, que cubre los epitelios. Dentro de los componentes característicos de estas barreras destacan las mucinas, péptidos de la familia TFF, y la proteína de unión a FCGBP. En este contexto, TFF3-FCGBP se consideran componentes de la defensa inmune innata de la mucosa, promoviendo la unión de patógenos y la eliminación de microorganismos [213].

En un análisis de la microbiota intestinal en ratones deficientes en TFF3, caracterizados por ser más sensibles a la colitis inducida por DSS (debido al menor grosor de la capa de mucus y mayor permeabilidad), no se observaron diferencias significativas

en la composición microbiana respecto a ratones *wild type* [214]. En este contexto, TFF3 no influye en la colonización bacteriana de la mucosa, sin embargo, es necesario para la protección del huésped contra la infección bacteriana durante la colitis inducida por DSS [215]. En un modelo *in vivo* de infección intestinal, con *Citrobacter rodentium* se observó una disminución en el número de células calciformes y menor expresión de los genes que codifican MUC2 y TFF3. En infecciones por bacterias como *Shigella* y *Campylobacter,* se ha observado también la reducción de células caliciformes [216]. El uso de la secuenciación masiva para abordar la relación entre TFF3 y las bacterias intestinales mostró cambios en los niveles de TFF3 con respecto a la diversidad y composición bacteriana [217]. Además, la expresión de TFF3 es inducida tras la activación del receptor TLR2 por bacterias comensales, probablemente por un mecanismo indirecto [218].

1.4.1.4. TFF3 y Enfermedad Inflamatoria Intestinal

TFF3 desempeña un papel importante en la patogénesis de la EII y su alteración está asociada con la gravedad y la progresión de la EII. Se ha demostrado que la expresión de TFF3 está regulada a la baja en modelos experimentales de colitis y en tejido dañado de pacientes con EII [219,220]. Las investigaciones en modelos animales de inflamación intestinal fortalecen el conocimiento sobre los mecanismos subyacentes. Estos modelos han incluido dos formas de colitis química: colitis inducida por ácido trinitrobenceno sulfónico (TNBS), que comparte características patológicas de la CD y colitis inducida por la sal sódica de sulfato de dextrano (DSS), una inflamación del colon que refleja la UC [221].

Los niveles reducidos de TFF3 pueden comprometer la curación de la mucosa, exacerbar la inflamación y contribuir a la cronicidad de la enfermedad. En su papel como mediador inflamatorio, TFF3 reduce la respuesta inflamatoria en la mucosa gastrointestinal al modular la actividad de las células inmunes y la producción de citoquinas [222]. Diferentes investigaciones en modelos *in vivo* lo demuestran. El modelo de enterocolitis necrotizante en ratas reveló que TFF3 mejora la inflamación al inhibir el aumento de NF-KB, IL-1β e IL-6, y al potenciar la expresión de la citocina antiinflamatoria IL-10 [223]. Además, en un modelo de colitis inducida por TNBS de ratones, la administración de TFF3 mejoró el daño en el epitelio colónico tras inhibir la señalización

de TLR4 y la producción de TNF-α [224]. Por su parte, en ratones deficientes de TFF3, la administración de DSS causa un daño colónico severo. Estos efectos pueden revertirse mediante la estimulación de la producción de TFF3/MUC2 [225]. En un modelo murino de colitis experimental de nuestro grupo, la administración oral de EVs de EcN contrarrestó la expresión alterada de citocinas proinflamatorias y varios marcadores de la función de la barrera intestinal, entre ellos el TFF3 [226].

El papel de TFF3 en la inflamación ha sido también evidenciado en modelos celulares in vitro. En las células HT29, TFF3 inhibe la secreción de IL-6 e IL-8 inducida por LPS y favorece la producción de defensinas [227]. Se ha observado en las células caliciformes una regulación positiva de TFF3 en los sitios de lesión de la mucosa [218]. En células Caco-2 transfectadas con TLR2, se observó un aumento en la secreción de TFF3. En presencia de inflamación inducida por IL-1β, la sobreexpresión de TLR2 o TFF3 reduce significativamente la secreción de las citocinas proinflamatorias IL-6, IL-8 y TNF-α, mostrando a su vez un efecto positivo en el aumento de la resistencia transepitelial y la expresión de las proteínas ZO-1, ocludina y claudina-1 [228]. En células HT-29, TFF3 reduce la permeabilidad paracelular mediante la activación de la expresión de claudina-1 y la inhibición de la expresión de claudina-2 [229]. Este péptido pleiotrópico media la protección y reparación del epitelio mediante varios mecanismos, entre los que también se incluye la redistribución de ZO-1 a las uniones intercelulares [226].

1.4.1.5. MicroRNAs en la regulación de TFF3

TFF3 está regulado negativamente a nivel postranscripcional por miR-7-5p. Se han detectado niveles elevados de miR-7-5p en muestras de pacientes con EII [220]. La activación la vía PI3K/AKt por TFF3, conlleva a la regulación negativa de miR-7-5p. En condiciones fisiológicas, altos niveles de expresión de TFF3 se correlacionan con una expresión reducida de miR-7-5p. Por el contrario, cuando miR-7-5p está sobreexpresado en la EII, la degradación del mRNA de TFF3 da como resultado la inhibición de la vía PI3K/AKT [220]. En conjunto, la evidencia experimental disponible apunta a miR-7-5p y TFF3 como posibles dianas terapéuticas en la EII.

1.4.2. Genes Implicados en el Metabolismo de Serotonina

1.4.2.1. Metabolismo de 5-HT en el intestino

La serotonina, también denominada como 5-hidroxitriptamina (5-HT), es una monoamina conocida principalmente por su función como neurotransmisor esencial en el desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso central (SNC). Sin embargo, solo alrededor del 5% del total de 5-HT en el cuerpo humano se origina en las neuronas serotoninérgicas del SNC. El 95% restante se produce en el intestino, donde desempeña un papel crucial en la regulación del sistema nervioso entérico (SNE), las respuestas inmunes y participa en procesos tales como la motilidad intestinal, secreción, inflamación y mantenimiento de la integridad de la barrera epitelial [230].

1.4.2.2. Síntesis endógena de 5-HT

La síntesis de 5-HT en los tejidos periféricos ocurre en diversas células, como adipocitos, células β pancreáticas y osteoclastos. Además, células como mastocitos, macrófagos y células dendríticas expresan la enzima triptófano hidroxilasa (TpH). La mayor proporción de 5-HT en el cuerpo se produce, almacena y libera a partir de un subconjunto de células enterocromafines, presentes en la mucosa intestinal [230].

En el sistema gastrointestinal, la serotonina se genera a partir del aminoácido precursor L-triptófano. Este proceso implica la conversión de L-triptófano a 5-hidroxitriptófano (5-HTP) mediante la acción de la enzima triptófano hidroxilasa 1 (TpH1), posteriormente, una descarboxilasa de aminoácidos aromáticos transforma el 5-HTP en 5-HT. La serotonina media sus efectos al interactuar con receptores específicos de las células epiteliales, inmunitarias y neuronales adyacentes [231]. La enzima TpH presenta dos isoformas TpH1, que se expresa principalmente en células enterocromafines y es responsable de la mayor parte de la producción periférica de 5-HT, y TpH2, que se expresa en neuronas entéricas y serotoninérgicas en el cerebro [232]. La 5-HT derivada de TpH1 participa en la inflamación intestinal mediante la activación de respuestas inmunes. En ratones TpH1 *knockout* (KO), la pérdida funcional de TpH1, desencadena una disminución de la producción de 5-HT en el intestino, resaltando la importancia de esta enzima en la regulación intestinal de 5H-T (Figura 8) [231].

1.4.2.3. Liberación y reabsorción de 5-HT

Las células enterocromafines detectan ciertas señales en la luz del intestino, como cambios en el pH, alteraciones en los niveles de nutrientes, influencia de agentes neuromoduladores o estímulos mecánicos que desencadenan la liberación de serotonina. Inicialmente el transportador vesicular de monoaminas 1 (VMAT1) secuestra la 5-HT en gránulos, que son transferidos a la membrana con la subsecuente liberación de 5-HT a través del receptor de recaptación de serotonina (SERT), que se localiza en el lado apical y basolateral de la membrana celular [233]. La 5-HT liberada puede ser recaptada a través de SERT por los enterocitos de la mucosa, y posteriormente desactivada por la monoamino oxidasa (MAO), la primera enzima intracelular en la vía de degradación de la serotonina que se encuentra ubicada en las mitocondrias y cataliza la desaminación de muchas aminas biogénicas. Los productos finales de esta vía metabólica son el ácido 5-hidroxiindolacético y en menor cantidad el 5-hidroxitriptofano [234]. En los enterocitos, la 5-HT también puede ser metabolizada por la 5′-difosfo-glucuronosiltransferasa a su metabolito inactivo 5-hidroxitriptamina glucurónico (5-HTO) [231].

La 5-HT que no se absorbe en las células del revestimiento epitelial ingresa a la circulación a través del lecho capilar de la lámina propia. La mayor proporción de 5-HT en sangre es absorbida por las plaquetas a través de SERT, donde VMAT1 lo empaqueta nuevamente en gránulos o puede ser degradado por una variedad de enzimas intracelulares. Debido a la falta de TpH1, las plaquetas no pueden sintetizar 5-HT y simplemente actúan como transportador. Un pequeño porcentaje de 5-HT permanece soluble en plasma y se une a receptores específicos de 5-HT en los tejidos periféricos [233]. En conclusión, los niveles sanguíneos de 5-HT son indicadores de la producción intestinal de 5-HT.

Los niveles óptimos de 5-HT a nivel intestinal se mantienen a través de SERT. Este transportador está codificado por el gen *SLC6A4.* Este gen está ubicado en el cromosoma 17q11.1-q12, con un tamaño de 31 kb y 14 exones. Codifica una proteína de 630 aminoácidos que pertenece a la familia de transportadores de serotonina dependientes de sodio. SERT se expresa en las células epiteliales intestinales y favorece la internalización de 5-HT, desempeñando un papel critico en su regulación, disponibilidad y funciones a

nivel intestinal, por lo tanto, la alteración en su función provoca altos niveles de 5-HT extracelular (Figura 8) [235].

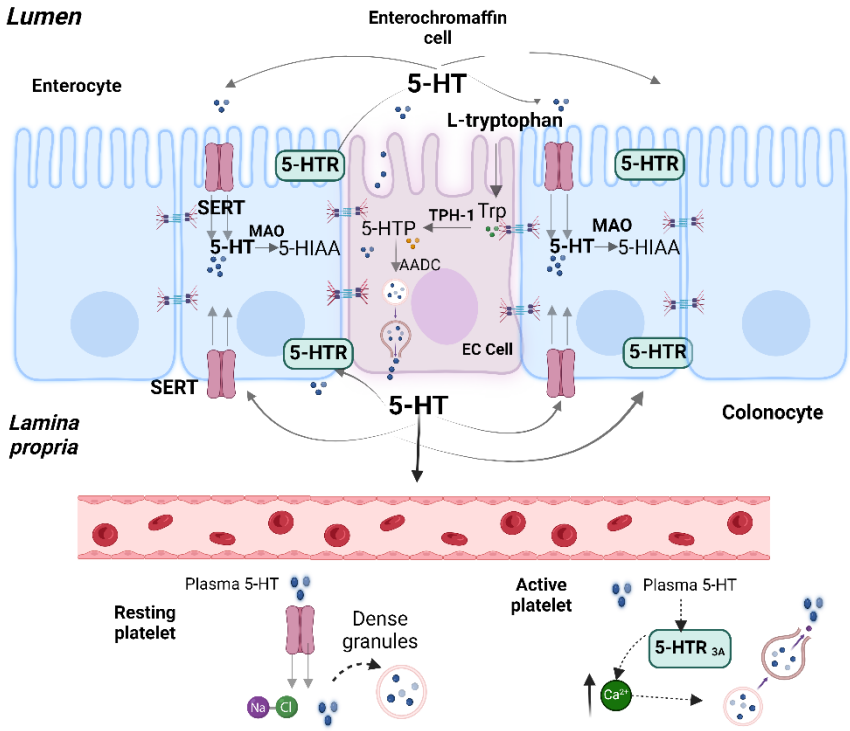


Figura 9. Representación Esquemática del Sistema Serotoninérgico Intestinal.

El sistema serotoninérgico intestinal muestra dos estados principales: "ON" y "OFF", junto con los mecanismos de señalización asociados. En el ***estado "ON"****, las células enterocromafines (EC) en el intestino sintetizan 5-HT a partir de triptófano (Trp), catalizado por la enzima TPH1, que convierte Trp en 5-hidroxitriptófano (5-HTP). Luego, la enzima descarboxilasa de AADC convierte el 5-HTP en 5-HT. Esta serotonina se almacena en vesículas a través del transportador vesicular de monoaminas VMAT1 en las células EC y se libera al espacio extracelular. Cuando la 5-HT se une a receptores de serotonina (5-HTR), se activa el* ***estado "OFF"****, donde puede ser absorbida por enterocitos o plaquetas a través del transportador de serotonina (SERT), terminando así sus efectos. Su unión a receptores de superficie plaquetaria como el 5-HT 2A desencadena la movilización de calcio intracelular, promoviendo la desgranulación plaquetaria y liberando más 5-HT.* **Ilustración propia creada con biorender.com y adaptado de Layunta et al.** [27].

1.4.2.4. Receptores y Señalización

La capacidad de la 5-HT para influir en diversas respuestas fisiológicas se debe a su variado sistema de receptores. Las acciones de la 5-HT están mediadas por 15 receptores, divididos en siete subclases diferentes. Seis de las siete subclases son receptores acoplados a proteína G, mientras que los receptores 5-HT_3 son canales iónicos regulados por ligando. En el intestino se expresan cinco clases de receptores (5-HT_1, 5-HT_2, 5-HT_3, 5-HT_4 y 5-HT_7). Los receptores intestinales mejor estudiados son el 5-HT_3 y el

5-HT_4. Los receptores 5-HT_4 están localizados en las neuronas entéricas presinápticas, mientras que los receptores 5-HT_3 están en las neuronas sensoriales y mientéricas. El receptor 5-HT_3 puede influir en la secreción de ácido clorhídrico y aumentar la motilidad intestinal. Ambos receptores se relacionan con la inducción de 5-HT por células enterocromafines. Una vez activados, estos receptores median una gran variedad de funciones intestinales que deben acompañarse de mecanismos de regulación, o de lo contrario se desencadenan alteraciones asociadas al aumento de 5H-T [236,237].

1.4.2.5. Microbiota y su implicación en la síntesis de 5-HT Intestinal

El 1% del triptófano de la dieta se metaboliza y convierte en 5-HT, y alrededor del 4-6% es metabolizado por la microbiota [238]. Por la vía de la quinurenina, el triptófano se transforma en diversas moléculas bioactivas, como ácido quinurénico, picolínico y quinolínico. Estos derivados de triptófano interactúan con el receptor de Aril hidrocarburo (AHR), un factor de transcripción activado por ligandos citosólicos que regula genes asociados con la respuesta inmunológica, la integridad de la barrera epitelial y la prevención de la inflamación intestinal [239].

Se sabe que la microbiota intestinal compite con el huésped por el triptófano disponible, metabolizándolo a indol y escatol, activando respuestas inmunitarias que promueven la homeostasis intestinal. Las bacterias contribuyen a la síntesis de 5-HT ya sea mediante la producción directa de 5-HT, o mediante la secreción de metabolitos secundarios que estimulan la síntesis de 5-HT en las células enterocromafines. Estudios *in vivo*, en ratones *germ-free* han observado niveles elevados de triptófano y 5-HT en suero, que se normalizan al colonizarlos con la microbiota de las heces provenientes de ratones *wild-type* [240]. La microbiota también ejerce un efecto indirecto sobre el triptófano al activar genes relacionados con su metabolismo. La administración de *Bifidobacterium infantis* en ratas, reduce la actividad de la enzima IDO (indolamina 2,3-dioxigenasa) y por tanto aumenta la disponibilidad de triptófano en el huésped para la síntesis de 5H-T [241].

Los metabolitos bacterianos que favorecen la síntesis de 5-HT son los SCFAs y los ácidos biliares. Se ha evidenciado que el acetato, el propionato y el butirato, productos de la fermentación anaeróbica en el intestino por bacterias de los filos Firmicutes y Bacteroidetes, poseen la capacidad de activar los receptores de ácidos grasos libres en las células enterocromafines. Esta activación incrementa la expresión de TpH1 y, por consiguiente, estimula la producción de 5-HT [75]. Recientemente se ha logrado identificar metabolitos como el α-tocoferol, el folato, la tiramina y el p-aminobenzoato y el LPS de *Escherichia coli* que aumentan la secreción de 5-HT en las células enterocromafines [242].

La microbiota intestinal también presenta un efecto modulador sobre la expresión y funcionalidad de SERT en el huésped. Se ha evidenciado un aumento en la expresión de SERT en ratones *germ-free*. Sin embargo, *E. coli* AIEC tiene la capacidad de inhibir tanto la expresión como la función de este transportador de serotonina [243]. Por su parte, el tratamiento con *Lactobacillus rhamnosus* en un modelo de EII aumentó la expresión de SERT [244]. En modelos de ratones infectados con *Citrobacter rodentium*, diez días después de la infección se redujo el número de células enterocromafines y se observó una expresión reducida de SERT [231]. Estas evidencias demuestran que la microbiota y la disbiosis intestinal pueden desempeñar un papel en la regulación de la expresión de SERT en el intestino. También se ha descrito la influencia de la microbiota sobre la enzima TpH1. Los ratones TpH1 $^{+/-}$ y TpH1 $^{-/-}$, que producen diferentes concentraciones de 5-HT intestinal, tienen una microbiota variable [242].

Alteraciones en el metabolismo de la serotonina, y en consecuencia en los niveles de serotonina libre, tienen influencia en los cambios de la composición bacteriana. Se ha demostrado que la supresión de SERT en modelos *in vivo* se traduce en niveles elevados de los géneros *Lactobacillus, Streptococcus, Enterococcus* y *Listeria*, mientras que se observan cantidades significativamente reducidas de *A. muciniphilia y* especies de *Bifidobacterium* [245] En EII, el aumento en la biodisponibilidad de 5H-T se asocia a una mayor colonización de *Turicibacter sanguinis* y una reducción en la diversidad microbiana con alteración en el metabolismo microbiano de 5-HT [231].

En conclusión, la microbiota intestinal puede influir en la disponibilidad del triptófano del huésped y aumentar la disponibilidad de 5-HT. A su vez, el 5-HT derivado del huésped puede influir en la composición de la microbiota intestinal al promover la colonización de especies específicas. Sin embargo, un exceso de 5-HT puede empeorar la inflamación intestinal mediante la supresión de microorganismos beneficiosos que mejoran la homeostasis intestinal, tanto directa como indirectamente, mediante la inhibición de péptidos antimicrobianos. Está claro que 5-HT desempeña un papel importante en la inflamación intestinal al interactuar con las células inmunes locales a través de los

1.4.2.6. 5-HT y Enfermedad Inflamatoria Intestinal

La 5-HT es esencial en el mantenimiento del equilibrio intestinal, pero también desempeña un papel fundamental a nivel sistémico. Como hemos mencionado anteriormente, las patologías inflamatorias intestinales, como la CD o la UC, desarrollan una respuesta inflamatoria crónica en el tracto gastrointestinal con infiltración de células inmunológicas en las capas del intestino, y producción de citocinas proinflamatorias y moléculas neuromoduladoras [246]. En este contexto, la 5H-T es un mensajero paracrino/neurocrino capaz de mediar en las células inmunes procesos como la quimiotaxis y la proliferación mediante la activación de los receptores 5H-T. Se ha observado en modelos *in vivo* que los mastocitos tienen la capacidad de sintetizar, almacenar, secretar y absorber 5-HT, así como también los macrófagos y las células T (Figura 9) [231].

Las investigaciones en modelos humanos y animales respaldan el papel proinflamatorio de la 5-HT en la EII. Biopsias intestinales de pacientes con CD y UC muestran un incremento en las células enterocromafines [247]. Además, estas células aisladas de pacientes con EII muestran mayor secreción de 5-HT inducida por LPS y niveles elevados de IL-1β [248].

Las investigaciones en los modelos de colitis química tienen en común el incremento de células enterocromafines, disminución de la expresión de los niveles de SERT y el aumento de los niveles de 5H-T. Estos hallazgos indican que los niveles elevados de 5-HT presentan un papel proinflamatorio y contribuyen a la patogénesis de la inflamación intestinal [231]. En un modelo de colitis inducida por DSS, los ratones TpH1 $^{-/-}$ producen niveles más bajos de las citocinas proinflamatorias TNF-α, IL-1β e IL-6 y tienen una infiltración de macrófagos reducida en comparación con los ratones TpH1 $^{+/+}$. Así mismo, en un modelo de colitis inducida por TNBS, los ratones TpH1 $^{-/-}$ mostraron menor gravedad de la enfermedad que los ratones *wild type*. En ensayos con las células dendríticas de ratones TpH1 $^{-/-}$ con colitis inducida por DSS se generaron cantidades mucho más bajas de IL-12p40, acompañado de una menor producción de IL-17 e IFN-γ [249].

La reducción en la expresión y actividad de SERT durante un estado inflamatorio puede atribuirse tanto a los efectos directos de la inflamación como a los factores generados como consecuencia de este proceso. Los ratones SERT $^{-/-}$ con colitis inducida por TNBS muestran condiciones de salud y tasas de supervivencia significativamente menores que los controles sanos. En este modelo de colitis el número de células enterocromafines y los niveles tisulares de 5-HT aumentan con una transcripción de SERT disminuida [250]. En consonancia con estos hallazgos, un estudio reciente mostró una expresión reducida del gen SLC6A4 en el epitelio de pacientes con CD y UC [251].

Estudios recientes indican que la modificación de la actividad de los receptores de serotonina podría ser una estrategia eficaz para controlar la gravedad de la EII y los síntomas asociados [252]. 5-HT tiene la capacidad de modular la señalización inflamatoria mediante el receptor 5-HT_4, presentando tanto propiedades proinflamatorias como antiinflamatorias. En modelos *in vivo* de colitis, la activación del receptor 5-HT_4 en el epitelio del colon mejora la colitis y presenta actividad protectora frente al estrés oxidativo generado en el proceso inflamatorio [253,254]. En condiciones basales, el receptor 5-HT_7 se expresa tanto en neuronas entéricas como en células CD11c del intestino grueso. La expresión del receptor 5-HT_7 aumentó significativamente después de la inducción de colitis en ratones y en regiones intestinales inflamadas de pacientes con

CD [255]. La 5-HT influye a su vez en las acciones de las células inmunes mediante la estimulación de los receptores 5-HT. Las células dendríticas maduras responden a la 5-HT a través de los receptores, 5-HT_3, 5-HT_4 y 5-HT_7 para aumentar la expresión de IL-6. Es evidente que 5-HT influye en la actividad de las células inmunes. Los monocitos estimulados con LPS responden a 5-HT a través de estos receptores para aumentar la secreción de IL-1β, IL-6, IL-8, IL12p40 y TNF-α, además, a través de los receptores 5-HT_1, 5-HT_7, la 5-HT inhibe la apoptosis de los monocitos, que persisten en el tejido y promueven la inflamación [256].

En el contexto de la EII, también se han identificado alteraciones en la inmunidad innata intestinal [257]. Los PRR, tales como TLR2, TLR4 Y NOD2 se han vinculado con el desarrollo de EII, por el reconocimiento disfuncional de la microbiota comensal. La activación de TLR2 y TLR4 regula negativamente la actividad y expresión de SERT en células epiteliales intestinales [258]. La inhibición de SERT, después de la activación de NOD2, aumenta la disponibilidad extracelular de 5-HT e influye en la expresión de NOD2 a través de una regulación por retroalimentación. En este caso, se observa la disminución significativa en la expresión de NOD2 tanto a nivel transcripcional como postranscripcional. Además, se conoce que la activación de NOD2 a través de bacterias induce el aumento de 5-HT y la inhibición de SERT, contribuyendo así a la respuesta inflamatoria contra bacterias. Existe una asociación de NOD2 con TLR2 y TLR4 para activar los sistemas de defensa [259].

Aunque los mecanismos precisos detrás de los efectos proinflamatorios de la 5-HT en la mucosa aún no son claros, es evidente que, una vez iniciada la inflamación, la participación de la 5-HT se intensifica en un ciclo de retroalimentación positiva. La inflamación provoca una regulación negativa de SERT y un aumento en el número de células enterocromafines, lo que probablemente aumentaría aún más la disponibilidad de 5-HT para la señalización.

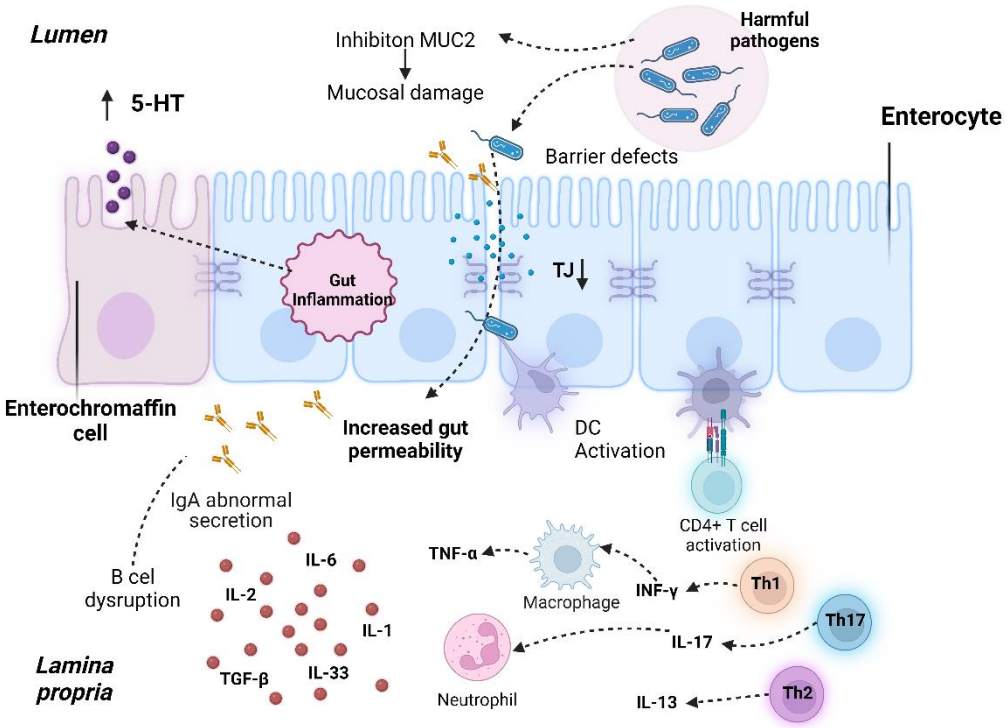


Figura 10. Disbiosis intestinal, respuesta inmune y su efecto en el aumento de 5H-T.

La alteración en la estructura de la barrera intestinal puede conducir a una respuesta inmune alterada y disbiosis intestinal. Este fenómeno contribuye a la patogénesis de la EII, donde el crecimiento excesivo de bacterias patógenas y los defectos de la barrera intestinal provocan una afluencia de componentes bacterianos en la lámina propria, que conduce a la activación de la respuesta inmune. La afluencia de componentes bacterianos, la respuesta inmune adaptativa y el crecimiento excesivo de bacterias dañinas conducen a una mayor permeabilidad intestinal y una disminución de la renovación celular del intestino, lo que resulta en un aumento de 5-HT intestinal que causa un proceso inflamatorio. En la UC prevalece la diferenciación Th2, mientras que en la CD prevalece una respuesta inmune adaptativa Th1 y Th17. ***Abreviaturas: DCs,*** *células dendríticas;* ***IFN-γ,*** *interferón-γ;* ***IL-17,*** *interleucina 17;* ***IL-13,*** *interleucina 13;* ***TNF-α,*** *factor de necrosis tumoral α.* **Ilustración propia creada con biorender.com y adaptado de Peterson et al.** [235].

1.4.2.7. miRNAs en la regulación de SERT

Algunas investigaciones demuestran la implicación de los miRNAs miR-24 y miR-200 sobre la modulación postranscripcional de SERT y su rol en la fisiopatología de la EII [260,261]. En el modelo *in vivo* de ratones con EII inducido por TNBS, se demostró la sobreexpresión de miR-24, lo que lleva a una menor expresión de SERT impidiendo así la recaptación de 5H-T. Este mecanismo contribuye con la progresión de la enfermedad. En este contexto, la inhibición de miR-24 aumentó la expresión de SERT y mejoró el estado inflamatorio [262]. El mRNA de SERT es también una diana directa de miR-200. En un modelo de EII en rata, la transfección con un mimic de miR-200 logró inhibir significativamente la expresión de SERT [263].

1.4.3. PepT-1; Transportador de Péptidos 1 (SLC15A1)

1.4.3.1. Estructura, función y expresión de PepT1

La absorción y digestión de las proteínas de la dieta en la luz intestinal ocurre principalmente en forma de aminoácidos libres y péptidos pequeños. Estos compuestos absorbidos se distribuyen a varios tejidos a través de la sangre, proporcionando los sillares para la síntesis de proteínas y la generación de metabolitos nitrogenados. Mientras que los aminoácidos libres pueden ser absorbidos a través de diversos transportadores de aminoácidos en la membrana apical intestinal, los di y tripéptidos se transportan exclusivamente a través del transportador de oligopéptidos PepT1 [264]

PepT1 pertenece a la familia de cotransportadores de protones-oligopéptidos SLC15A1, los cuales constituyen un sistema de transporte de péptidos de alta capacidad y baja afinidad. La secuencia de DNA del gen humano PepT1 tiene una longitud total de 2263 pares de bases, y su marco de lectura abierto (ORF) abarca 2127 pares de bases, por lo que codifica una proteína de 708 aminoácidos, con un peso molecular aproximado de 78 kDa. La proteína contiene 12 dominios que atraviesan la membrana y un gran dominio extracelular que está altamente conservado [265]. Actualmente se conocen algunos aminoácidos necesarios para la unión y el transporte del sustrato. Estos incluyen el residuo de histidina (H57), cuya mutación afecta directamente la función de PepT1 [266]. Además, los primeros cuatro dominios amino-terminales y el séptimo y noveno dominios transmembrana son necesarios para la unión del sustrato y la funcionalidad del transportador [267]. Se ha identificado en PepT1 unos 200 aminoácidos importantes que contienen siete sitios donde se produce la N-glicosilación y dos posibles sitios de fosforilación dependientes de la proteína cinasa C. PepT1 se expresa principalmente en los microdominios lipídicos de la membrana de las células inmunes y enterocitos en el intestino delgado. También se ha detectado su expresión en el epitelio nasal, células renales, células epiteliales de los conductos biliares y macrófagos. En condiciones fisiológicas, PepT1 se expresa con mayor abundancia en el yeyuno e íleon, y presenta baja expresión en el colon, el estómago o el esófago [268].

1.4.3.2. Reguladores de PepT1

La expresión de PepT1 está regulada principalmente a nivel transcripcional en respuesta a los péptidos derivados del metabolismo proteico. Estudios *in vitro* muestran una regulación positiva de la expresión del gen PepT1 en células Caco-2 tras el tratamiento con dipéptidos sintéticos como Gly-Sar y Gly-Phe [269] y un aumento significativo en la membrana apical de las células Caco-2 al utilizar el dipéptido natural Gly-Gln. Se ha observado que tanto la expresión como la actividad de PepT1 pueden experimentar variaciones en respuesta a diversos factores. Existe una regulación postranscripcional de PepT1 mediada por la proteína que contiene el dominio PDZ, conocida como proteína PDZK1. En este contexto, se observó una notable disminución en la localización de PepT1 en la membrana apical de las células epiteliales del intestino delgado en ratones con el gen PDZK1-KO [265].

También se ha demostrado en células Caco-2 una regulación de PepT1 dependiente la proteína cinasa activada por AMP (AMPK). Cabe resaltar que PepT1 está funcionalmente presente en la membrana de células Caco-2 [265]. Se sabe que Cdx2 regula la transcripción de PepT1. Además, el factor de transcripción Nrf2 activa la transcripción de PepT1, con el consiguiente aumento de los niveles de mRNA y mayor actividad de transporte de PepT1. Estos hallazgos resaltan la complejidad y la interconexión de los mecanismos que controlan la expresión de PepT1 [270].

La investigación sobre la regulación de PepT1 por hormonas es limitada. Las evidencias sugieren que tanto la insulina como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) pueden desempeñar un papel en la regulación de PepT1 [268]. También se ha logrado demostrar el efecto de algunos fármacos como el 5-fluorouracilo en su regulación. En un estudio *in vitro*, el 5-fluorouracilo aumento la expresión y la actividad del transportador de PepT1 por mecanismos que actúan a nivel transcripcional [271]. Algunos antibióticos conducen a una expresión significativamente alta de PepT1 [272].

1.4.3.3. Regulación de PepT-1 por la Microbiota

El aumento de bacterias a nivel de colon produce cantidades significativas de di/tripéptidos que alteran la expresión y función de PepT1 y desencadenan una respuesta inflamatoria importante. En células las epiteliales del intestino, PepT1 transporta N-formilmetionil-leucil-fenilalanina (fMLP), un tripéptido producido por *E. coli*. El transporte de fMLP mediado por PepT1 en células Caco2-BBE aumenta tras la estimulación con IFN-γ [273].

Actualmente se sabe que PepT1 también transporta otros péptidos bacterianos pequeños, como el muramil dipéptido (MDP) y el ácido L-Ala-γ-D-Glu-mDAP (Tri-DAP) (Figura 10). Mientras que MDP está presente en los peptidoglicanos de la pared celular de bacterias Gram-negativas y bacterias Gram-positivas, Tri-DAP se deriva principalmente de la degradación del peptidoglicano de bacterias Gram-negativas. Estas observaciones sugieren que las células epiteliales del colon, en condiciones de inflamación, pueden transportar productos bacterianos como fMLP y MDP, presentes en la luz del colon. Tras la absorción de péptidos pequeños por PepT1 en las células epiteliales intestinales se desencadena una cascada inflamatoria. Por ejemplo, cuando aumenta la absorción de fMLP por las células epiteliales del colon, incrementa la expresión de moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) que puede conducir a una mayor sensibilidad a péptidos bacterianos con posterior activación de vías inflamatorias [273].

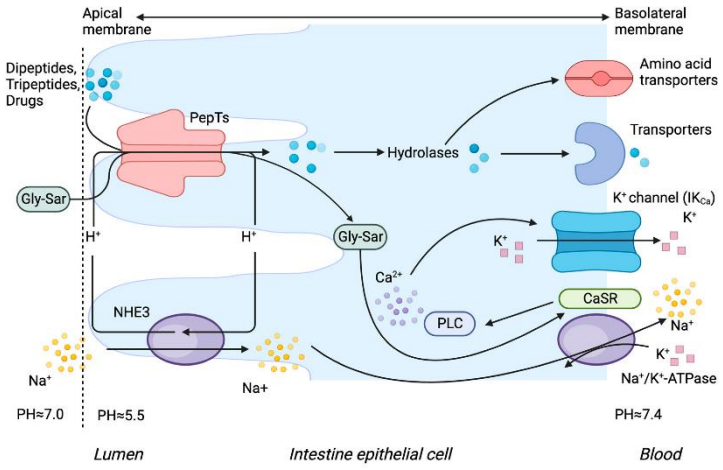


Figura 11. Mecanismo de Transporte de PepT1.

Se ha propuesto que el transporte de dipéptidos y tripéptidos esté acoplado al transporte de protones. La actividad transportadora de lo PepT1 depende de un gradiente electroquímico de protones, durante el cual se intercambian protones y Na +. La actividad de la enzima Na + -K + ATPasa determina la tasa de intercambio iónico. Los dipéptidos y tripéptidos se hidrolizan en el citosol después de ingresar a los enterocitos y luego los aminoácidos libres son transportados al torrente sanguíneo mediante diferentes transportadores de aminoácidos ubicados en la membrana basolateral. **Adaptado de Luo, Y et al.** [274].

El tratamiento de células Caco2- con fMLP promueve la activación de NF-κB y el factor de transcripción AP1. Este efecto también se ha observado tras la estimulación con MDP y Tri-DAP. En otro ensayo Tri-DAP, favorece la activación de la vía de las MAPK y la inducción de la producción de IL-8 en células Caco-2. Estos datos indican que el transporte de péptidos bacterianos a través de las células epiteliales intestinales mediante PepT1 resulta en la activación de vías inflamatorias [275].

Diferentes investigaciones han demostrado que las bacterias y/o productos bacterianos desempeñan un papel en la regulación de la expresión y actividad del gen PepT1. *In vitro*, *E. coli* enteropatógena (EPEC) aumenta la expresión de PepT1 y su actividad de transporte en la línea celular HT29, que normalmente expresa muy bajos niveles de PepT1. Este aumento en la síntesis de PepT1 fue vinculado a la activación del factor de transcripción Cdx2. En un modelo *in vivo*, la infección con *Citrobacter rodentium* estimuló la expresión de PepT1 tanto en el colon proximal como en el distal de ratones. Sin embargo, en cultivos celulares derivados de colon de ratones con sobreexpresión de PepT1 disminuyó la adhesión de *Citrobacter rodentium* [273]. Además, en células Caco-2 el tratamiento con butirato aumentó la expresión y actividad de transporte de PepT1 a través de una vía que involucra la actividad de Cdx2 [276]. En ratones PepT1 −/− se han observado cambios en la localización de las bacterias, una capa mucosa más espesa y un mayor número de células caliciformes, que influyen en la composición de la microbiota intestinal y una menor susceptibilidad a la colitis inducida por DSS, mostrando especial disminución de Firmicutes, Bacteroidetes y Actinobacterias [277]

1.4.3.4. PepT-1 y Enfermedad Inflamatoria Intestinal

En condiciones fisiológicas, en el intestino delgado, las células epiteliales intestinales expresan apicalmente PepT1, para el transporte y absorción de di/tripéptidos de la dieta. Por su parte la presencia de PepT1 es mínima en el colon y aumenta su expresión en la membrana apical de los enterocitos durante la inflamación crónica. Algunos informes apuntan que PepT1 colónico está sobreexpresado en pacientes con enfermedades crónicas como la EII, un hecho posiblemente generado por el incremento

en los niveles de citocinas y mediadores proinflamatorios durante la enfermedad (Figura 11) [268]. Tanto los niveles de TNF-α como de IFN-γ incrementan en pacientes con EII y estas citocinas son capaces de aumentar la expresión de la proteína PepT1 y alterar su función en la línea celular Caco-2 sin generar cambios a nivel de mRNA. Por su parte la interleucina-1 β (IL-1β), aumenta PepT1 a nivel de mRNA y proteína en el colon proximal y distal murino sin afectar la actividad funcional de PepT1. Tras el estímulo de IL-1β, PepT1 no se expresa en la superficie celular, sino que se retiene en un compartimento intracelular [268]. Además, en ensayos inmunohistoquímicos se demostró la expresión aumentada de la proteína PepT1 en la membrana apical de las células epiteliales del colon de pacientes con UC o CD [278].

En un modelo *in vivo* de ratones modificados genéticamente con eliminación de PepT1 (PepT1-/-), se ha demostrado el papel central de este transportador en la etiología de EII. Estos ratones presentan resistencia a la colitis inducida por DSS y cambios en la composición de la microbiota [279]. Además, se conoce que la sobreexpresión de PepT1 en el colon exacerba la colitis experimental [278]. Ya se ha comentado que ciertos SNP que afectan la barrera epitelial intestinal y las interacciones con las bacterias intestinales predisponen a la EII. En este sentido, recientemente se asoció el polimorfismo de hPepT1 (rs2297322, Ser117Asn) con la EII [268]. Las investigaciones anteriores corroboran el aumento en la expresión de PepT1 durante la EII.

Se ha demostrado que PepT1 transporta ligandos específicos para los receptores NOD1 y NOD2 en determinados tipos celulares [280]. NOD1 se activa mediante péptidos que contienen ácido diaminofílico, incluido el sustrato PepT1, Tri-DAP. Un estudio reciente ha demostrado que PepT1 también es responsable de la captación de MDP por parte de las células epiteliales, y esto induce la activación dependiente de NOD2 de la vía de NF-κB con producción posterior de las citocinas proinflamatorias IL-8 y proteína quimioatrayente de monocitos-1 [281]. En un estudio con ratones transgénicos que presentaban un aumento en la expresión de PepT1, tras el tratamiento con DSS, se observó una mayor gravedad de la colitis, junto con un incremento en los niveles de mRNA de citocinas proinflamatorias. También se observó una correlación positiva entre la expresión de NOD, PepT1 y el incremento de la inflamación [282]. Estas investigaciones

sugieren que la actividad del transportador PepT1 juega un papel importante en el aumento de la concentración intracelular de péptidos bacterianos que posteriormente interactúan con NOD2/1 para mediar funciones inflamatorias posteriores.

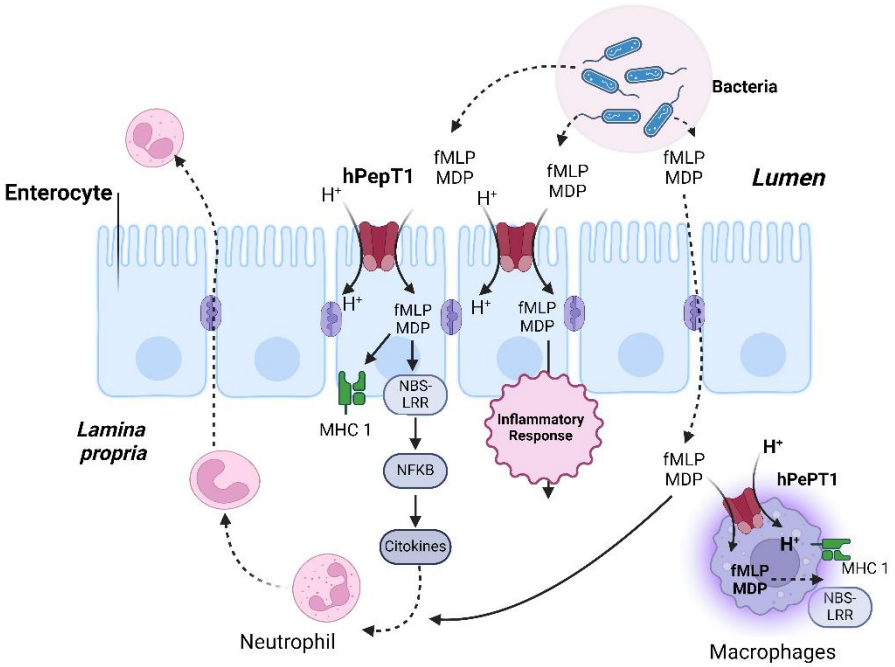


Figura 12. Modelo del papel de PepT1 en la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD).

El modelo indica los productos bacterianos como fMLP y MDP están normalmente presentes en el lumen intestinal. La proteína hPepT1, expresada células epiteliales, transporta estos productos bacterianos al citosol celular. La absorción de estos péptidos bacterianos induce una respuesta inflamatoria que incluye la expresión de MHC I y la secreción de citoquinas, mediante la activación de proteínas NBS-LRR (p. ej., NOD2) y la posterior activación de NF-κB. Estas citoquinas reclutan células del sistema inmune, como los neutrófilos, al sitio de la inflamación. Además, fMLP puede interactuar directamente con células inmunitarias como los macrófagos, que también expresan PepT1. La presencia de fMLP y otros péptidos formilados pequeños pueden también puede participar en la activación de la respuesta inflamatoria. ***Abreviaturas: IBD,*** *Enfermedad Inflamatoria del Intestino.* ***fMLP,*** *Formilmetionil-leucil-fenilalanina.* ***MDP,*** *Muramildipéptido.* ***MHC I,*** *Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase I.* ***NF-κB,*** *Factor Nuclear Kappa B.* ***NOD2,*** *Proteína 2 contenedora de dominio de oligomerización de unión a nucleótidos.* ***NBS-LRR,*** *Sitio de Unión a Nucleótidos-Repetición Rica en Leucina.* **Ilustración propia creada con biorender.com y adaptado de Charrier L, et al.** [283].

1.4.3.5. miRNAs en la regulación de PepT-1

Dada la importancia de PepT1 y su papel en la EII, las investigaciones apuntan a esclarecer los mecanismos postranscripcionales implicados en su regulación. Un ensayo en células Caco2, demostró que miR-92b se une directamente a la región 3′-UTR del mRNA de PepT1 regulando negativamente su expresión, señalando a su vez a miR-92b como supresor de las respuestas proinflamatorias inducidas por péptidos bacterianos en las células epiteliales intestinales al inhibir la expresión de PepT1 [284]. Otro miRNA involucrado en la patogénesis de la EII es miR-193a-3p. Se ha demostrado que existe una correlación inversa entre PepT1 y miR-193a-3p en tejidos de colon inflamados con UC activa. En un modelo de ratones con colitis inducida por DSS, el tratamiento con miR-193a-3p redujo la expresión y actividad de PepT1 y posteriormente inhibió la vía de NF-κB. Por otra parte, la sobreexpresión de PepT1 colónico en este modelo, suprimió el efecto antiinflamatorio de miR-193a-3p. Estos hallazgos sugieren que la regulación de PepT1 por miR-193a-3p media la absorción de productos bacterianos y tiene un rol importante en la inflamación colónica [285]. Tanto miR-193a-3p como miR-92b son reguladores de PepT1 colónico y favorecen el mantenimiento de la homeostasis intestinal.

1.5. ESTRATEGIAS TERAPEUTICAS EN LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL BASADAS EN EL MICROBIOMA

La comunidad científica avanza gradualmente hacia la medicina personalizada, y el microbioma es un objetivo importante en el futuro de la medicina y los enfoques nutricionales. La interconexión entre disbiosis intestinal, alteración de la barrera y respuestas inmunes exacerbadas proporciona la base para el diseño de estrategias terapéuticas orientadas al microbioma para restaurar la homeostasis intestinal en pacientes con EII. Una de esas estrategias es la manipulación de la composición y función de la microbiota intestinal mediante intervenciones basadas en probióticos. Los ensayos clínicos han demostrado que el probiótico *Escherichia coli* Nissle 1917 muestra una eficacia comparable a la del fármaco comúnmente utilizado mesalazina para mejorar los síntomas clínicos de la EII [286].

1.5.1. *Escherichia coli* Nissle 1917

Escherichia coli Nissle 1917 (serotipo 06: K5:H1; depositada en DSMZ, Alemania como DSM6601) es un probiótico Gram-negativo, disponible comercialmente en Alemania como componente activo de Mutaflor (Ardeypharm GmbH, Herdeckem Alemania) y en Italia como EcN [287]. Esta cepa, se aisló por primera vez durante la primera guerra mundial por el Doctor Alfred Nissle (1917) a partir de las heces de un soldado que no desarrolló el brote de shigelosis que afectó a sus compañeros de batallón [288].

Escherichia coli Nissle 1917 (EcN) pertenece a la familia de las enterobacterias y está incluida en el subgrupo filogenético *de E. coli* B2. Tiene estatus GRAS (generalmente reconocido como seguro). Su genoma contiene 5324 genes y de ellos, 108 son específicos de cepa y responsables de sus características probióticas [288]. Los estudios genómicos han demostrado su origen a partir de un ancestro común a cepas *E.coli* uropatógenas, que tras los procesos evolutivos se perdieron factores de virulencia y se conservaron una gran variedad de genes que codifican factores *fitness* que favorecen su competitividad y supervivencia a nivel intestinal. Entre los factores fitness expresados por EcN están, microcinas, diferentes sistemas de captación de hierro (enterobactina, yersiniabactina, aerobactina, salmoquelina, EfeU, ChuA), adhesinas y proteasas que lo convierten en un buen colonizador del sistema gastrointestinal y contribuyen a su carácter probiótico [289].

EcN coloniza el intestino en pocos días y permanece como microbiota colónica durante meses después de la administración [290]. La expresión de múltiples sistemas de absorción de hierro proporciona una ventaja a EcN en el entorno intestinal, ya que este metal es limitante en el intestino y es esencial para el crecimiento bacteriano. El flagelo de EcN es el principal antígeno activador del sistema inmunológico y actúa como propulsor *in vivo*, que le permite competir eficientemente con los patógenos por los sitios de unión en el tejido del huésped [291]. EcN también activa la producción de beta-defensinas por parte de las IEC impidiendo la adherencia de patógenos como *E. coli* AIEC [292] . Además, la producción de las microcinas H47 y M les confieren una actividad antibacteriana frente a especies estrechamente relacionadas. Estas microcinas, además favorecen la captación de hierro por parte de EcN frente a otras especies como *Salmonella* spp. [290].

EcN produce moléculas con efectos inmunomoduladores, entre ellas, el antígeno flagelina H1. Su reconocimiento por TLR5 desencadena la activación de IL-8 [293]. La flagelina también induce la secreción de β-defensinas a través de la activación de NF-KB y AP-1 [294]. Se ha demostrado la desregulación de β-defensinas en la UC y el efecto positivo de EcN en esta condición [292]. La capsula K5 de EcN también tiene un papel importante al promover la inducción de MyD88 y TRIF tras la activación de TLR5 [295]. En un modelo *in vitro*, la interacción de EcN con las células inmunes resultó en una disminución de las citoquinas proinflamatorias IL-2, TNF-α, IFN-γ, IL-6, IL-1β, mientras que se observó un aumento de las citoquinas antiinflamatorias IL-10 y TGF-β [296]. Esta cepa probiótica también está implicada en el fortalecimiento de las proteínas de unión estrecha y el refuerzo de la integridad de la barrera epitelial, regulando al alza la expresión y función de las proteínas ZO-1, Claudina-2 y Claudina-14 (Figura 12)[173].

En la actualidad EcN es uno de los pocos probióticos autorizados como medicamento para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales y también una de las cepas probióticas mejor estudiadas por sus propiedades inmunomoduladores y antinflamatorias [287,297,298]. Diversas investigaciones han demostrado la eficacia de EcN en las enfermedades inflamatorias intestinales en modelos *in vivo* con ratones, además de ensayos clínicos en humanos. EcN se emplea en el tratamiento de pacientes

con EII especialmente en la UC [299,300]. A pesar de las características y beneficios anteriormente descritos de EcN, la administración de probióticos viables conlleva ciertas limitaciones y críticas, especialmente en personas con un sistema inmunológico debilitado. En estos casos, el tratamiento con probióticos podría exacerbar las respuestas inflamatorias y convertir bacterias probióticas inofensivas en microorganismos perjudiciales. Para evitar riesgos de seguridad, las nuevas terapias basadas en el microbioma se dirigen al uso de postbióticos [164].

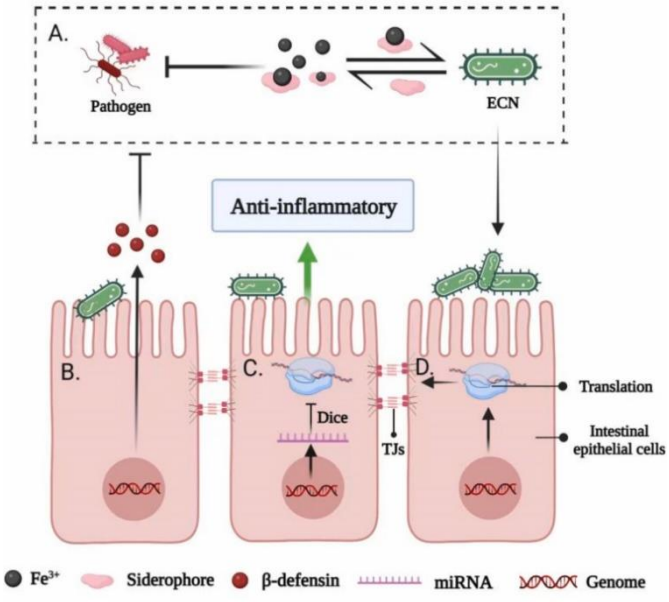


Figura 13. Efecto antiinflamatorio de EcN sobre IEC en EII.

EcN alivia la inflamación de cuatro formas distintas: ***A|*** *Efecto indirecto al competir con las bacterias patógenas por el elemento hierro, inhibiendo así su crecimiento;* ***B|*** *Estimular la producción de péptidos antimicrobianos por las células epiteliales intestinales. La ß-defensina bloquea las bacterias dañinas y, por lo tanto, inhibibe indirectamente la inflamación;* ***C|*** *Promover la producción de miRNA por las células epiteliales e inhibir la expresión de factores proinflamatorios;* ***D|*** *Estimular las células epiteliales para reparar la TJ y reducir la permeabilidad intestinal.* **Adaptado de Chen H, et al.**[301].

1.5.2. Postbióticos

Según la reciente definición de la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos (ISAPP), el término postbiótico se refiere a una preparación de microorganismos inanimados (no replicativos) o sus componentes que confieren un beneficio para la salud del huésped. Se incluyen componentes de membranas bacterianas, biomoléculas, metabolitos y compuestos bioactivos secretados [302]. Los postbióticos suelen mostrar una buena absorción, distribución y una alta capacidad de señalización en diferentes órganos y tejidos para desencadenar respuestas específicas del huésped. Su eficacia ha sido probada para componentes derivados de probióticos conocidos [161,303].

Los diferentes tipos de postbióticos se distinguen por su efecto local o sistémico, por sus componentes o por la cepa bacteriana de la que proceden [304,305]. Las ventajas en su uso radican principalmente en evitar el riesgo que implica el uso de probióticos en pacientes inmunodeprimidos [131]. Varias investigaciones argumentan un mayor perfil de seguridad y mejores beneficios de los postbióticos [131,306,307]. Los probióticos pueden transferir genes de resistencia a antibióticos y su colonización intestinal perjudica el retorno del microbioma autóctono [308,309]. Por otra parte, el procesamiento, estandarización y obtención de postbióticos es más eficiente. Además, la alta estabilidad permite su aplicación en una amplia variedad de productos farmacéuticos y alimentos funcionales. La producción de postbióticos abarca diversas técnicas como son el tratamiento enzimático, la sonicación, la aplicación de calor, centrifugación, filtración, diálisis, liofilización y purificación en columna. Tras su obtención se suelen emplear procedimientos según la necesidad de caracterización cualitativa o cuantitativa, así como de la naturaleza de las moléculas a identificar, tales como MALDI-TOF MS, HPLC, UPLC, LC-MS y LC-MSMS entre otras [310,311].

1.5.2.1. Vesículas Extracelulares (EVs) de probióticos y microbiota.

En este contexto, las vesículas extracelulares (EVs) derivados de cepas probióticas y de la microbiota intestinal están surgiendo como excelentes candidatos a nuevos postbióticos [312,313]. Todas las bacterias liberan EVs como mecanismo de comunicación entre especies [314,315]. Dado que a nivel intestinal la capa mucosa impide la comunicación directa de la microbiota con el huésped, dicha interacción depende de factores secretados [316].

Las EVs de bacterias son estructuras de bicapa lipídica a nanoescala (tamaño de entre 20 y 300 nm), originadas a partir de las membranas celulares tanto de bacterias Gram-positivas como Gram-negativas. Estas estructuras encierran componentes biológicos producidos por la cepa parental, incluidos MAMP, proteínas, metabolitos, DNA y RNA y en el caso de bacterias patógenas, toxinas y factores de virulencia [317]. Los esfuerzos de investigación en este campo han proporcionado evidencia científica de que las EVs median las funciones de la microbiota al transportar y entregar a las células huésped moléculas efectoras que modulan las vías de señalización del huésped y los procesos

celulares, como son las respuestas inmunes y de defensa, entre otros. Los efectos ejercidos por las EVs de la microbiota son específicos de la cepa, ya que dependen de su origen y carga bacteriana [106,318]. Las EVs derivadas de la microbiota en la luz intestinal se difunden a través de la capa de mucus e interactúan con células epiteliales e inmunes a través de sus PRR. Las EVs se internalizan por endocitosis entregando los componentes que la constituyen (MAMP/DNA, RNA, PGN), los cuales generan la activación de receptores y vías de señalización. Esta estimulación constante mantiene una inflamación basal controlada que contribuye a la defensa frente a patógenos y a la homeostasis intestinal (Figura 14) [319].

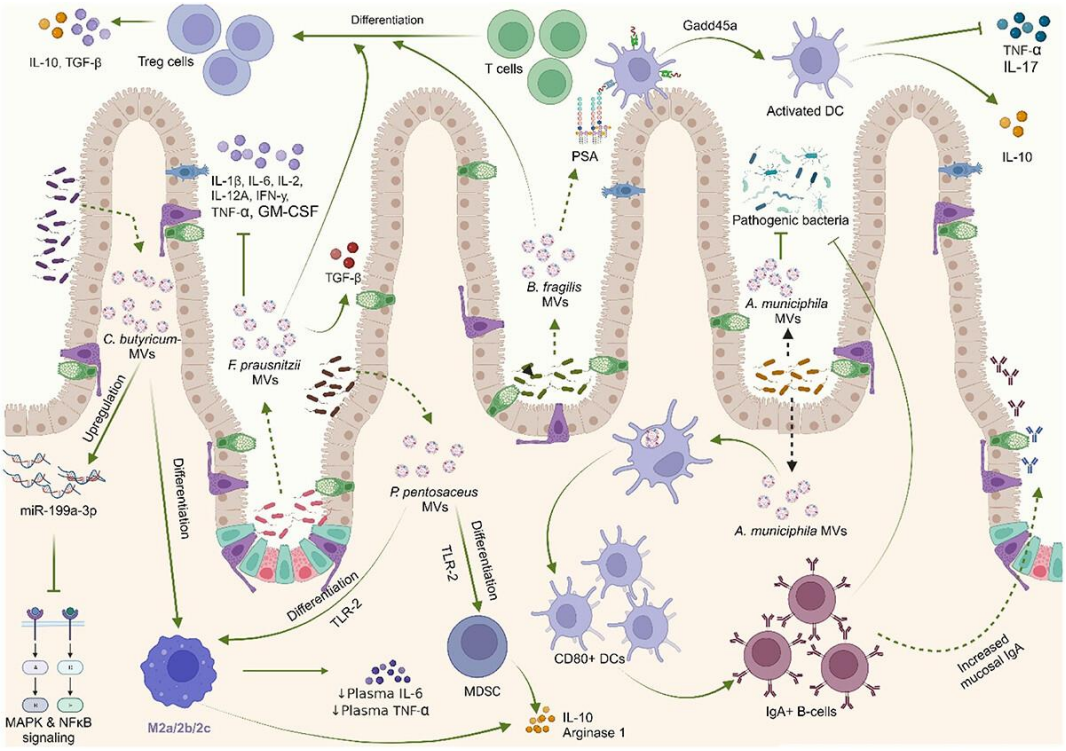


Figura 14. Las EVs bacterianas modulan el sistema inmunitario en condiciones de EII para mejorar la función de la barrera inmunitaria intestinal.

Los MVs de C. butyricum restauraron la expresión miR-199a-3p, que se dirige a map3k4, suprimiendo las vías de señalización proinflamatorias MAPK y NF-κB. Estos MVs también polarizaron los macrófagos al fenotipo M2 y redujeron significativamente los niveles plasmáticos de LPS, IL-6 y TNF-α. Los MVs de F. prausnitzii aumentaron las células T-reg, regulando a la baja la expresión de citoquinas proinflamatorias y al alza las citocinas antiinflamatorias. Las MVs de A. muciniphila provocaron una respuesta de inmunoglobulina A de la mucosa mediante la translocación a las placas de Peyer y luego la activación de las células DCs previenen la invasión de patógenos. La interacción de las DCs con las MVs capsulares que contienen polisacárido A de B. fragilis a través de la proteína inducible por detención del crecimiento y daño por DNA previno la colitis mediante la supresión del TNF-α y la IL-17 y el aumento de la secreción de IL-10. Los MV derivados de P. pentosaceus promovieron la polarización

de macrófagos similares a M2 y la diferenciación de células supresoras derivadas de mieloides, lo que provocó un aumento de la expresión de IL-10 y arginasa-1 de las células diferenciadas. Tomado de Olovo CV, et al. [320].

Las bacterias Gram-negativas generan diferentes tipos de EVs [315,321] el tipo principal deriva de la membrana externa y se denominan "vesículas de la membrana externa" (OMV) [321,322]. Estas se originan por evaginación de la membrana externa y engloban LPS, fosfolípidos y biomoléculas periplásmicas [323,324]. Las bacterias Gram-negativas también producen otro tipo de vesículas, denominadas vesículas de membrana externa-interna (I-OMV), a través de mecanismos diferentes basados en la lisis explosiva. Las I-OMV contienen membrana interna y componentes citoplasmáticos. A diferencia de las bacterias Gram-negativas, las Gram-positivas tienen una capa externa gruesa y rígida de peptidoglicano, y sus EVs son denominadas "vesículas de membrana citoplasmática" (CMVs) [325], las cuales carecen de LPS y componentes periplásmicos, pero transportan moléculas de carga similares a los EVs Gram-negativos [326]. Es importante resaltar que según las directrices MISEV 2018 se recomienda el uso de "vesícula extracelular" (EV) como término genérico para las partículas liberadas por la célula que están delimitadas por una bicapa lipídica y no pueden replicarse (Figura 15) [327].

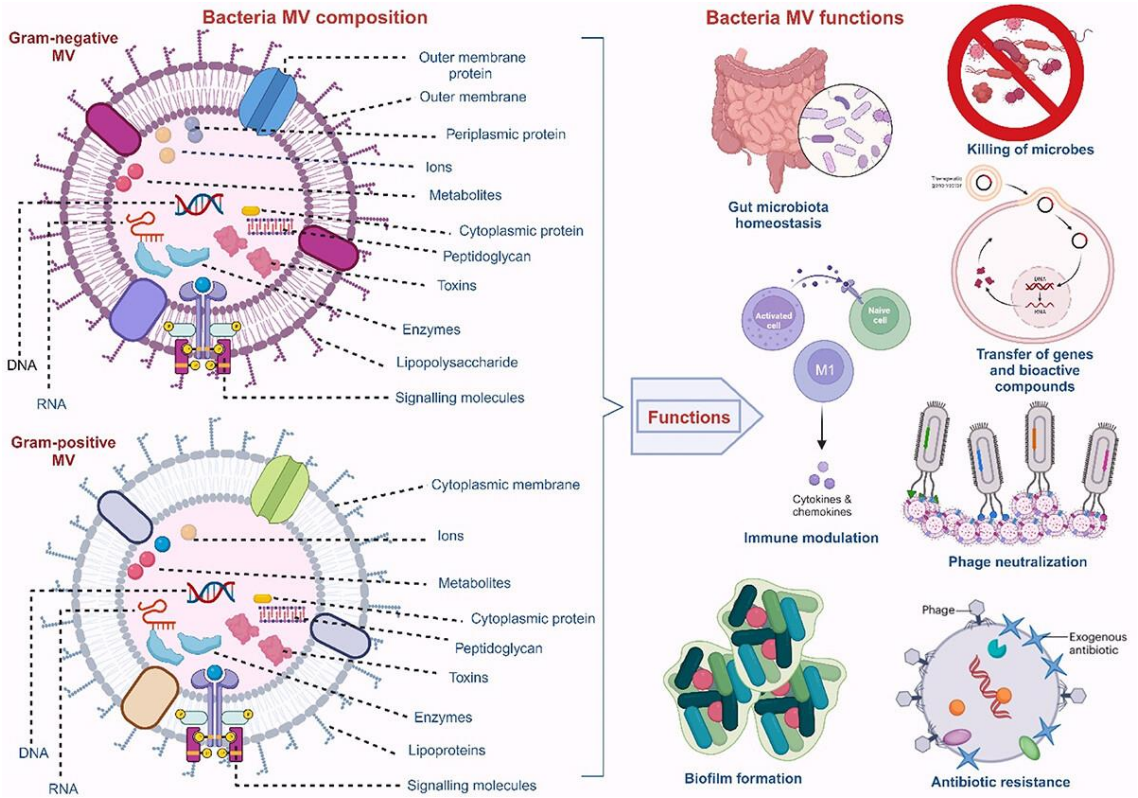


Figura 15. Composición y funciones de los EVs de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

Las cargas de MV de las bacterias Gram-negativas difieren ligeramente de las de las Gram-positivas. Las funciones representadas incluyen la formación de biopelículas, la resistencia a los antibióticos, la neutralización de fagos, la modulación inmunitaria, la transferencia de genes, la eliminación de microorganismos y la homeostasis de la microbiota intestinal. **Tomado de Olovo CV, et al.** [320]

En este contexto, los estudios de nuestro grupo han demostrado que EVs de cepas probióticas y comensales de *E. coli* modulan la función de barrera epitelial [173,328] y activan mecanismos reguladores para mantener el equilibrio de las respuestas anti y pro-inflamatorias [121,329]. Las EVs de cepas *E. coli* intestinales estimulan las células dendríticas para impulsar respuestas específicas de las células T a través de varios mecanismos que incluyen la activación de vías de señalización de TLR, la regulación de la expresión de miRNAs y la liberación diferencial de mediadores inmunitarios a través de exosomas [106,330]. Además, las propiedades beneficiosas de las EVs del probiótico EcN se han demostrado en modelos murinos de inducción de colitis por DSS. La administración oral de EVs de EcN mejoró los síntomas de la colitis, la permeabilidad intestinal y la respuesta inflamatoria de la misma manera que el probiótico [226]. En este modelo, las

EVs de EcN contrarrestaron la expresión alterada de marcadores de refuerzo y reparación de la barrera epitelial y regularon la expresión de citoquinas hacia un perfil antinflamatorio, reduciendo la expresión de citocinas proinflamatorias IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-12, IL-17 e INF-y y favoreciendo el aumento de la citocina antiinflamatoria IL-10 [329]. También mejoró la diarrea, los síntomas clínicos y la inmunidad contra la infección por rotavirus en un modelo de ratas neonatales [331].

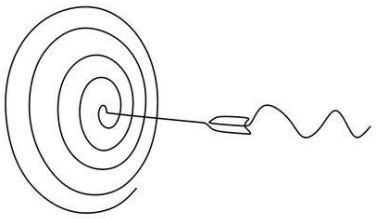
En un modelo de disfunción de la barrera epitelial inducida por infección con *E. coli* enteropatógena (EPEC), las EVs de EcN pudieron proteger la integridad de la barrera epitelial contra la infección por EPEC activando mecanismos reguladores compensatorios a nivel transcripcional y postranscripcional que afectan a las proteínas de unión estrecha, ocludina, claudina-14 y ZO-1 [332]. En explantes de colon humano, las EVs de EcN activan la expresión de IL-22, preservando la integridad de la barrera epitelial [329].

Otros estudios *in vivo* en modelos murinos de EII han demostrado que la administración oral de EVs de probióticos *Clostridium butyricum* [333], o de microbiota intestinal beneficiosa como *Bacteroides fragilis* [334] o *Akkermansia muciniphila* [335], mejoran la función de barrera intestinal a través de varios mecanismos que incluyen la modulación de las respuestas inflamatorias e inmunitarias, fortalecimiento de proteínas de unión estrecha, y proteínas relacionadas con la mucina [336]. Aunque se ha avanzado en esta temática (Tabla 3), son necesarias más investigaciones que permitan dilucidar el papel de los postbióticos, y en particular de las EVs de probióticos en el tratamiento de la EII.

S/N	Bacterias parentales	Impacto en el host	Modelo
1	*L. casei* y *L. plantarum*	Mejora de la resistencia eléctrica transepitelial; Reducción de citoquinas IL-8 y TNF-α y estimulación significativa de IL-10	*In vitro*
2	*L. kefirgranum* PRCC-1301	Inhibió la pérdida de las proteínas de unión estrecha ocludina, claudina-1 y ZO-1; inhibió la vía de señalización NF-κB Niveles reducidos de IL-2, IL-8 y TNF-α	*In vivo*
3	*C. butyricum*	Mejoró la secreción de mucinas (MUC1, 2, 3 y 4) y claudina 1, 3 y ZO-1; Remodeló positivamente la microbiota intestinal; niveles reducidos de IL-6 y TNF-α; macrófagos polarizados al fenotipo M2	*In vivo*
4	*A. muciniphila*	Estimulación de ZO-1 y moco, IL-6 reducida. Remodelación positiva de la microbiota intestinal; Promoción selectiva del crecimiento de bacterias beneficiosas a través de la fusión de membranas; mejora de la secreción de IgA en la mucosa a través de la activación de las células CD y B en los parches de Peyer, lo que mejora la función de la barrera inmunitaria intestinal	*In vivo* e *In vitro*
5	*E. coli* Nissle 1917	Mejora de la función de barrera epitelial Reducción de IL-1β, TNF-α e IL-17	*In vivo*
7	*L. paracasei*	Regulación al alza de las proteínas asociadas al estrés del retículo endoplásmico (RE) Regulación a la baja de las citoquinas proinflamatorias, aumento de la expresión de citocinas antiinflamatorias	*In vitro* e *in vivo*
8	*L. rhamnosus* GG	Aumento de la diversidad de α bacterianas y restauración del desequilibrio taxonómico de la microbiota intestinal; expresiones reducidas de TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-2	*In vivo*
9	*L. plantarum* Pregunta 7	Aumento de la diversidad de α bacterianas y restauración del desequilibrio taxonómico de la microbiota intestinal; Expresiones reducidas de TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-2	*In vivo*
10	*L. plantarum*	Remodelación de la microbiota intestinal y aumento de la abundancia de AGCC en el colon; promovió la polarización de los macrófagos al fenotipo M2	*In vivo*
11	*B. fragilis*	Reducción de la expresión de TNF-α e IL-17 y aumento de la secreción de IL-10. Estimuló la producción de IL-10 a partir de células T-reg	*In vivo*
12	*P. freudenreichii*	Reducción de NF-$_k$Activación de B y expresión de IL-8	*In vitro*
13	*P. pentosaceus*	Suprimió las respuestas humorales y celulares específicas de Ag y promovió la polarización tipo M2 y la diferenciación MDSC; Regulación al alza de la IL-10	*In vitro*
14	*B. thetaiotamicron*	Regulación al alza de la IL-10	*In vivo*
15	*F. praustnitzii*	Reguló al alza las expresiones de ZO-1, ocludina, IL-10,	*In vivo*

Tabla 3. Posibles aplicaciones terapéuticas de las EVs en la EII.

Esta tabla resume diferentes estudios que han mostrado una fuerte evidencia de la posible aplicación de los EVs con fines terapéuticos en la EII. Tomado de Olovo CV, et al. [320].



2. OBJETIVOS

La EII es una afección inflamatoria crónica que implica respuestas inmunitarias desreguladas y desequilibrios en la microbiota intestinal en individuos genéticamente susceptibles. La alteración de la permeabilidad paracelular en estos pacientes permite que las bacterias intestinales y sus componentes lleguen a la lámina propia, activen el sistema inmune y generen respuestas inmunes exacerbadas. Las terapias actuales para la EII presentan efectos secundarios significativos y una respuesta limitada en algunos pacientes, lo que genera la necesidad de hallar nuevas estrategias terapéuticas. La estrecha relación entre la microbiota intestinal y la salud fomenta el desarrollo de estrategias nutricionales y terapéuticas dirigidas al microbioma para restaurar la homeostasis intestinal y promover perfiles antiinflamatorios y de reparación de la mucosa.

Dentro de las terapias bióticas para la EII se incluyen los probióticos, como *Escherichia coli* Nissle 1917. Aunque los probióticos han sido utilizados para equilibrar la microbiota intestinal, su uso presenta riesgos para personas inmunodeprimidas. Para mitigar estos riesgos, las terapias futuras se centran en postbióticos. Las EVs de microorganismos intestinales beneficiosos están emergiendo como posibles postbióticos, si bien es necesario realizar investigación básica para comprender los mecanismos moleculares involucrados, antes de su aplicación en salud humana. Nuestro grupo se ha centrado en entender como las EVs de la microbiota modulan genes y miRNAs alterados en la EII, específicamente relacionados con el péptido TFF3, los genes del sistema serotoninérgico y el trasportador de di/tripeptidos PepT-1. Para ello, se han aplicado modelos celulares adecuados en cada ensayo. En este sentido, se ha utilizado la línea celular Caco-2 como modelo de células del epitelio intestinal y la línea celular LS174T como modelo de células caliciformes. Nuestro modelo de microbiota es *Escherichia coli*, una especie colonizadora natural del intestino y en particular el probiótico EcN y la cepa comensal EcoR12, que ha demostrado ser un comensal no citotóxico.

Teniendo en cuenta los antecedentes anteriores, esta tesis tiene como objetivo principal **Evaluar los mecanismos moleculares que subyacen al efecto de las EVs de probióticos y microbiota comensal en la modulación de genes y miRNAs desregulados en la EII.**

Con esta finalidad se plantearon los siguientes **Objetivos Específicos** que han sido enumerados según los capítulos que se presentan en esta tesis:

1. Evaluar los mecanismos moleculares implicados en la modulación de la integridad y reparación de la barrera intestinal por EVs del probiótico EcN y de la cepa comensal EcoR12 mediante la regulación diferencial de **miR-7-5p** y su gen diana **TFF3** en células caliciformes LS174T.
2. Estudiar la modulación de genes relacionados con el **sistema serotoninérgico** por EVs del probiótico EcN y el comensal EcoR12 en un modelo de inflamación inducida por IL-1β en células epiteliales intestinales Caco-2 y evaluar la capacidad de las EVs de regular los miRNAs alterados en EII que modulan la expresión de **SERT**, en concreto **miR-24 y miR-200**.
3. Evaluar la capacidad de las EVs de EcN y EcoR12 para contrarrestar y/o prevenir la expresión alterada del transportador **PepT1** en condiciones inflamatorias mediante la regulación de **miR-92b** y **miR-193a-3p** en células Caco-2.



3. CAPÍTULO 1

Modulación de la integridad y reparación de la barrera intestinal por EVs de la microbiota mediante la regulación diferencial de TFF3 en células caliciformes LS174T.

Modulation of the Intestinal Barrier Integrity and Repair by Microbiota Extracellular Vesicles through the Differential Regulation of Trefoil Factor 3 in LS174T Goblet Cells

Yenifer Olivo-Martínez [1,2,3], Manel Bosch [4], Josefa Badia [1,2,3,†] and Laura Baldomà [1,2,3,*,†]

[1] Secció de Bioquímica i Biologia Molecular, Departament de Bioquímica i Fisiologia, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

[2] Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Barcelona, Spain

[3] Institut de Recerca Sant Joan de Déu (IRSJD), Barcelona, Spain

[4] Unitat de Microscòpia Òptica Avançada, Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

- Nutrients 2023, 15, 2437
- https://doi.org/10.3390/nu15112437
- ISSN 2072-6643
- **Journal Rank:** JCR - Q1 (*Nutrition & Dietetics*) / CiteScore - Q1 (*Nutrition and Dietetics*)
- **Impact Factor:** 5.9 (2022); 5-Year Impact Factor: 6.6 (2022)

CAPITULO 1

Los resultados fueron presentados en:

Olivo-Martínez Y, Martínez-Ruiz S, Badía J, Baldoma L. Regulation of TFF3 signaling pathways by probiotic and commensal E. coli vesicles. Revista Anales de Microbiota, Probióticos y Prebióticos, vol. 4, nº1. 2023. https://semipyp.es/wpcontent/uploads/2023/03/AMPP-4-1.pdf. **Poster**

Y. Olivo, J. Badía Palacín, L. Baldomà Llavinés. Membrane vesicles from the probiotic Escherichia coli Nissle 1917 increase TFF3 expression by modulating TLR2 and miR7- 5p. III Jornada de Microbiología de la SCB 2022. https://scb.iec.cat/wpcontent/uploads/2022/05/Draftprogram-Micro-SCB-2022v1.pdf. **Comunicación oral**

Olivo Martínez Y, Martínez Ruiz S, Cordero Alday C, Badia J, Baldoma L. Modulation of TFF3 by vesicles of the probiotic Escherichia coli Nissle 1917 in intestinal epithelial cells. Revista Anales de Microbiota, Probióticos y Prebióticos, vol. 3, nº2. 2022. https://semipyp.es/wpcontent/pdf/AMP&P_vol3_num2.pdf. **Poster**

RESUMEN

Introducción

TFF3 desempeña un papel clave en el mantenimiento y reparación de la mucosa intestinal. La expresión de TFF3 es regulada al alza por la microbiota a través de TLR2. A nivel postranscripcional, TFF3 está regulado a la baja por miR-7-5p. Se han detectado niveles reducidos de TFF3 en el tejido dañado de pacientes con EII.

Objetivo y Metodología

En este trabajo, investigamos la regulación de la expresión de TFF3 por las vesículas extracelulares (EVs) de la microbiota en células caliciformes LS174T mediante RT-qPCR e inhibidores de las vías TLR2 o PI3K. Para evaluar el impacto posterior en la función de barrera epitelial, se utilizaron medios condicionados de células LS174T de control y estimuladas por vesículas para tratar las monocapas de Caco-2. Los efectos de fortalecimiento de la barrera se evaluaron mediante el análisis de la expresión y distribución subcelular de las proteínas de unión estrecha, y los efectos reparadores se evaluaron mediante ensayos de cicatrización de heridas.

Resultados

Los resultados mostraron una regulación diferencial de TFF3 en LS174T a través de las EVs del probiótico EcN y el comensal EcoR12. Las EVs de EcN activaron la producción de TFF3 a través de TLR2 y regularon a la baja miR7-5-p a través de PI3K. Consistentemente, los altos niveles de TFF3 secretado reforzaron las uniones estrechas y estimularon la cicatrización de heridas en las células Caco-2. Las EVs de EcoR12 no causaron estos efectos.

Conclusiones

TFF3 es una potencial diana terapéutica en la EII. Este estudio contribuye a comprender los actores moleculares (EVs de la microbiota) que conectan los microorganismos intestinales con la salud y puede ayudar a diseñar mejores intervenciones nutricionales basadas en compuestos bioactivos de la microbiota.

nutrients

MDPI

Article

Modulation of the Intestinal Barrier Integrity and Repair by Microbiota Extracellular Vesicles through the Differential Regulation of Trefoil Factor 3 in LS174T Goblet Cells

Yenifer Olivo-Martínez [1,2,3], Manel Bosch [4], Josefa Badia [1,2,3,†] and Laura Baldomà [1,2,3,*,†]

[1] Secció de Bioquímica i Biologia Molecular, Departament de Bioquímica i Fisiologia, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; josefabadia@ub.edu (J.B.)
[2] Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), 08028 Barcelona, Spain
[3] Institut de Recerca Sant Joan de Déu (IRSJD), 08950 Barcelona, Spain
[4] Unitat de Microscòpia Òptica Avançada, Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; mbosch@ub.edu
* Correspondence: lbaldoma@ub.edu
† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Trefoil factor 3 (TFF3) plays a key role in the maintenance and repair of intestinal mucosa. TFF3 expression is upregulated by the microbiota through TLR2. At the posttranscriptional level, TFF3 is downregulated by miR-7-5p. Reduced TFF3 levels have been detected in the damaged tissue of IBD patients. Here, we investigate the regulation of TFF3 expression by microbiota extracellular vesicles (EVs) in LS174T goblet cells using RT-qPCR and inhibitors of the TLR2 or PI3K pathways. To evaluate the subsequent impact on epithelial barrier function, conditioned media from control and vesicle-stimulated LS174T cells were used to treat Caco-2 monolayers. The barrier-strengthening effects were evaluated by analysing the expression and subcellular distribution of tight junction proteins, and the repairing effects were assessed using wound-healing assays. The results showed a differential regulation of TFF3 in LS174T via EVs from the probiotic EcN and the commensal ECOR12. EcN EVs activated the TFF3 production through TLR2 and downregulated miR7-5-p through PI3K. Consistently, high levels of secreted TFF3 reinforced the tight junctions and stimulated wound healing in the Caco-2 cells. ECOR12 EVs did not cause these effects. TFF3 is a potential therapeutic target in IBD. This study contributes to understanding the molecular players (microbiota EVs) connecting gut microbes to health and may help in designing better nutritional interventions based on microbiota bioactive compounds.

Keywords: gut microbiota; postbiotics; extracellular vesicles; inflammatory bowel disease; intestinal barrier; mucosa healing

check for updates

Citation: Olivo-Martínez, Y.; Bosch, M.; Badia, J.; Baldomà, L. Modulation of the Intestinal Barrier Integrity and Repair by Microbiota Extracellular Vesicles through the Differential Regulation of Trefoil Factor 3 in LS174T Goblet Cells. *Nutrients* **2023**, *15*, 2437. https://doi.org/10.3390/nu15112437

Academic Editors: Paola Checconi and Roberto Castiglione

Received: 27 April 2023
Revised: 17 May 2023
Accepted: 19 May 2023
Published: 24 May 2023

Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Intestinal homeostasis and human health greatly depend on the gut microbiota. This complex microbial community contributes to the essential host functions in nutrient and drug metabolism, the development and modulation of the immune system, the maintenance and modulation of mucosal barrier integrity, and protection against pathogen colonization [1]. Microbiota functions are not restricted to the gastrointestinal tract. There is now evidence that the gut microbiota and their metabolites communicate with extraintestinal organs and tissues through several routes [2,3]. Imbalances in the gut microbiota's composition and function have been associated with a diversity of chronic diseases, including not only intestinal inflammatory disorders, but also autoimmune, metabolic, and neurological illnesses [4]. These findings encourage microbiome-oriented therapeutic approaches to treat dysbiosis-related diseases. In addition to probiotics (alone or as symbiotics), the administration of bioactive compounds produced by probiotics or gut-beneficial bacteria has gained increasing interest in recent years [5,6].

The intestine surface is the primary interface between the microbiota and host. This surface is built from a single layer of epithelial cells covered by a mucus layer, which acts as a physical and chemical barrier to prevent luminal bacteria from reaching the epithelial cells. This layer is composed mostly of mucin glycoproteins (MUC2 in the colon) and contains antimicrobial peptides and IgA secreted by the epithelial and immune cells of the intestinal mucosa [7,8]. Therefore, communication with the host cells principally depends on the microbiota-secreted factors that can pass through the mucus layer. These factors include metabolites, secreted proteins, and extracellular vesicles (EVs) [9].

Bacterial EVs are closed, spherical nanostructures derived from the bacterial membrane that allow for the transport and delivery of active bacterial effectors to distal sites in a protected environment provided by the vesicle membrane. They have a great variety of functions that are essential for bacterial survival and the colonization of particular ecological niches [10]. In addition, bacterial EVs are involved in interaction and intercellular communication with the host. Microbiota EVs carry biomolecules produced by the parent bacteria. These include typical microbe-associated molecular patterns (MAMPs) that interact with the immune receptors, known as pattern-recognition receptors (PRRs), of epithelial and immune cells to activate defence and immune responses [11]. Other cargo molecules are proteins, lipids, metabolites, and nucleic acids. Importantly, bacterial EVs can cross the intestinal mucus layer and are internalized by intestinal epithelial cells (IECs) through endocytic pathways. In this way, they deliver their bioactive molecules into the target cells. Some effects of microbiota EVs are strain-specific, since they depend on their cargo and bacterial origin [9]. Today, microbiota-derived EVs are recognized as main players in interkingdom crosstalk. Research efforts in this field have provided scientific evidence that these bacterial EVs mediate microbiota functions by transporting and delivering effector molecules into host cells, which modulate the host's signalling pathways and cellular processes [9,12]. In this context, we have shown that EVs from probiotic and commensal *Escherichia coli* strains modulate epithelial barrier function [13,14] and activate T cell responses in a strain-specific manner, triggering regulatory events to maintain balanced anti/pro-inflammatory responses [9,15,16]. In addition, oral administration of EVs from the probiotic *E. coli* Nissle 1917 (EcN) ameliorated colitis progression in dextran sodium sulphate-treated mice. At the molecular level, this treatment reversed the altered expression of the pro-inflammatory cytokines and proteins involved in the intestinal barrier function [17].

The appropriate physiology and homeostasis of the host are critically associated with the integrity of the epithelial barrier. The disruption of this barrier and subsequent increase in paracellular permeability are important drivers of the pathogenesis of various diseases [18]. Besides the mucus layer, the intestinal epithelium contributes to the gut barrier function by limiting the entry of luminal microbes and harmful compounds. It consists of a monolayer of specialized epithelial cells (enterocytes, goblet cells, M cells, and enterochromaffin cells) sealed by tight junctions (TJs), which control the paracellular passage of molecules, ions, and water. TJs are formed by several types of transmembrane proteins, such as occludin and claudins, and cytosolic zonula occludens (ZO) proteins, which act as scaffolds to anchor the membrane proteins to the actin cytoskeleton [19,20]. In addition, IECs play an essential role in sensing microbial signals through PRRs. Once activated, these cells enhance the intestinal barrier to protect host tissues from bacterial translocation. The gut microbiota modulates the intestinal barrier through several mechanisms that influence TJs, the secretion of antimicrobial peptides from Paneth cells, and the production of MUC2 by goblet cells [21]. Intestinal goblet cells also secrete other proteins that are major components of the intestinal mucus, such as trefoil factor 3 (TFF3) [22].

TFF3 is a small peptide secreted with MUC2 by intestinal goblet cells. It is distributed throughout the mucosal surface of the small and large intestines. TFF3 acts on adjacent epithelial cells in a paracrine manner and plays a key role in the maintenance and repair of intestinal mucosa [23]. TFF3 enhances intestinal barrier function through the regulation of epithelial TJ proteins to reduce paracellular permeability. In this sense, TFF3 upregulates

claudin-1 and promotes the redistribution of ZO-1 from the cytoplasm to intercellular junctions [24,25]. TFF3 significantly contributes to mucosa restitution and wound healing by stimulating epithelial cell migration [26,27]. In addition, TFF3 influences mucosal immune responses under the conditions of intestinal inflammation or enteric infections through the regulation of cytokine production [28]. The expression of TFF3 in goblet cells is upregulated in sites of mucosal injury. In addition, the gut microbiota influences the goblet cell function by modulating the expressions of TFF3 and MUC2 through Toll-like receptor 2 (TLR2) signalling [29]. The increased synthesis of TFF3 is followed by the activation of several signalling pathways [30]. The TFF3 effects on cell migration and epithelial integrity preservation during inflammation have been shown to be mediated through the activation of the PI3K/Akt signalling pathway [27,31]. In addition, TFF3 is downregulated at the posttranscriptional level by mir-7-5p [32,33].

TFF3 has been associated with inflammatory bowel disease (IBD) pathogenesis and is considered as a potential treatment target. The expression of TFF3 is downregulated in experimental models of colitis [34] and the damaged tissue of IBD patients, whereas miR-7-5p is overexpressed in IBD samples compared to normal colonic tissue [33]. We showed that, in an experimental model of colitis, the oral administration of EVs from the probiotic EcN increased the TFF3 expression in the colonic tissue to levels similar to those of non-colitic mice [17]. However, the regulatory mechanisms activated by EcN EVs have remained unexplored to date.

This study aims to evaluate the molecular mechanisms involved in the regulation of TFF3 by microbiota EVs in the goblet cell line LS174T. The study includes EVs isolated from the probiotic EcN and the commensal ECOR12. In LS174T cells, the expressions of TFF3 and miR-7-5p were analysed using quantitative RT-PCR in the presence and absence of specific inhibitors of the TLR2 or PI3K signalling pathways. Moreover, to investigate the effect of microbiota EVs on the secreted TFF3 levels and the corresponding impact of the intestinal epithelial barrier, the conditioned medium from the control and vesicle-stimulated LS174T cells was collected and used to treat Caco-2 cell monolayers. In this indirect model, the barrier-strengthening effects were evaluated by analysing the expression and subcellular distribution of selected TJ proteins and the impact on intestinal barrier repair was assessed though wound-healing assays.

2. Materials and Methods

2.1. Bacterial Strains and Isolation of EVs

The probiotic *E. coli* Nissle 1917 (EcN) was from Ardeypharm (GmbH, Herdecke, Germany). The *E. coli* strain ECOR12 was isolated from faecal samples of a healthy human adult [35].

For the isolation of the EVs, bacterial strains were cultured in Luria–Bertani broth (LB) for 16 h. Then, bacterial cells were pelleted by centrifugation and culture supernatants were used for the extraction of the EVs, as described previously [36]. Briefly, the supernatants were passed through a 0.22 µm pore size filter (Merck, Millipore, MA, USA) to eliminate residual bacterial cells and then concentrated with Centricon Plus-70 centrifugal filters 100 kDa cutoff (Merck, Millipore, MA, USA). After an additional filtration step using a 0.22 µm pore size filter, vesicles were collected by ultracentrifugation at 150,000× *g* for 1 h at 4 °C. The pelleted EVs were washed and resuspended in phosphate-buffered saline (PBS). The quantification of the EV samples was assessed with protein concentration using the Pierce BCA method and sterility was verified on LB plates. Aliquots of the EVs were stored at −20 °C until use.

2.2. Cell Culture

Human colonic epithelial Caco-2 cells (ATCC HTB37) were routinely grown in Dulbecco's modified essential medium (DMEM), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 25 mM HEPES, 1% non-essential amino acids, and 1× penicillin-streptomycin (Corning, Product Number 30-002-CI). LS174T human goblet cells were cultured in RPMI 1640 medium, containing 10% FBS and 1× penicillin-streptomycin (Corning, Product Number 30-002-CI).

The cultures were maintained at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO_2. The cells were sub-cultured with trypsin-EDTA (Gibco-BRL) once a week.

2.3. Stimulation Conditions and Preparation of Conditioned Medium from LS174T Goblet Cells

To analyse the regulation of the TFF3 expression and function via microbiota EVs, two stimulation conditions were set up, depending on the colonic cell line: (i) the direct stimulation of LS174T goblet cells with microbiota EVs, and (ii) the treatment of colonic epithelial Caco-2 cells with goblet-cell-derived conditioned media (GC-CM).

(i) Stimulation of LS174T cells. LS174T cells were seeded at a density of 2×10^5 cells/mL in 60 mm plates or 12-well plates, depending on the experiment, and cultured in RPMI 1640 medium. When the cells reached an 80–90% confluency, the culture medium was replaced by fresh RPMI medium without FBS and the cells were stimulated with EVs (10 µg/mL) isolated from EcN or ECOR12. Non-stimulated cells were cultured in parallel as a control. At the indicated times, the cells were processed for RNA isolation. The culture supernatants were centrifuged at 150,000× *g* for 1 h at 4 °C to obtain the corresponding vesicle-free conditioned media, which were named as EcN-GC-CM, ECOR12-GC-CM, or Control-GC-CM, according to the stimulation conditions. When indicated, LS174T cells were pre-treated for 1 h with the PI3K inhibitor LY294002 (5 µM) or the TLR2 inhibitor C29 (50 µM) before the addition of bacterial EVs. Inhibitors were kept in the culture medium until the end of the experiment.

(ii) Stimulation of Caco-2 cells with GC-CM. Caco-2 cells were seeded at a density of 2×10^5 cells/mL in 6-well plates and cultured in DMEM for 3–4 days to obtain a continuous monolayer. At this point, the cells were washed and treated with the LS174T conditioned media collected from the different stimulations, which were previously mixed with fresh RPMI FBS-free medium (1:1). The cells were incubated for 24 or 48 h, depending on the experiment.

2.4. RNA Extraction and Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

Gene expression was analysed using RT-qPCR in LS174T cells at 6 h and in Caco-2 cells at 24 h post-treatment with the bacterial EVs or GC-CMs, respectively. The total RNA was extracted using the miRNeasy mini Kit (Qiagen, Crawley, UK) according to the manufacturer's protocol. The RNA quality and concentration were assessed by the ratio of absorbance at 260/280 nm using a NanoDrop TM-2000 spectrophotometer. All the samples had 260/280 ratio values between 1.9–2.0.

For the RT-qPCR, the RNA (1 µg) was reverse transcribed in a final volume of 20 µL using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Quantitative PCR reactions were performed in a Quantstudio™ 3 Real-Time PCR system (Applied Biosystems) by using SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and specific primers for TLR2, TFF3, and MUC2 (for LS174T cells), and occludin, claudin-1, claudin-2, and ZO-1 (for Caco-2 cells) (Table 1). The housekeeping GAPDH gene was used as the internal control gene. The reaction program consisted of one denaturation cycle for 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C. A control reaction was carried out in the absence of RNA.

For the miRNA-7-5p expression analysis, reverse transcription of RNA (5 ng/µL) was performed using the miRCURY LNA RT kit (Qiagen), followed by quantitative PCR using the miRCURY LNA PCR Assay (Qiagen). The U6 snRNA reference gene was used for normalization. The primers used were the hsa-miR-7-5-pMiRCURY LNA primer (Qiagen) (MiRBase accession # MIMAT0000252) and the U6 snRNA control primer set (Qiagen). The standard PCR program consisted of one denaturation cycle for 2 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 10 s at 95 °C and 1 min at 56 °C.

For both the mRNA and miRNA analyses, the relative gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formula. The data were presented as the fold change in gene expression relative to the untreated control [37].

Table 1. Primers used in this study for mRNA expression analysis using RT-qPCR.

Gene	Sequence (5′-3′)	Reference
GAPDH	Fw: GAG TCA ACG GAT TTG GTC GT Rv: GAC AAG CTT CCC GTT CTC AG	[38]
TFF3	Fw: CAGCTTTTCTGTCCCTTTGC Rv: CACGACGCAGAAATAAA	[38]
TLR2	Fw: CCGTGGAATGTTTGGAACTGC Rv: ATGCAGCCTCCGGATTGTTA	[31]
MUC2	Fw: CACCTGTGCCCTGGAAGGC Rv: CGGTCACGTGGGGCAGGTTC	[39]
ZO-1	Fw: TGAGGCAGCTCACATAATGC Rv: GGTCTCTGCTGGCTTGTTTC	[38]
Occludin	Fw: TTTGTGGGACAAGGAACACA Rv: TCATTCACTTTGCCATTGGAT	[38]
Claudin-1	Fw: CGATGAGGTGCAGAAGATGA Rv: CCAGTGAAGAGAGAATGACC	[38]
Claudin-2	Fw: ACCTGCTACCGCCACTCTGT Rv: CTCCCTGGCCTGCATTATCTC	[40]

Fw: Primer forward. Rv: Primer reverse.

2.5. Quantification of TFF3 by ELISA

LS174T cells, grown on 60 mm plates until they reached an 80–90% confluency, were incubated in the absence or presence of EcN or ECOR12 EVs for 24 h. Culture supernatants were collected, centrifuged at 16,000× *g* for 20 min at 4 °C, and stored at −80 °C until use. The TFF3 secreted levels were quantified by the solid-phase sandwich ELISA kit (Invitrogen, USA, catalogue # EHTFF3), according to the manufacturer's instructions. The results were expressed as ng/mL.

2.6. Confocal Immunofluorescence Microscopy

Caco-2 cells were grown for six days in an 8-well chamber slide (µ-Slide 8 well Glass bottom, Ibidi) and then stimulated with GC-CM (1:1) for 24 h. After being washed with PBS, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS, permeabilized with 0.05% saponin (Sigma-Aldrich, Chemical Co., St. Louis, MO, USA) and blocked using PBS containing 1% bovine serum albumin. The TJ protein ZO-1 was stained using anti-ZO-1 (5 µg/mL, Invitrogen) for 16 h at 4 °C, followed by incubation with Alexa Fluor 488-conjugated F(ab')2 goat anti-mouse IgG (H+L) (5 µg/mL, Invitrogen, Waltham, MA, USA) for 2 h at 37 °C. Nuclei were labelled with DAPI (0.125 µg/mL, Sigma Aldrich, Chemical Co., St. Louis, MO, USA) for 20 min at room temperature.

For the confocal microscopy, the cells were observed using a Zeiss LSM880 confocal microscope equipped with a 63×/1.4 objective, an Argon laser, and a 405 nm laser diode. The 488 nm line of the Argon laser was used to collect the fluorescence of the Alexa Fluor 488 and the 405 nm diode was used to detect the DAPI emission fluorescence. Images were acquired with a voxel size of 0.13 µm × 0.13 µm × 0.37 µm (x, y, z, respectively). For each experimental condition and replicate (n = 3), 5 different fields of view with 30–40 cells each were acquired.

For a quantitative analysis of the TJ intensity, images were processed using Fiji software v1.53t [41], following the protocol described previously [14]. Mainly, they were filtered and processed to remove the background to finally trace the tight junction fluorescence using the Tubeness plugin and project with maximum intensity. Segmentation was performed by using a pretrained Labkit classifier [42]

2.7. Cell Viability and Proliferation Assays

Cell viability was assessed using the MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay. For this, 100 µL of a cell suspension of 1 × 10^5 cells/mL was seeded in a 96-well plate and incubated for 24 h at 37 °C in the appropriate complete

medium before treatment. The cells were then challenged with the selected stimuli and incubated for up to 48 h. Specifically, LS174T cells were treated with EcN or ECOR12 EVs (10 µg/mL) and Caco-2 cells were treated with the corresponding GC-CM (1:1), as described above. At 24 h intervals, the viable proliferating cells were measured using the MTT assay, as described previously [43]. This assay was also used to evaluate the cytotoxicity of LY294002 and C29 on the goblet cell line LS174T at 6 h of incubation, with different inhibitor concentrations ranging from 5 to 50 µM. The results were expressed as the percentages of cell survival relative to the controls (untreated cells).

When indicated, the trypan blue exclusion test was used to assess the cell viability and proliferation. In this case, the cells were plated into 24-well plates, exposed to bacterial EVs (10 µg/mL), and further incubated up to 48 h. At the indicated times, the cells were detached using trypsinization, stained with 0.25% w/v trypan blue, and counted with a haemocytometer. The Mean Proliferative Index (MPI) at any given point was calculated as previously described [43]. MPI = (number of cells treated with EVs in each well/number of control cells in each well) × 100.

2.8. Wound-Healing Assay

The wound-healing assay was used to evaluate the ability of the microbiota EVs to promote intestinal mucosal healing. Caco-2 cells (2×10^5 cells/well) were grown in a complete culture medium in a 6-well plate equipped with wound-healing assay µ-Dish 25 mm insets (ibidi 80206). When the cells reached confluency (3–4 days), the insets used to produce the scratched area were removed. The wounded cell monolayers were washed with FBS-free RPMI medium and then incubated with GC-CM mixed with FBS-free RPMI medium (1:1). Images were captured under the microscope at 0, 24, and 48 h post incubation (ZOETM Fluorescent Cell Imager-1). The wound closure analysis was performed with the ImageJ v1.53t by measuring the width along the cell-free gap. For each treatment, the results were expressed as the percentages of wound closure at 24 and 48 h compared to the wound at the time of 0 h.

The same assay was used to evaluate the ability of the microbiota EVs to stimulate the migration of LS174T cells. In this case, LS174T cells (2×10^5 cells/well) were grown using the same plates and insets for 2 days. After removing the insets, the cells were washed and incubated in FBS-free RPMI medium in the absence or presence of EcN or ECOR12 EVs (10 µg/mL). A wound healing analysis was carried out at 0, 24, and 48 h.

2.9. Statistical Analysis

The data were collected from at least three independent biological experiments in triplicate. GraphPad Prism 7.0 software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) was used to perform the statistical analysis and generate graphs. The data for all the measurements are presented as the mean ± standard error (SEM). Differences between the groups were assessed using a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post-test. Significant differences were established at a p-value ≤ 0.05.

3. Results

3.1. Modulation of TFF3-Related Genes Using EcN and ECOR12 EVs in LS174T Cells

To better understand the molecular mechanisms involved in the regulation of TFF3 via microbiota EVs, the expressions of TFF3 and its regulators, TLR2 and miR7-5p, were studied in LS174T cells, a well-characterized model of human goblet cells [39]. The expression of MUC2, a TFF3-related protein that is co-secreted and synergizes with TFF3 to preserve the integrity of the intestinal barrier, was also analysed.

LS174T cells were stimulated for 6 h with EVs (10 µg/mL) isolated from the probiotic EcN or the commensal ECOR12. Untreated LS174T cells were kept as controls. RT-qPCR analysis revealed that the EcN EVs significantly increased the TFF3 ($p \leq 0.01$), MUC2 ($p < 0.01$), and TLR2 ($p < 0.001$) mRNA levels, whereas the ECOR12 EVs did not cause a significant effect on their expressions, yielding mRNA levels similar to those of the control cells (Figure 1A).

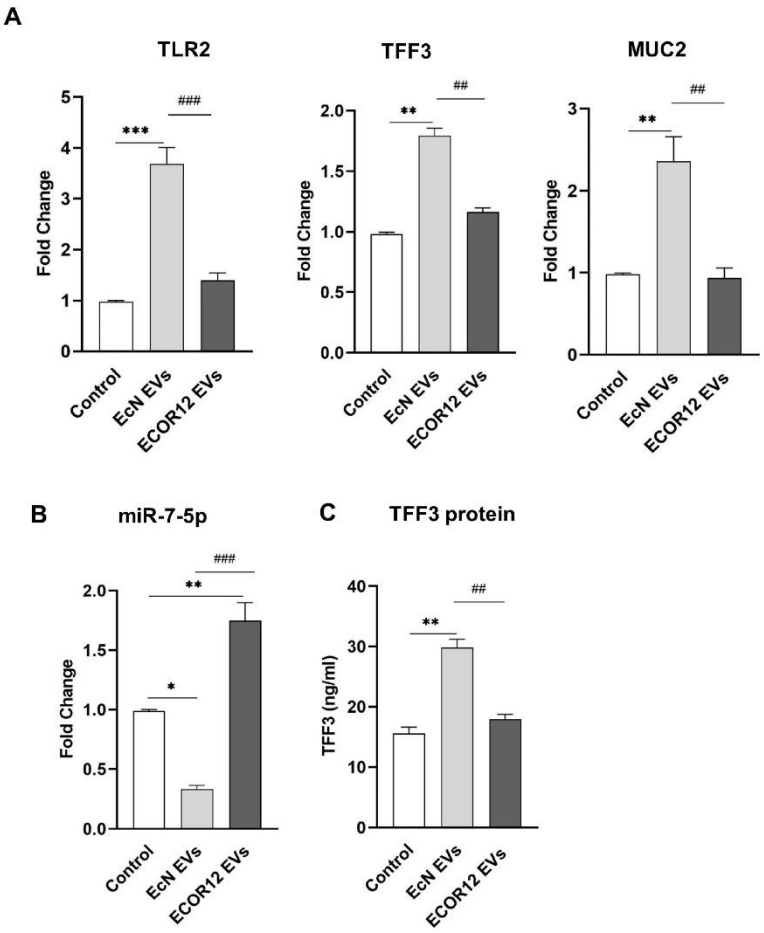


Figure 1. Modulation of TFF3 expression in LS174T cells by microbiota EVs. LS174T cells were challenged with EVs (10 µg/mL) from EcN or ECOR12. Untreated LS174T cells were processed as controls. (**A**) Relative mRNA levels of TFF3, MUC2, and TLR2 were measured using RT-qPCR after 6 h incubation, using GAPDH as the reference gene. (**B**) RT-qPCR quantification of miR-7-5p levels at 6 h post-incubation using the U6 reference gene. In both panels (**A**,**B**), data are presented as fold-change compared to untreated control cells. (**C**) Secreted TFF3 protein was quantified by ELISA after 24 h incubation. Values were expressed as ng/mL. In all panels, data are expressed as mean ± SEM from three independent experiments. Differences were evaluated with one-way ANOVA, followed by post hoc Tukey's. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ vs. control group, and ## $p < 0.01$, ### $p \leq 0.001$ between vesicle treatments.

Regarding miR7-5p, the results showed differential regulation by EcN and ECOR12 EVs (Figure 1B). The treatment with EVs from the probiotic EcN caused a downregulation of the miR7-5p levels ($p < 0.05$) in LS174T cells. In contrast, the miR7-5p levels were

significantly increased in the cells stimulated with the ECOR12 EVs ($p < 0.001$) (Figure 1B). The expression of TFF3 was also analysed at the protein level. The secreted TFF3 peptide was quantified using ELISA in LS174T culture supernatants, following a 24 h stimulation with EcN or ECOR12 EVs (Figure 1C). Consistent with the mRNA level profile, the secretion of TFF3 was significantly increased in LS174T cells incubated with EcN EVs when compared to both the control and ECOR12-treated cells ($p \leq 0.01$).

The positive correlation between the TFF3 and TLR2 expression levels in LS174T cells treated with EcN EVs suggested that the activation of TFF3 by EVs from this probiotic involves the TLR2 signalling pathway. In these cells, the downregulation of miR7-5p is consistent with the activation of the PI3K/Akt signalling pathway by TFF3 [32]. Concerning ECOR12 EVs, the results obtained suggest that EVs from this commensal can regulate miR7-5p using a different mechanism.

3.2. Effect of TLR2 and PI3K Inhibitors on the Modulation of TFF3 and miR-7-5p by EcN or ECOR12 EVs

To investigate the involvement of the TLR2 signalling pathway and the subsequent activation of PI3K in TFF3 expression induced by microbiota EVs, LS174T cells were pre-treated with the specific TLR2 inhibitor C29 (50 µM) or the PI3K inhibitor LY294002 (5 µM) before the addition of bacterial EVs. For both inhibitors, the concentration was selected based on the cell viability results from a dose–response curve using the MTT assay (Supplemental Figure S1). The TFF3 and miR7-5p expression levels were quantified using RT-qPCR on LS174T cells following a 6 h incubation with EcN or ECOR12 EVs, in the presence and absence of the inhibitors. The non-stimulated control cells were also treated with the inhibitors as a control (Figure 2). The C29-mediated inhibition of the TLR2 signalling pathway significantly abolished the induction of TFF3 by EcN EVs ($p \leq 0.01$). In addition, the C29 treatment prevented the downregulation of miR7-5p by EcN EVs, reaching expression levels that were even higher than those of the control cells (Figure 2A). In contrast, the expressions of TFF3 and miR7-5p remained unchanged in the ECOR12 EVs-treated cells in the presence of C29 (Figure 2A).

In the non-stimulated control cells, the inhibition of the PI3K pathway with the LY294002 treatment significantly increased the miR7-5p expression levels ($p \leq 0.01$). Consequently, the expression levels of the target TFF3 mRNA were diminished by this treatment (Figure 2B). The same expression pattern, the upregulation of miR7-5p ($p \leq 0.05$) and the downregulation of TFF3 ($p \leq 0.05$), was observed in LS174T cells stimulated with EcN EVs in the presence of LY294002 (Figure 2B). In the cells challenged with ECOR12 EVs, the results indicate that, after the LY294002 treatment, there were no statistically significant changes affecting the TFF3 or miR-7-5p expressions (Figure 2B).

For both inhibitor assays, the TFF3 secreted levels were quantified in the culture supernatants (Figure 2, right panels). The results were consistent with the TFF3/miR7-5p expression profile, which confirmed their differential regulation by EcN and ECOR12 EVs. The increased secretion of the TFF3 peptide promoted by EcN EVs was significantly reduced ($p < 0.01$) in the presence of either C29 or LY294002, yielding values that were similar to the non-stimulated control cells. In contrast, none of the inhibitors altered the basal TFF3 secretion level in the cells stimulated with the ECOR12 EVs.

Overall, the results evidenced that EcN EVs induce TFF3 expression in LS174T through the TLR2 signalling pathway and downregulate miR7-5p via the subsequent TFF3 activation of PI3K. Contrary to the probiotic EcN, vesicles from the commensal ECOR12 did not induce TFF3 expression in LS174T cells. Moreover, the ECOR12 EVs promoted the upregulation of miR7-5p through a mechanism that did not involve the TLR2 or PI3K pathways.

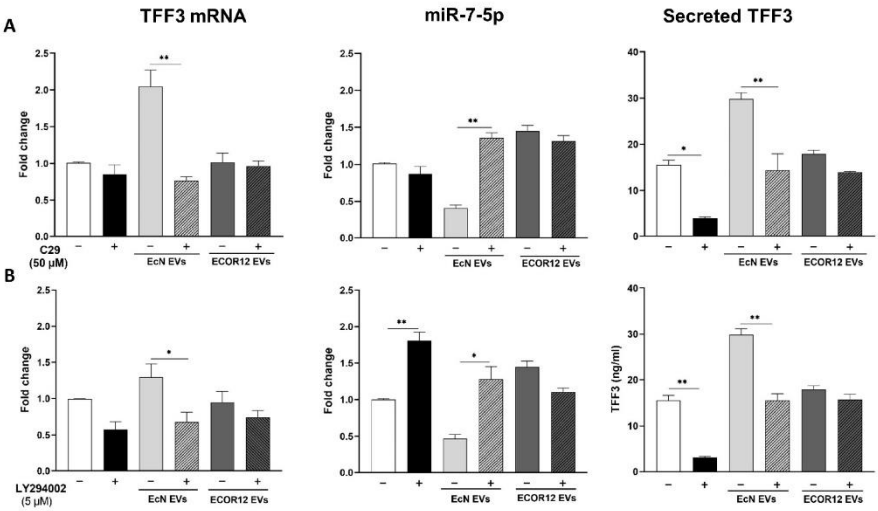


Figure 2. Effect of TLR2 and PI3K inhibitors on TFF3 and miR7-5p expressions in LS174T cells stimulated with EcN or ECOR12 EVs. LS174T cells were pre-treated for 1 h with: (**A**) C29 (50 µM), or (**B**) LY294002 (50 µM) before the addition of EVs (10 µg/mL) from EcN or ECOR12. Inhibitors were kept in the culture until the end of the experiment. Untreated LS174T cells were processed as controls. Relative mRNA levels of TFF3 and miR7-5p were measured using RT-qPCR after 6 h incubation, using GAPDH or U6 as the reference gene, respectively. Data are presented as fold-change compared to untreated control cells. For all treatments, secreted TFF3 protein was quantified by ELISA after 24 h incubation and values expressed as ng/mL ((**A**,**B**), right panels). In all panels, data are expressed as mean ± SEM from three independent experiments. Differences were evaluated with one-way ANOVA, followed by post hoc Tukey's. For each treatment group (untreated control, treated with EcN EVs, or treated with ECOR12 EVs), * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ indicate the level of statistical significance between cells stimulated in the absence (−) and presence (+) of inhibitor.

3.3. EcN and ECOR12 EVs Stimulate Restitution of LS174T Cells upon Epithelial Injury

Mucosal wound healing involves epithelial cell migration as a first step, followed by epithelial cell proliferation. In this context, the effects of the EcN and ECOR12 EVs on goblet cell migration were assessed using the wound-healing assay. After the culture insets had been removed to create the scratched area, LS174T cells were incubated in FBS-free RPMI medium in the absence or presence of the EcN or ECOR12 EVs, as described in the Material and Methods section. Cell proliferation is significantly inhibited in the absence of FBS. At 48 h, the EVs from both strains had reduced the wound area (26.7 ± 26.3% of closure) in comparison to the control cells (16.6% of closure), without significant differences between the strains (Figure 3A,B).

Under these experimental conditions, the cell viability was confirmed by the MTT and trypan blue exclusion assays (Figure 3C). To evaluate the vesicle effects on cell proliferation, the LS174T cells were incubated in 5% FBS-RPMI in the absence and presence of EcN or ECOR12 EVs for up to 48 h. The cell proliferation was analysed using the MTT assay. The MTT activity values of the vesicle-stimulated cells did not significantly differ from those of the untreated control cells (Supplemental Figure S2).

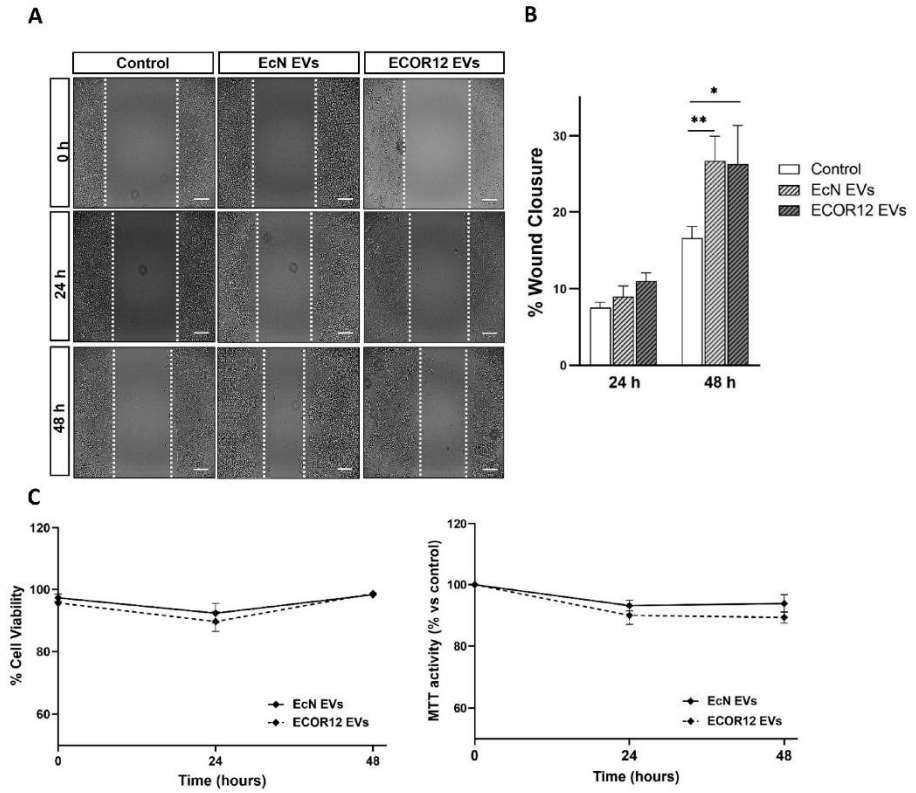


Figure 3. EVs from EcN and ECOR12 activate goblet cell restitution. Wounds were generated in LS174T cells using the culture inset system. After removing the insets, cells were incubated in FBS-free RPMI medium in the presence of EVs (10 μg/mL) from EcN or ECOR12 or without any stimuli. (**A**) Representative images of scratched areas at 0, 24, and 48 h are shown (Scale bar = 100 μm). (**B**) Analysis of wound closure. ImageJ was used to measure the width along the cell-free gap. Results are presented as the percentage of wound closure at 24 h and 48 h compared to the wound at time 0 h and expressed as mean ± SEM. (**C**) Cell viability under the experimental conditions assessed with the MTT and trypan blue exclusion assays. In all panels, data are expressed as mean ± SEM from three independent experiments. Differences were evaluated with one-way ANOVA, followed by post hoc Tukey's. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ vs. control group.

3.4. Effect of the Conditioned Media from EV-Stimulated LS174T Cells on the Expression of TJ Proteins in Caco-2 Cells

TFF3 plays a key role in the maintenance of the intestinal mucosa. This peptide enhances the integrity of the mucosal barrier by influencing the expression of TJ proteins in intestinal epithelial cells. In this context, we sought to analyse whether the upregulation of TFF3 with EcN EVs in LS174T cells provides an indirect mechanism to reinforce intestinal epithelial TJs. To this end, Caco-2 cell monolayers were treated with LS174T conditioned media (GC-CM) collected from non-stimulated control cells or cells stimulated with EcN or ECOR12 EVs, and the mRNA expression level of major TJ proteins was quantified using

RT-qPCR at 24 h of incubation (Figure 4). Caco-2 cell monolayers were incubated in parallel with fresh RPMI (untreated) as a control to discard negative GC-CM effects.

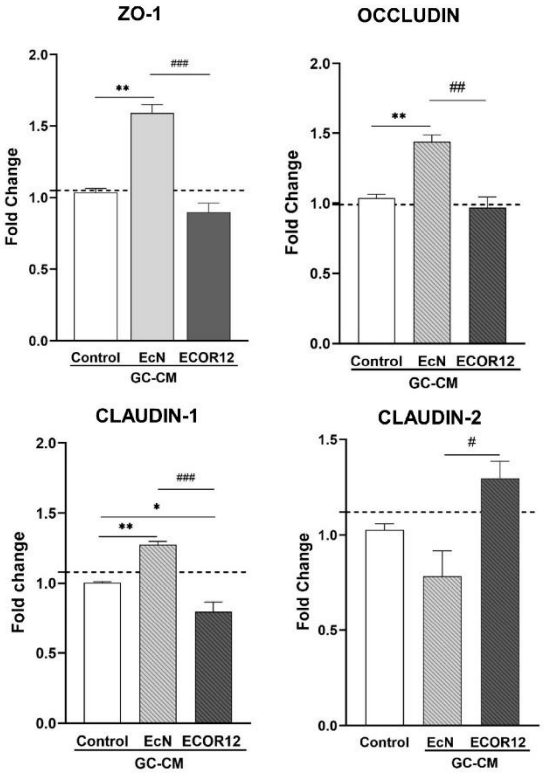


Figure 4. mRNA expression levels of ZO-1, occludin, claudin-1, and claudin-2 in Caco-2 cells treated with EV-stimulated LS174T conditioned media. Caco-2 cell monolayers were treated with GC-CM (1:1) collected from LS174T cells following stimulation with EcN EVs, ECOR12 EVs, or without any stimuli. As a control of GC-CM treatment, cells were incubated in parallel with RPMI (untreated, dashed line). Relative mRNA levels of the indicated TJ proteins were measured using RT-qPCR after 24 h incubation, using GAPDH as the reference gene. In all panels, data are expressed as mean ± SEM from three independent experiments. Differences were evaluated with one-way ANOVA, followed by post hoc Tukey's. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ vs. control group, and # $p \leq 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p \leq 0.001$, between EcN-GC-CM and ECOR12-GC-CM treatments.

The treatment with EcN-GC-CM significantly upregulated ZO-1 ($p \leq 0.01$), occludin ($p \leq 0.01$), and claudin-1 ($p \leq 0.01$) in comparison to Caco-2 cells treated with control-GC-CM. In contrast, the mRNA expression levels of these three TJ proteins with strengthening activity remained unchanged or reduced following the ECOR12-GC-CM treatment. Notably, the incubation of Caco-2 cells with ECOR12-GM-CM resulted in the upregulation the leaky-gut-associated protein claudin-2 ($p \leq 0.05$) (Figure 4). These results were consistent with the differential regulation of the TFF3 expression in LS174T cells by EcN and ECOR12 EVs. A positive correlation between highly secreted TFF3 levels and an increased expression of

sealing TJ proteins was only achieved by the action of EcN EVs on intestinal goblet-like LS174T cells.

3.5. Immunofluorescence Microscopy Analysis of ZO-1 in Caco-2 Cells Treated with Conditioned Media from EV-Stimulated LS174T Cells

In addition to the transcriptional regulation of the TJ proteins, TFF3 promotes a redistribution of ZO-1 from the cytoplasm to intercellular junctions [24,25]. To confirm the impact of EcN-GC-CM and ECOR12-GC-CM on the TJs, we carried out immunofluorescence staining, followed by confocal laser scanning microscopy of the ZO-1 in Caco-2 cell monolayers challenged with conditioned media collected from untreated or vesicle-treated LS174T cells. After 24 h of incubation, the cells were fixed and stained for ZO-1. Representative images are presented in Figure 5A. The upregulation of ZO-1 by EcN-GC-CM was correlated with an increased signal in the cell boundaries of the Caco-2 monolayers. Moreover, the ZO-1 signal was quantified in the TJs, as described in the Materials and Methods section (data collected from three independent biological experiments with five different fields of view with 30–40 cells each). Consistent with the TFF3 levels in LS174T conditioned media, the results revealed a statistically significant increase in the ZO-1 signal associated with the TJs in the cell boundaries of the Caco-2 monolayers treated with EcN-GC-CM, but not those treated with ECOR12-GC-CM (Figure 5B).

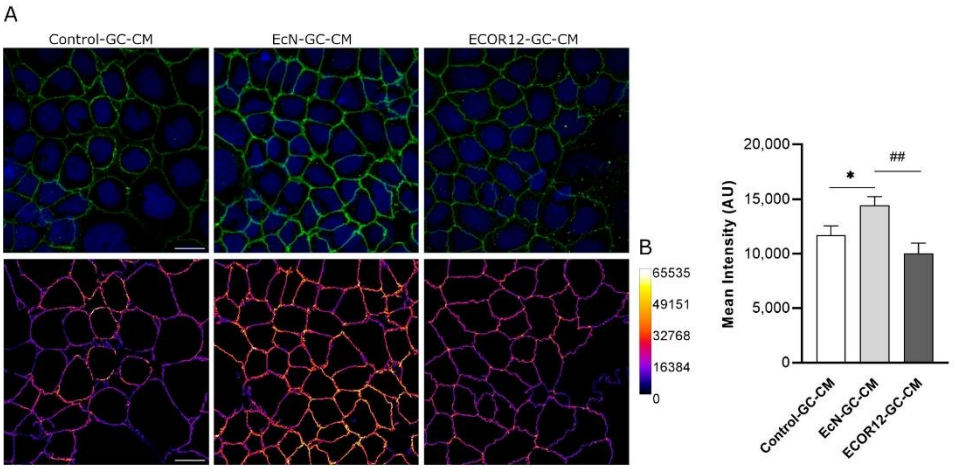


Figure 5. Immunofluorescence staining for ZO-1 in Caco-2 cells treated for 24 h with EV-stimulated LS174T conditioned media. (**A**) Representative confocal maximal projection images of cells treated with Control-GC-CM (left), EcN-GC-CM (middle), and ECOR12-GC-CM (right). Top row shows ZO-1 (green) and nuclei (blue) staining. Bottom row shows ZO-1 staining in Fire LUT after image processing. Calibration bar of Fire LUT intensity is shown on the right. Scale bar: 20 µm. (**B**) Quantification of the ZO-1 mean intensity in Caco-2 cells after the indicated treatments. Data are presented as mean ± SEM of arbitrary intensity units (AU) (n = 3 independent biological replicates). Statistical differences were assessed with one-way ANOVA, followed by post hoc Tukey's. * $p \leq 0.05$ vs. control group, and ## $p < 0.010$ between EcN-GC-CM and ECOR12-GC-CM treatments.

3.6. Effect of the Conditioned Media from EV-Stimulated LS174T Cells on Wound Healing in Caco-2 Cells

Since TFF3 plays a main role in tissue repair, the stimulatory effect of EcN EVs on the TFF3 secretion of goblet cells was further examined using the wound-healing assay in Caco-2 cells, as described in the Material and Methods section. In the absence of FBS, the

conditioned media from LS174T cells stimulated with EcN EVs (EcN-GC-CM) significantly promoted the wound closure of the scratched Caco-2 cell monolayers when compared to the control treatment (control-GC-CM). For EcN-GC-CM, the percentage of lesion closure was 16.7% at 24 h and 26.12% ($p \leq 0.01$) at 48 h compared to the wound at time 0, whereas for the control GC-CM, these values were about 14% at both 24 and 48 h. In contrast, ECOR12-GC-CM did not promote lesion repair (Figure 6A,B). The differential wound repair activity of EcN-GC-CM and ECOR12-GC-CM correlated with the TFF3 mRNA and protein levels expressed by LS174T cells in response to EcN or ECOR12 EVs. We also assessed the effect of the conditioned media on the cell viability. To this end, Caco-2 monolayers were incubated with the conditioned media (GC-CM:FBS-free RPMI; 1:1) under the same conditions of the wound healing and RT-qPCR assays, and the cell viability was evaluated at 24 and 48 h with the trypan blue exclusion and MTT tests (Figure 6C). The results showed that none of the GC-CM assayed was cytotoxic for Caco-2 cells under the experimental conditions.

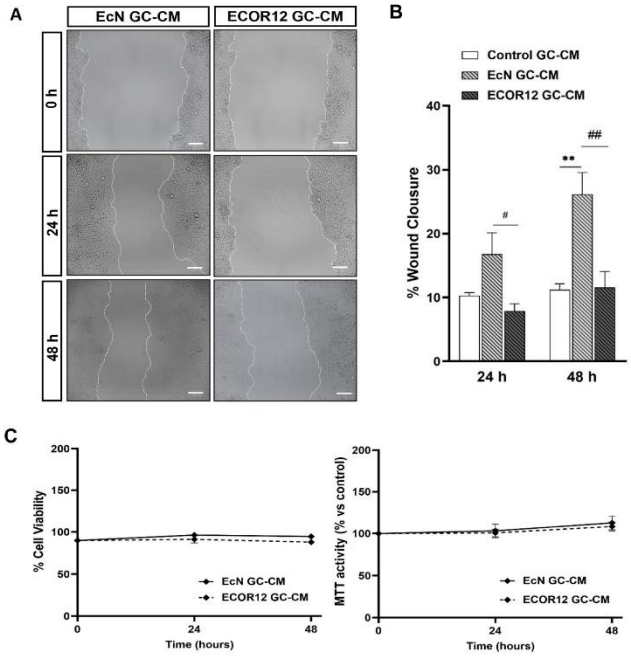


Figure 6. Conditioned media from LS174T cells treated with EcN EVs accelerates the wound closure in Caco-2 cells. Wounded confluent Caco-2 cell monolayers were incubated for 48 h with GC-CM (mixed with FBS-free RPMI at a ratio 1:1) collected from LS174T cells following stimulation with EcN EVs, ECOR12 EVs, or without any stimuli. Images of wound closure were taken at 0, 24, and 48 h of incubation. (**A**). Representative images of scratched areas at 0, 24, and 48 h are shown (Scale bar = 100 µm). (**B**) Analysis of wound closure. ImageJ was used to measure the width along the cell-free gap. Results are presented as the percentage of wound closure at 24 and 48 h compared to the wound at time 0 h and expressed as mean ± SEM. (**C**) Cell viability under the experimental conditions assessed with the MTT and trypan blue exclusion assays. In all panels, data are expressed as mean ± SEM from three independent experiments. Differences were evaluated with one-way ANOVA, followed by post hoc Tukey's. ** $p \leq 0.01$ vs. control group, and # $p \leq 0.05$, ## $p \leq 0.01$ between EcN-GC-CM and ECOR12-GC-CM treatments.

To evaluate the effects of the GC-CM on Caco-2 cell proliferation, the conditioned media collected from the control and vesicle-stimulated LS174T cells were mixed with RPMI to reach a final FBS concentration of 5%. The cell proliferation was evaluated using the MTT assay at 24 and 48 h. The conditioned media collected from LS174T cells challenged with EcN EVs significantly stimulated the Caco-2 cell proliferation compared to both control-GC-CM and ECOR12-GC-CM (Figure 7A).

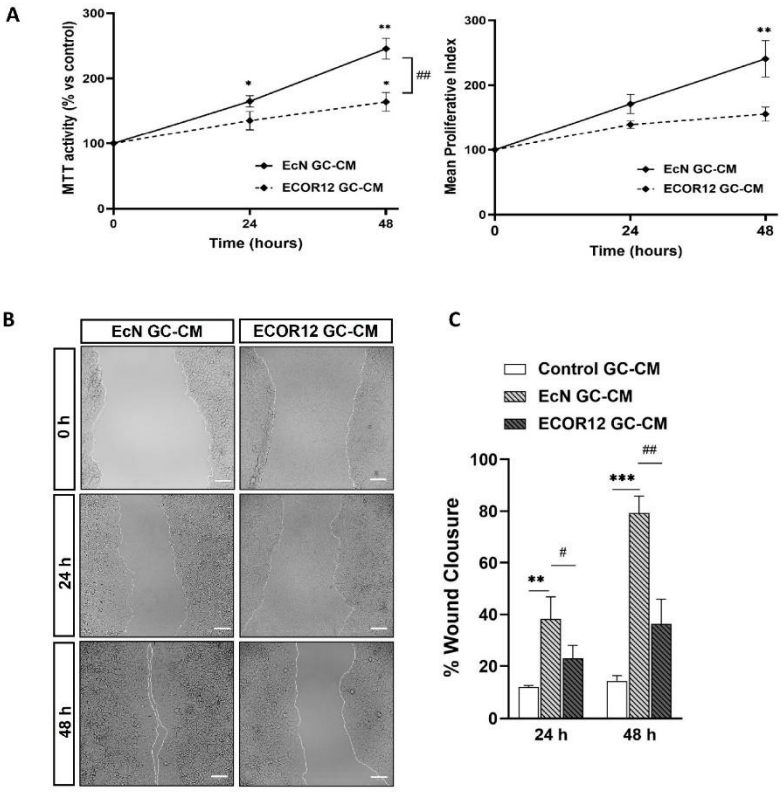


Figure 7. Conditioned media from LS174T cells treated with EcN EVs or ECOR12 EVs induce cell growth and improve wound repair in Caco-2 cells. Confluent Caco-2 cell monolayers were incubated for 48 h with GC-CM (mixed with 10% FBS-RPMI at a ratio 1:1 to reach 5% FBS final concentration) collected from LS174T cells following stimulation with EcN EVs, ECOR12 EVs, or without any stimuli. The effects on cell growth and wound healing were evaluated at 24 and 48 h incubation. (**A**) Cell growth was assessed with the MTT and trypan blue exclusion assays and the Mean Proliferative Index (MPI) was calculated as described in Methods. (**B**) Representative images of scratched areas at 0, 24, and 48 h are shown (Scale bar = 100 µm). (**C**) Analysis of wound closure. ImageJ was used to measure the width along the cell-free gap. Results are presented as the percentage of wound closure at 24 and 48 h compared to the wound at time 0 h. In all panels, data are expressed as mean ± SEM from three independent experiments. Differences were evaluated with one-way ANOVA, followed by post hoc Tukey's. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ vs. control group, and # $p \leq 0.05$, ## $p < 0.01$ between EcN-GC-CM and ECOR12-GC-CM treatments.

The MPI values indicated that the highest proliferative activity was associated with EcN-GC-CM (Figure 7A, right panel). Consistently, in the scratch assay, EcN-GC-CM significantly enhanced wound closure compared to the control, reaching percentages of around 38% wound closure at 24 h ($p \leq 0.01$) and over 79% at 48 h ($p \leq 0.001$) (Figure 7B,C). The treatment with ECOR12-GC-CM also stimulated wound closure compared to the control, although the differences were not statistically significant. These results indicated that EcN EVs stimulate goblet cells to secrete factors that promote the cell proliferation of IECs.

4. Discussion

The lifestyle of modern societies has a great impact on human health. Stress, social habits, the Western diet, physical inactivity, and aging are the main factors that predispose people to a wide range of inflammatory (irritable bowel syndrome and IBD), metabolic (obesity, metabolic syndrome, chronic liver disease, and type 2 diabetes), and mental diseases (depression, anxiety, and behaviour disorders). Imbalances in the gut microbiota composition and diversity that result in increased intestinal permeability are common traits in all these diseases. The disruption of the epithelial barrier allows for the translocation of intestinal microbes and microbial components into the lamina propria. Translocated bacterial MAMPs activate the host immune system, triggering inflammatory responses that cause intestinal dysfunction. In addition, high levels of circulating pro-inflammatory mediators and microbial products negatively impact the normal communication networks between the gut and its microbiota with distal organs [2].

Importantly, there is currently no effective treatment available for IBD and chronic liver diseases [44,45]. The strong association between the gut microbiota and human health encourages the design of new microbiome-oriented nutritional and therapeutic strategies for restoring dysbiosis and host homeostasis. Diet is a main factor influencing the gut microbiota composition. Therefore, dietary strategies for manipulating the microbiota diversity are the focus of many studies. However, short-term interventions do not cause permanent microbiota changes and long-term interventions greatly depend on duration and dietary compliance [46]. In this context, probiotics are gaining increasing interest as a treatment option for gut microbiota manipulation and their impact on leaky-gut-associated disorders. However, the potential risk for immunocompromised individuals and the technological limitations to controlling bacterial viability are seen as potential limitations for their application as functional food products.

Now, the interest in biotic well-being therapies is moving towards postbiotics [47,48]. The term postbiotic encompasses products derived from probiotics or good, beneficial bacteria that are generated during the fermentation process. These include bacterial cell components, biomolecules, metabolites, and secreted bioactive compounds. Postbiotics usually show good absorption, distribution, and a high capacity for signalling different organs and tissues to trigger specific host responses [5,49]. In this context, probiotic and microbiota EVs display the features to be considered as postbiotics, as they serve as vehicles for the delivery of functional bacterial molecules to distant cells and are important players in microbiota–host communication. Due to their nano-size structure, stability, and great variety of cargo molecules, microbiota-derived EVs can penetrate the mucus layer and modulate intestinal immune and defence responses. In addition, EVs from gut microbes can cross the epithelial barrier, enter the bloodstream, and reach the liver and distal tissues.

Several in vivo studies in mouse models of IBD have shown that the oral administration of EVs from the probiotic EcN and *Clostridium butyricum* [17,50], or beneficial gut microbiota such as *Bacteroides fragilis* [51] or *Akkermansia muciniphila* [52], improve the intestinal barrier function through several mechanisms that include the modulation of inflammatory and immune responses, TJs, and mucin-related proteins. The efficacy of *A. muciniphila* EVs in the modulation of gut permeability has also been proven in a mouse model of diabetes induced by a high-fat diet [53]

IBD is a group of intestinal disorders, namely ulcerative colitis and Crohn's disease, characterized by chronic inflammation. This condition results from a complex combination of factors, including the genetic traits of susceptible patients, disruption of the intestinal barrier, aberrant immune responses to luminal microbes and antigens, and dysbiosis. The dysfunction of the intestinal epithelial barrier is a key event in the development of IBD. The disruption of epithelial TJs and impaired mucosal repair exacerbate inflammatory responses and colitis. In the intestine, TFF3 secreted by goblet cells has a key role in the maintenance and repair of the intestinal mucosa barrier under physiological and pathophysiological conditions [23]. TFF3 is upregulated in response to intestinal mucosal damage to help cell migration for mucosa healing and decrease the epithelial permeability by regulating TJ proteins. However, the proinflammatory cytokines, IL-1β, IL-6, and TNF-α, cause the downregulation of TFF3, a mechanism that could contribute to ulceration and reductions in wound healing in IBD [54,55]. Moreover, the miRNAs dysregulated in IBD, such as miR-7-5p, may contribute to TFF3 downregulation at the posttranscriptional level [33].

Microbiota-derived EVs are known to modulate numerous functions that are essential to maintaining intestinal homeostasis in humans, including gut immunity and mucosal barrier function. While the effects of microbiota EVs on the regulation of epithelial tight junctions and immune responses is well documented [9], their role in TFF3 regulation is less studied. In this context, we previously showed that EVs from the probiotic EcN were able to counteract the reduced expression of TFF3 in an experimental model of DSS-induced colitis in mice [17].

Here, we investigate the molecular mechanisms activated by the EcN EVs responsible for TFF3 activation in goblet cells and their subsequent effects on intestinal epithelial barrier integrity and repair. To decipher whether these effects were strain specific, EVs from the commensal ECOR12 were included in this study. In this context, we have previously shown that EVs from the probiotic EcN and EVs from the commensal ECOR12 have different immunomodulatory [15,16] and barrier-strengthening activities. In in vitro models of intestinal epithelial cells (Caco-2 and T-84 cells), EcN EVs reinforced TJs by upregulating the expression of the main TJ proteins at the transcriptional level and the subcellular location of ZO1 associated with the cell membrane, whereas ECOR12 EVs did not regulate the TJ proteins or strengthen the epithelial cell barrier [13,14].

Concerning the effects on the TFF3 expression in the goblet cell line LS174T, the results from this study also showed a differential regulation of the TFF3 secretion by EcN and ECOR12 EVs. Only EVs from the probiotic EcN stimulated TFF3 production. Importantly, the TFF3 levels correlated with the differential regulation of the main regulators of the TFF3 expression, specifically TLR2 and miR-7-5p. It is known that the gut microbiota activates TFF3 expression through TLR2 signalling [29]. Our results indicated that EcN EVs stimulated the TFF3 production in goblet cells by upregulating TLR2. The involvement of the TLR2 signalling pathway was confirmed by using C29, a TLR2 inhibitor that binds to the intracellular TLR2-TIR domain [56]. Consistently, the activation of TFF3 expression and its secretion by EcN EVs was impaired in the cells incubated in the presence of C29. The inability of the ECOR12 EVs to activate TLR2 in the goblet cells may explain why the EVs from this commensal did not stimulate TFF3 production.

As stated above, TFF3 levels can be downregulated at the posttranscriptional level by mir-7-5p. This microRNA binds to specific sequences at the 3′-UTR of TFF3 mRNA, promoting its degradation [33]. There is evidence that the activation of TFF3 activates the PI3K/AKt pathway, leading to the downregulation of miR-7-5p. Under healthy conditions, high expression levels of TFF3 correlate with a reduced miR-7-5p expression. In contrast, when miR-7-5p is upregulated (in IBD for instance), the degradation of TFF3 mRNA results in the inhibition of the PI3K/AKT pathway [26,27]. Notably, this pathway mediates the TFF3 effects on cell migration and mucosal repair [32,33]. To our knowledge, the regulation of miR-7-5p in goblet cells by microbiota EVs has not been explored yet. Our results confirm that the upregulation of TFF3 by EcN EVs correlates with reduced miR-7-5p levels, and that the inhibition of the PI3K pathway by LY294002 causes the upregulation of this

microRNA and, thus, the downregulation of TFF3. Overall, these results suggest that the downregulation of miR-7-5p by EcN EVs may be indirect, through increased TFF3 production. On the contrary, ECOR12 EVs triggered the upregulation of miR-7-5p using a mechanism that did not involve the PI3K pathway.

Since EcN EVs stimulated TFF3 production in the goblet cells, we hypothesized that EVs from this probiotic might indirectly reinforce epithelial TJs and promote mucosal restitution after epithelial injury. To prove these activities, as a model, we used Caco-2 cells incubated with the conditioned media collected from LS174T cells stimulated with the EcN or ECOR12 EVs (GC-CMs). Concerning the strengthening activity, the transcriptional regulation of ZO-1, occludin, and claudin-1 correlated with the TFF3 levels in the conditioned media. Only EcN-GC-CM upregulated these TJ proteins and promoted a redistribution of ZO-1 to the cell membrane. The indirect upregulation of these TJ proteins by goblet-cell-derived TFF3 has also been described for natural compounds with antioxidant activity [38]. Thus, besides the direct regulation of epithelial TJs [13,14], EcN EVs also reinforce the epithelial barrier indirectly through the activation of TFF3 in goblet cells. In contrast, no direct [14] or indirect strengthening effects are associated with ECOR12 EVs. Regarding barrier repair effects, a key step following injury is the migration of epithelial cells to the damaged area to reconstruct the cell monolayer, a process known to be stimulated by TFF3. In agreement with the upregulation of TFF3 by EcN EVs in LS174T cells, the derived conditioned media (EcN-GC-CM) significantly increased the wound closure of scratched Caco-2 cell monolayers. In the absence of FBS, this healing activity may be attributed to the TFF3 effects on epithelial cell migration. This fact is consistent with the lack of wound-healing activity of ECOR12-GC-CM, which displays TFF3 levels similar to that of control-GC-CM. In addition, EcN-GC-CM also stimulates Caco-2 cell proliferation in the presence of FBS and improves wound repair. Under these conditions, the positive effects of EcN-GC-CM on both cell migration and proliferation may explain the high percentage of wound closure values at 48 h (more than 4-fold) compared to the control-GC-CM. Although some reports do not attribute TFF3 to any activity in regulating epithelial cell proliferation [57,58], other studies have described that TFF3 can enhance cell proliferation [32,59]. The contradictory reports and divergences on the role of TFF3 in promoting cell proliferation may be attributed to differences in the cell lines and experimental conditions used. Whether the cell proliferative effects of EcN-GC-CM are mediated by factors released by goblet cells in response to microbiota EVs other than TFF3 cannot be excluded. In this sense, ECOR12-GC-CM tends to stimulate Caco-2 cell proliferation, but at a much lower extent. The fact that other factors could be upregulated in goblet cells by microbiota EVs is supported by the results from the wound-healing assays performed in LS174T, showing that ECOR12 EVs promote cell restitution without increasing TFF3 levels (Figure 3). In addition to TFF3, it is known that growth factors such as FGF1, FGF2, and VEGF-C secreted by goblet cells are important regulators of goblet cell restitution [60].

This study provides scientific knowledge on the differential regulation of TFF3 by microbiota EVs and the subsequent impact on barrier function and repair. Due to the important role of TFF3 in the mucosal protection of healthy intestinal tissue and the regeneration of its integrity after injury, this peptide is recognized as a potential therapeutic target in IBD. The scientific community is gradually moving towards personalized medicine, and the microbiome is an important target to consider in the future of medicine and nutritional approaches. Basic science to establish the molecular mechanisms elicited by microbiota/probiotic-specific active compounds, including derived EVs, is an important and necessary step before applying postbiotics as nutritional supplements in human healthcare. In the context of IBD, various treatment options have been developed to modify the pathogenesis factors involved in the disease progression [45]. In this sense, functional foods that improve intestinal health by promoting the repair and strengthening of the epithelial barrier could be used as therapeutic agents. Here, we show that EVs from the probiotic EcN promote these beneficial effects.

5. Conclusions

Novel pharmabiotics or nutritional formulations based on postbiotics, including EVs isolated from certain gut-beneficial microbes, could provide health benefits and avoid the potential risks of live bacteria administration. The results from this study contribute to understanding the molecular actors (microbiota EVs) connecting gut microbes to health. They may help in designing better interventions based on the use of specific microbiota bioactive compounds.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/nu15112437/s1, Figure S1: Cell viability of LS174T cells at 6 h incubation with different concentrations of the indicated inhibitors ranging between 5 and 50 μM. Figure S2: MTT activity of LS174T cells at 24 h and 48 h incubation with EcN and ECOR12 EVs in RPMI containing 5% FBS.

Author Contributions: Conceptualization, J.B. and L.B.; methodology, Y.O.-M. and M.B.; software, Y.O.-M. and M.B.; formal analysis, Y.O.-M., M.B., J.B. and L.B.; investigation, Y.O.-M., L.B. and J.B.; data curation, Y.O.-M. and M.B.; writing—original draft preparation, Y.O.-M. and L.B.; writing—review and editing, L.B. and J.B.; supervision L.B.; project administration, J.B.; funding acquisition, L.B. and J.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by Ministerio de Ciencia e Innovación, Agencia Estatal de Investigación, España, Grant PID2019-107327RB-100.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The datasets generated and/or analyzed during the current study are available from the corresponding authors on reasonable request.

Acknowledgments: We acknowledge laboratories Ardeypharm for providing the probiotic EcN. We acknowledge Lucille Banham for assistance in revising the English manuscript. Y. Olivo-Martínez acknowledges the Ministry of Science, Technology and Innovation (Minciencias) of Colombia for their doctoral scholarship awarded through the International Doctorate Call N°860/2020. We acknowledge financial support from Universitat de Barcelona for publication in open access.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Jandhyala, S.M.; Talukdar, R.; Subramanyam, C.; Vuyyuru, H.; Sasikala, M.; Reddy, D.N. Role of the Normal Gut Microbiota. *World J. Gastroenterol.* **2015**, *21*, 8787–8803. [CrossRef] [PubMed]
2. De Vos, W.M.; Tilg, H.; Van Hul, M.; Cani, P.D. Gut Microbiome and Health: Mechanistic Insights. *Gut* **2022**, *71*, 1020–1032. [CrossRef] [PubMed]
3. Stentz, R.; Carvalho, A.L.; Jones, E.J.; Carding, S.R. Fantastic Voyage: The Journey of Intestinal Microbiota-Derived Microvesicles through the Body. *Biochem. Soc. Trans.* **2018**, *46*, 1021–1027. [CrossRef] [PubMed]
4. Vijay, A.; Valdes, A.M. Role of the Gut Microbiome in Chronic Diseases: A Narrative Review. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2021**, *76*, 489–501. [CrossRef]
5. Wegh, C.A.M.; Geerlings, S.Y.; Knol, J.; Roeselers, G.; Belzer, C. Postbiotics and Their Potential Applications in Early Life Nutrition and Beyond. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4673. [CrossRef]
6. Thorakkattu, P.; Khanashyam, A.C.; Shah, K.; Babu, K.S.; Mundanat, A.S.; Deliephan, A.; Deokar, G.S.; Santivarangkna, C.; Nirmal, N.P. Postbiotics: Current Trends in Food and Pharmaceutical Industry. *Foods* **2022**, *11*, 3094. [CrossRef]
7. Donaldson, G.P.; Lee, S.M.; Mazmanian, S.K. Gut Biogeography of the Bacterial Microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* **2016**, *14*, 20–32. [CrossRef]
8. Johansson, M.E.V.; Holmén Larsson, J.M.; Hansson, G.C. The Two Mucus Layers of Colon Are Organized by the MUC2 Mucin, Whereas the Outer Layer Is a Legislator of Host-Microbial Interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 14659–14665. [CrossRef]
9. Díaz-Garrido, N.; Badia, J.; Baldomà, L. Microbiota-Derived Extracellular Vesicles in Interkingdom Communication in the Gut. *J. Extracell. Vesicles* **2021**, *10*, e12161. [CrossRef]
10. Juodeikis, R.; Carding, S.R. Outer Membrane Vesicles: Biogenesis, Functions, and Issues. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2022**, *86*, e0003222. [CrossRef]

11. Kaparakis-Liaskos, M.; Ferrero, R.L. Immune Modulation by Bacterial Outer Membrane Vesicles. *Nat. Rev. Immunol.* **2015**, *15*, 375–387. [CrossRef] [PubMed]
12. Sultan, S.; Mottawea, W.; Yeo, J.; Hammami, R. Gut Microbiota Extracellular Vesicles as Signaling Molecules Mediating Host-Microbiota Communications. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 13166. [CrossRef] [PubMed]
13. Alvarez, C.S.; Giménez, R.; Cañas, M.A.; Vera, R.; Díaz-Garrido, N.; Badia, J.; Baldomà, L. Extracellular Vesicles and Soluble Factors Secreted by Escherichia Coli Nissle 1917 and ECOR63 Protect against Enteropathogenic E. Coli-Induced Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction. *BMC Microbiol.* **2019**, *19*, 166. [CrossRef] [PubMed]
14. Alvarez, C.-S.; Badia, J.; Bosch, M.; Giménez, R.; Baldomà, L. Outer Membrane Vesicles and Soluble Factors Released by Probiotic Escherichia Coli Nissle 1917 and Commensal ECOR63 Enhance Barrier Function by Regulating Expression of Tight Junction Proteins in Intestinal Epithelial Cells. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1981. [CrossRef]
15. Díaz-Garrido, N.; Bonnin, S.; Riera, M.; Gíménez, R.; Badia, J.; Baldomà, L. Transcriptomic MicroRNA Profiling of Dendritic Cells in Response to Gut Microbiota-Secreted Vesicles. *Cells* **2020**, *9*, 1534. [CrossRef] [PubMed]
16. Diaz-Garrido, N.; Fábrega, M.-J.; Vera, R.; Giménez, R.; Badia, J.; Baldomà, L. Membrane Vesicles from the Probiotic Nissle 1917 and Gut Resident Escherichia Coli Strains Distinctly Modulate Human Dendritic Cells and Subsequent T Cell Responses. *J. Funct. Foods* **2019**, *61*, 103495. [CrossRef]
17. Fábrega, M.-J.; Rodríguez-Nogales, A.; Garrido-Mesa, J.; Algieri, F.; Badía, J.; Giménez, R.; Gálvez, J.; Baldomà, L. Intestinal Anti-Inflammatory Effects of Outer Membrane Vesicles from Escherichia Coli Nissle 1917 in DSS-Experimental Colitis in Mice. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1274. [CrossRef]
18. Chakaroun, R.M.; Massier, L.; Kovacs, P. Gut Microbiome, Intestinal Permeability, and Tissue Bacteria in Metabolic Disease: Perpetrators or Bystanders? *Nutrients* **2020**, *12*, 1082. [CrossRef]
19. Turner, J.R. Intestinal Mucosal Barrier Function in Health and Disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2009**, *9*, 799–809. [CrossRef]
20. Shen, L.; Weber, C.R.; Raleigh, D.R.; Yu, D.; Turner, J.R. Tight Junction Pore and Leak Pathways: A Dynamic Duo. *Annu. Rev. Physiol.* **2011**, *73*, 283–309. [CrossRef]
21. Wan, L.Y.M.; Chen, Z.J.; Shah, N.P.; El-Nezami, H. Modulation of Intestinal Epithelial Defense Responses by Probiotic Bacteria. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2016**, *56*, 2628–2641. [CrossRef] [PubMed]
22. Pelaseyed, T.; Bergström, J.H.; Gustafsson, J.K.; Ermund, A.; Birchenough, G.M.H.; Schütte, A.; van der Post, S.; Svensson, F.; Rodríguez-Piñeiro, A.M.; Nyström, E.E.L.; et al. The Mucus and Mucins of the Goblet Cells and Enterocytes Provide the First Defense Line of the Gastrointestinal Tract and Interact with the Immune System. *Immunol. Rev.* **2014**, *260*, 8–20. [CrossRef]
23. Aihara, E.; Engevik, K.A.; Montrose, M.H. Trefoil Factor Peptides and Gastrointestinal Function. *Annu. Rev. Physiol.* **2017**, *79*, 357–380. [CrossRef] [PubMed]
24. Meyer zum Büschenfelde, D.; Tauber, R.; Huber, O. TFF3-Peptide Increases Transepithelial Resistance in Epithelial Cells by Modulating Claudin-1 and -2 Expression. *Peptides* **2006**, *27*, 3383–3390. [CrossRef] [PubMed]
25. Buda, A.; Jepson, M.A.; Pignatelli, M. Regulatory Function of Trefoil Peptides (TFF) on Intestinal Cell Junctional Complexes. *Cell Commun. Adhes.* **2012**, *19*, 63–68. [CrossRef]
26. Hoffmann, W. TFF (Trefoil Factor Family) Peptide-Triggered Signals Promoting Mucosal Restitution. *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, *62*, 2932–2938. [CrossRef]
27. Sun, Z.; Liu, H.; Yang, Z.; Shao, D.; Zhang, W.; Ren, Y.; Sun, B.; Lin, J.; Xu, M.; Nie, S. Intestinal Trefoil Factor Activates the PI3K/Akt Signaling Pathway to Protect Gastric Mucosal Epithelium from Damage. *Int. J. Oncol.* **2014**, *45*, 1123–1132. [CrossRef]
28. Hoffmann, W. Trefoil Factor Family (TFF) Peptides and Chemokine Receptors: A Promising Relationship. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 6505–6510. [CrossRef]
29. Podolsky, D.K.; Gerken, G.; Eyking, A.; Cario, E. Colitis-Associated Variant of TLR2 Causes Impaired Mucosal Repair Because of TFF3 Deficiency. *Gastroenterology* **2009**, *137*, 209–220. [CrossRef]
30. Aihara, E.; Medina-Candelaria, N.M.; Hanyu, H.; Matthis, A.L.; Engevik, K.A.; Gurniak, C.B.; Witke, W.; Turner, J.R.; Zhang, T.; Montrose, M.H. Cell Injury Triggers Actin Polymerization to Initiate Epithelial Restitution. *J. Cell Sci.* **2018**, *131*, jcs216317. [CrossRef]
31. Lin, N.; Xu, L.-F.; Sun, M. The Protective Effect of Trefoil Factor 3 on the Intestinal Tight Junction Barrier Is Mediated by Toll-like Receptor 2 via a PI3K/Akt Dependent Mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *440*, 143–149. [CrossRef] [PubMed]
32. Guo, J.; Xu, L.; Teng, X.; Sun, M. MicroRNA-7-5p Regulates the Proliferation and Migration of Intestinal Epithelial Cells by Targeting Trefoil Factor 3 via Inhibiting the Phosphoinositide 3-Kinase/Akt Signalling Pathway. *Int. J. Mol. Med.* **2017**, *40*, 1435–1443. [CrossRef] [PubMed]
33. Guo, J.; Sun, M.; Teng, X.; Xu, L. MicroRNA-7-5p Regulates the Expression of TFF3 in Inflammatory Bowel Disease. *Mol. Med. Rep.* **2017**, *16*, 1200–1206. [CrossRef] [PubMed]
34. Lozano-Pérez, A.A.; Rodriguez-Nogales, A.; Ortiz-Cullera, V.; Algieri, F.; Garrido-Mesa, J.; Zorrilla, P.; Rodriguez-Cabezas, M.E.; Garrido-Mesa, N.; Pilar Utrilla, M.; de Matteis, L.; et al. Silk Fibroin Nanoparticles Constitute a Vector for Controlled Release of Resveratrol in an Experimental Model of Inflammatory Bowel Disease in Rats. *Int. J. Nanomed.* **2014**, *9*, 4507–4520. [CrossRef]
35. Ochman, H.; Selander, R.K. Standard Reference Strains of Escherichia Coli from Natural Populations. *J. Bacteriol.* **1984**, *157*, 690–693. [CrossRef]
36. Diaz-Garrido, N.; Badia, J.; Baldomà, L. Modulation of Dendritic Cells by Microbiota Extracellular Vesicles Influences the Cytokine Profile and Exosome Cargo. *Nutrients* **2022**, *14*, 344. [CrossRef]

37. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [CrossRef]
38. Hwang, D.; Jo, H.A.; Hwang, S.; Kim, J.K.; Kim, I.H.; Lim, Y.H. Conditioned Medium from LS 174T Goblet Cells Treated with Oxyresveratrol Strengthens Tight Junctions in Caco-2 Cells. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *85*, 280–286. [CrossRef]
39. Bu, X.D.; Li, N.; Tian, X.Q.; Huang, P.L. Caco-2 and LS174T Cell Lines Provide Different Models for Studying Mucin Expression in Colon Cancer. *Tissue Cell* **2011**, *43*, 201–206. [CrossRef]
40. Zhang, Y.G.; Wu, S.; Xia, Y.; Sun, J. Salmonella Infection Upregulates the Leaky Protein Claudin-2 in Intestinal Epithelial Cells. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e58606. [CrossRef]
41. Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; et al. Fiji: An Open-Source Platform for Biological-Image Analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 676–682. [CrossRef] [PubMed]
42. Arzt, M.; Deschamps, J.; Schmied, C.; Pietzsch, T.; Schmidt, D.; Tomancak, P.; Haase, R.; Jug, F. LABKIT: Labeling and Segmentation Toolkit for Big Image Data. *Front. Comput. Sci.* **2022**, *4*, 777728. [CrossRef]
43. Cañas, M.-A.; Giménez, R.; Fábrega, M.-J.; Toloza, L.; Baldomà, L.; Badia, J. Outer Membrane Vesicles from the Probiotic Escherichia Coli Nissle 1917 and the Commensal ECOR12 Enter Intestinal Epithelial Cells via Clathrin-Dependent Endocytosis and Elicit Differential Effects on DNA Damage. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0160374. [CrossRef] [PubMed]
44. Albillos, A.; de Gottardi, A.; Rescigno, M. The Gut-Liver Axis in Liver Disease: Pathophysiological Basis for Therapy. *J. Hepatol.* **2020**, *72*, 558–577. [CrossRef]
45. Martyniak, A.; Medyńska-Przęczek, A.; Wędrychowicz, A.; Skoczeń, S.; Tomasik, P.J. Prebiotics, Probiotics, Synbiotics, Paraprobiotics and Postbiotic Compounds in IBD. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1903. [CrossRef]
46. Leeming, E.R.; Johnson, A.J.; Spector, T.D.; Roy, C.I.L. Effect of Diet on the Gut Microbiota: Rethinking Intervention Duration. *Nutrients* **2019**, *11*, 2862. [CrossRef]
47. Nataraj, B.H.; Ali, S.A.; Behare, P.V.; Yadav, H. Postbiotics-Parabiotics: The New Horizons in Microbial Biotherapy and Functional Foods. *Microb. Cell Fact.* **2020**, *19*, 168. [CrossRef]
48. Scott, E.; De Paepe, K.; Van de Wiele, T. Postbiotics and Their Health Modulatory Biomolecules. *Biomolecules* **2022**, *12*, 1640. [CrossRef]
49. Żółkiewicz, J.; Marzec, A.; Ruszczyński, M.; Feleszko, W. Postbiotics-A Step Beyond Pre- and Probiotics. *Nutrients* **2020**, *12*, 2189. [CrossRef]
50. Ma, L.; Shen, Q.; Lyu, W.; Lv, L.; Wang, W.; Yu, M.; Yang, H.; Tao, S.; Xiao, Y. Clostridium Butyricum and Its Derived Extracellular Vesicles Modulate Gut Homeostasis and Ameliorate Acute Experimental Colitis. *Microbiol. Spectr.* **2022**, *10*, e0136822. [CrossRef]
51. Shen, Y.; Torchia, M.L.G.; Lawson, G.W.; Karp, C.L.; Ashwell, J.D.; Mazmanian, S.K. Outer Membrane Vesicles of a Human Commensal Mediate Immune Regulation and Disease Protection. *Cell Host Microbe* **2012**, *12*, 509–520. [CrossRef] [PubMed]
52. Kang, C.S.; Ban, M.; Choi, E.J.; Moon, H.G.; Jeon, J.S.; Kim, D.K.; Park, S.K.; Jeon, S.G.; Roh, T.Y.; Myung, S.J.; et al. Extracellular Vesicles Derived from Gut Microbiota, Especially Akkermansia Muciniphila, Protect the Progression of Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e76520. [CrossRef] [PubMed]
53. Chelakkot, C.; Choi, Y.; Kim, D.K.; Park, H.T.; Ghim, J.; Kwon, Y.; Jeon, J.; Kim, M.S.; Jee, Y.K.; Gho, Y.S.; et al. Akkermansia Muciniphila-Derived Extracellular Vesicles Influence Gut Permeability through the Regulation of Tight Junctions. *Exp. Mol. Med.* **2018**, *50*, e450. [CrossRef] [PubMed]
54. Dossinger, V.; Kayademir, T.; Blin, N.; Gött, P. Down-Regulation of TFF Expression in Gastrointestinal Cell Lines by Cytokines and Nuclear Factors. *Cell. Physiol. Biochem.* **2002**, *12*, 197–206. [CrossRef] [PubMed]
55. Loncar, M.B.; Al-Azzeh, E.D.; Sommer, P.S.M.; Marinovic, M.; Schmehl, K.; Kruschewski, M.; Blin, N.; Stohwasser, R.; Gött, P.; Kayademir, T. Tumour Necrosis Factor α and Nuclear Factor KB Inhibit Transcription of Human TFF3 Encoding a Gastrointestinal Healing Peptide. *Gut* **2003**, *52*, 1297–1303. [CrossRef]
56. Grabowski, M.; Murgueitio, M.S.; Bermudez, M.; Wolber, G.; Weindl, G. The Novel Small-Molecule Antagonist MMG-11 Preferentially Inhibits TLR2/1 Signaling. *Biochem. Pharmacol.* **2020**, *171*, 113687. [CrossRef]
57. Krüger, K.; Schmid, S.; Paulsen, F.; Ignatius, A.; Klinger, P.; Hotfiel, T.; Swoboda, B.; Gelse, K. Trefoil Factor 3 (TFF3) Is Involved in Cell Migration for Skeletal Repair. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4277. [CrossRef]
58. Dignass, A.; Lynch-Devaney, K.; Kindon, H.; Thim, L.; Podolsky, D.K. Trefoil Peptides Promote Epithelial Migration through a Transforming Growth Factor β-Independent Pathway. *J. Clin. Investig.* **1994**, *94*, 376–383. [CrossRef]
59. Zhang, Y.; Liu, Y.; Wang, L.; Song, H. The Expression and Role of Trefoil Factors in Human Tumors. *Transl. Cancer Res.* **2019**, *8*, 1609–1617. [CrossRef]
60. Tawiah, A.; Moreau, F.; Kumar, M.; Tiwari, S.; Falguera, J.; Chadee, K. High MUC2 Mucin Biosynthesis in Goblet Cells Impedes Restitution and Wound Healing by Elevating Endoplasmic Reticulum Stress and Altered Production of Growth Factors. *Am. J. Pathol.* **2018**, *188*, 2025–2041. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



4. CAPÍTULO 2

Modulación de genes relacionados con la serotonina mediante EVs del probiótico Escherichia coli Nissle 1917 en un modelo de inflamación inducida por IL-1β en células epiteliales intestinales.

Modulation of Serotonin-Related Genes by Extracellular Vesicles of the Probiotic Escherichia coli Nissle 1917 in the Interleukin-1β-Induced Inflammation Model of Intestinal Epithelial Cells

Yenifer Olivo-Martínez [1,2], Sergio Martínez-Ruiz [1,3,4], Cecilia Cordero-Alday [1,3,4], Manel Bosch [5], Josefa Badia [1,3,4,*,†], and Laura Baldoma [1,3,4,*,†]

[1] Departament de Bioquímica i Fisiologia, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain
[2] Biochemistry and Diseases Research Group, Facultad de Medicina, Universidad de Cartagena, Cartagena 130015, Colombia
[3] Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), 08028 Barcelona, Spain
[4] Institut de Recerca Sant Joan de Déu (IRSJD), 08950 Barcelona, Spain
[5] Unitat de Microscòpia Òptica Avançada, Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

- *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*(10), 5338
- https://doi.org/10.3390/ijms25105338
- ISSN: 1422-0067
- **Journal Rank:** Q1 (*Biochemistry & Molecular Biology*) /Q2 (*Chemistry, Multidisciplinary*)
- **Impact Factor:** 5.6 (2022)-Factor de impacto a 5 años: 6,2 (2022)

Los resultados fueron presentados en:

Olivo-Martínez Y, Martínez-Ruiz S, Cecilia C, Badía J, Baldoma L. Revista Anales de Microbiota, Probióticos y Prebióticos, vol. 5, nº1, 2024. https://semipyp.es/wp-content/uploads/2024/02/AMPP-5-1.pdf . **Poster**

RESUMEN

Introducción

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es una afección inflamatoria crónica que implica respuestas inmunitarias desreguladas y desequilibrios en la microbiota intestinal en individuos genéticamente susceptibles. Las terapias actuales para la EII a menudo tienen efectos secundarios importantes y un éxito limitado, lo que impulsa la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas. Los enfoques basados en microbiomas tienen como objetivo restablecer el equilibrio de la microbiota intestinal hacia perfiles antiinflamatorios y curativos de las mucosas. Las vesículas extracelulares (EVs) de bacterias intestinales beneficiosos están emergiendo como posibles postbióticos. La serotonina desempeña un papel crucial en la homeostasis intestinal y su desregulación se asocia con la gravedad de la EII.

Objetivo y Metodología

Nuestro estudio investigó el impacto de los EVs del probiótico EcN y el comensal EcoR12 en el metabolismo de la serotonina intestinal en condiciones inflamatorias utilizando un modelo de inflamación inducida por IL-1β en células Caco-2. Además, evaluamos la capacidad de las EVs de la microbiota para contrarrestar las citocinas proinflamatorias, la alteración de enzimas relacionadas con el estrés oxidativo y proteínas de unión estrecha en condiciones inflamatorias. Se analizó la expresión de miRNAs reguladores de SERT.

Resultados

Las EVs de EcN redujeron los niveles de serotonina libre al regular positivamente la expresión de SERT a través de la regulación negativa de miR-24, miR-200a, TLR4 y NOD1. Además, los EVs de EcN mitigaron los cambios inducidos por IL-1β en las proteínas de unión estrecha y los marcadores de estrés oxidativo.

Conclusiones

Estos hallazgos subrayan el potencial de las intervenciones con postbióticos como enfoque terapéutico para la EII y patologías relacionadas, y las EVs de EcN son

prometedores para modular el metabolismo de la serotonina y preservar la integridad de la barrera intestinal. Este estudio es el primero en demostrar la regulación de miR-24 y miR-200a por EVs derivados de probióticos.

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Article

Modulation of Serotonin-Related Genes by Extracellular Vesicles of the Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 in the Interleukin-1β-Induced Inflammation Model of Intestinal Epithelial Cells

Yenifer Olivo-Martínez [1,2], Sergio Martínez-Ruiz [1,3,4], Cecilia Cordero-Alday [1,3,4], Manel Bosch [5], Josefa Badia [1,3,4,*,†] and Laura Baldoma [1,3,4,*,†]

[1] Departament de Bioquímica i Fisiologia, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; yeni_olivo@hotmail.com (Y.O.-M.); sergio_martinez_ruiz@ub.edu (S.M.-R.); corderocecilia16@gmail.com (C.C.-A.)
[2] Biochemistry and Diseases Research Group, Facultad de Medicina, Universidad de Cartagena, Cartagena 130015, Colombia
[3] Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), 08028 Barcelona, Spain
[4] Institut de Recerca Sant Joan de Déu (IRSJD), 08950 Barcelona, Spain
[5] Unitat de Microscòpia Òptica Avançada, Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; mbosch@ub.edu
* Correspondence: josefabadia@ub.edu (J.B.); lbaldoma@ub.edu (L.B.)
† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Inflammatory bowel disease (IBD) is a chronic inflammatory condition involving dysregulated immune responses and imbalances in the gut microbiota in genetically susceptible individuals. Current therapies for IBD often have significant side-effects and limited success, prompting the search for novel therapeutic strategies. Microbiome-based approaches aim to restore the gut microbiota balance towards anti-inflammatory and mucosa-healing profiles. Extracellular vesicles (EVs) from beneficial gut microbes are emerging as potential postbiotics. Serotonin plays a crucial role in intestinal homeostasis, and its dysregulation is associated with IBD severity. Our study investigated the impact of EVs from the probiotic Nissle 1917 (EcN) and commensal *E. coli* on intestinal serotonin metabolism under inflammatory conditions using an IL-1β-induced inflammation model in Caco-2 cells. We found strain-specific effects. Specifically, EcN EVs reduced free serotonin levels by upregulating SERT expression through the downregulation of miR-24, miR-200a, TLR4, and NOD1. Additionally, EcN EVs mitigated IL-1β-induced changes in tight junction proteins and oxidative stress markers. These findings underscore the potential of postbiotic interventions as a therapeutic approach for IBD and related pathologies, with EcN EVs exhibiting promise in modulating serotonin metabolism and preserving intestinal barrier integrity. This study is the first to demonstrate the regulation of miR-24 and miR-200a by probiotic-derived EVs.

Keywords: gut microbiota; postbiotics; extracellular vesicles; inflammatory bowel disease (IBD); intestinal barrier permeability; serotonin transporter (SERT); miR-24; miR-200a

check for updates

Citation: Olivo-Martínez, Y.; Martínez-Ruiz, S.; Cordero-Alday, C.; Bosch, M.; Badia, J.; Baldoma, L. Modulation of Serotonin-Related Genes by Extracellular Vesicles of the Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 in the Interleukin-1β-Induced Inflammation Model of Intestinal Epithelial Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 5338. https://doi.org/10.3390/ijms25105338

Academic Editors: Rocco Spagnuolo and Daniela Pugliese

Received: 26 April 2024
Revised: 7 May 2024
Accepted: 9 May 2024
Published: 14 May 2024

Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

The gut microbiota plays crucial roles in the physiology of the gastrointestinal tract. This microbial community assists in digestion, provides competitive mechanisms against enteric pathogens, and contributes to the development of the host immune system and maintenance of the intestinal epithelial barrier [1]. Microbiota–host interaction takes place at the complex interface of the intestinal mucosa, which includes several components that comprise the intestinal epithelial barrier. The mucus layer that covers the intestinal epithelium is formed by the extracellular glycoprotein mucin-2 (MUC-2) and contains

antimicrobial peptides and Immunoglobulin A secreted by epithelial and immune cells, respectively. This layer creates a physical and chemical barrier that prevents luminal bacteria from reaching the epithelial cells [2]. Below the mucus layer, the intestinal epithelium is formed by a monolayer of epithelial cells sealed by tight junctions (TJs). These junctions work together to protect the host against harmful molecules and infectious agents by forming a selectively permeable barrier. Intestinal epithelial cells also play a fundamental role in sensing gut microbes through specific immune receptors, namely pattern recognition receptors (PRRs), which recognize conserved microbial-associated molecular patterns (MAMPs). In response to gut microbes, intestinal epithelial cells secrete immune mediators that modulate host immune responses, sustaining a well-balanced relationship between the gut microbiota and the host immune system [3]. Due to the anatomical structure of the gut barrier, microbiota–host interactions do not involve direct cell-to-cell contacts. Instead, they are principally mediated by microbiota-secreted factors, such as metabolites and extracellular vesicles (EVs) [4].

The proper physiology and homeostasis of the host depend on the integrity of the epithelial barrier. Factors that disturb the intestinal environment trigger imbalances in the gut microbiota's composition and diversity (dysbiosis). This condition negatively affects the intestinal barrier and host-balanced responses. Disruption of the epithelial barrier and the subsequent increase in paracellular permeability allow for the translocation of intestinal microbes and their components into the lamina propria. The bacterial molecules activate the host immune system, triggering inflammatory responses that cause the dysfunction in many organs and tissues. High levels of circulating pro-inflammatory mediators and microbial products negatively disrupt the equilibrium of normal communication networks between the gut and distal organs, thus contributing to the development of a wide variety of intestinal and extraintestinal diseases [5–7]. The gut microbiota modulates the intestinal barrier through several mechanisms and factors. Besides the well-known modulation through immune receptors, the microbiota greatly influences other receptors/signaling pathways that control intestinal permeability, such as those activated by serotonin, endocannabinoids, or bile salts [8,9].

Serotonin, also known as 5-hydroxytryptamine (5-HT), is a key mediator of intestinal function. In this tissue, it modulates the enteric nervous system, immune responses, inflammation, gut motility, and barrier integrity [10]. Importantly, about 95% of the body's serotonin is produced in the gut by enterochromaffin cells (ECCs), a population of intestinal epithelial cells that establish synapses with vagal neurons. Dietary tryptophan is the precursor for intestinal 5-HT synthesis in response to many stimuli, including signals from the gut microbiota. In ECCs, tryptophan is converted into 5-hydroxytryptophan through the action of tryptophan hydroxylase 1 (TPH1) and subsequently transformed into serotonin through a decarboxylase reaction. Free intestinal serotonin levels depend on the serotonin transporter (SERT, encoded by *slc6a4*), located at the apical and the basolateral sides of the cell membrane. Once released, serotonin can be taken up by intestinal epithelial cells through SERT and further inactivated by monoamine oxidase, the first enzyme of the serotonin degradation pathway. In addition, 5-HT released from the basolateral side can interact with specific receptors (5-HTR) of the surrounding epithelial, immune, and neuronal cells, triggering transduction signals that ultimately control vagal reflexes, gut motility, and barrier permeability. However, most of the intestinal 5-HT is distributed through the bloodstream, acting as an endocrine regulatory signal for the whole body [10]. Importantly, the gut microbiota modulates the expression of host serotonergic genes, thus influencing serotonin bioavailability and actions [11–13]. In this context, activation of the immune receptors toll-like receptor 2 (TLR2), toll-like receptor 4 (TLR4), and nucleotide-binding oligomerization domain protein-1 (NOD1) by microbial ligands inhibits SERT activity and/or expression in intestinal epithelial cell lines and animal models [14–16]. In addition, some microbiota species can synthesize serotonin and other tryptophan-derived metabolites, such as indole derivatives. Microbial tryptophan metabolites act through the aryl hydrocarbon intracellular receptor (AHR) and protect the gut barrier's integrity [17].

Disruption of serotonin homeostasis in the gut, characterized by an excess level of extracellular serotonin, can lead to intestinal inflammation and leaky gut, thereby contributing to pathological disorders, such as inflammatory bowel disease (IBD) or irritable bowel syndrome (IBS) [10,18,19]. In the intestinal epithelium of Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) patients, elevated levels of serotonin correlated with reduced expression of SERT [20] and upregulation of miRNAs that target SERT mRNA, such as miR-24 and miR-200a [21,22]. Also, serotonin signaling modulates the gut microbiota composition towards a dysbiosis profile that causes inflammation and, therefore, susceptibility to colitis [23].

The interconnection between intestinal dysbiosis, serotonin, barrier disruption, and exacerbated immune responses provides the basis for the design of microbiome-oriented therapeutic strategies to restore intestinal homeostasis in IBD patients. One such strategy is the manipulation of the gut microbiota composition and function through probiotic-based interventions. Clinical trials have shown that the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 EcN (EcN) shows comparable efficacy to the commonly used drug mesalazine in ameliorating clinical symptoms [24]. At present, the identification of novel probiotic strains for IBD treatment is an emerging area. Among them, *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii* are considered promising candidates for next-generation probiotics [25,26]. Importantly, the probiotics EcN, *A. muciniphila,* and *F. prausnitzii* improve intestinal serotonin balance by modulating serotonergic genes [11–13].

The administration of viable probiotics entails certain concerns, particularly in individuals with a weakened immune system. In these cases, probiotic treatment could enhance inflammatory responses and turn harmless probiotic bacteria into detrimental microorganisms. To avoid safety risks, upcoming microbiome-based therapies to target the gut involve postbiotics [26]. According to the recent definition by the International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP), the term postbiotic refers to a preparation of inanimate (non-replicative) microorganisms or their components that confer a health benefit on the host, including bacterial cell components, biomolecules, metabolites, and secreted bioactive compounds [27]. In this context, probiotic/microbiota EVs are emerging as potential novel postbiotics [28,29]. Bacterial EVs are nano-scale bilayer structures originating from bacterial membranes that enclose biological components produced by the parental strain, including MAMPs, proteins, metabolites, DNA, and RNA. Recent research has provided scientific evidence that EVs mediate microbiota functions by transporting and delivering effector molecules into host cells. These molecules modulate host signaling pathways and cellular processes, including immune and defense responses. The effects exerted by microbiota EVs are strain-specific as they depend on their bacterial origin and cargo [4]. In this context, our studies have shown that EVs from probiotic and commensal *E. coli* strains modulate epithelial barrier function [30,31] and activate regulatory mechanisms to keep balanced anti-/pro-inflammatory responses [32,33]. Microbiota EVs stimulate dendritic cells to drive specific T-cell responses through several mechanisms that include activation of TLR–signaling pathways, regulation of miRNA expression, and differential release of immune mediators through exosomes [34,35]. Moreover, oral gavage of EVs from the probiotic EcN ameliorated colitis progression in dextran-sodium-sulphate-treated mice [36]. Recent reports show that EVs from *A. muciniphila* and *F. prausnitzii* modulate the expression of genes encoding enzymes and receptors of the serotonin system [12,13].

Given that the gastrointestinal tract is a major pool of serotonin in humans and the intestinal microbiome modulates the serotonin system, postbiotic-based interventions are foreseen as a therapeutic strategy to manipulate serotonergic signaling in IBD and other pathologies associated with exacerbated intestinal serotonin levels [37,38]. In this study, we aimed to evaluate whether EVs isolated from intestinal *E. coli* strains, specifically the probiotic EcN and the commensal EcoR12, could modulate intestinal serotonin metabolism under inflammatory conditions. We used the Caco-2 in vitro cellular model to induce inflammation with interleukin-1β (IL-1β), a major pro-inflammatory cytokine produced in IBD [39]. The anti-inflammatory effects of the bacterial EVs were assessed by analyzing the expression of genes and proteins of the serotonin system, pro-inflammatory cytokines,

oxidative stress-related enzymes, and tight junction proteins. To deepen knowledge on the mechanisms underlying regulation of the serotonergic system, expression analysis of SERT-controlling miRNAs was approached. All assays were also performed in Caco-2 cell monolayers in the absence of IL-1β to elucidate how the regulatory mechanisms function under both physiological and pathological conditions.

2. Results

2.1. Modulation of the Serotonergic System by EcN or EcoR12 EVs

The effect of EVs on the serotonergic system was evaluated in Caco-2 cells following two settings: (i) polarized cell monolayers as a model of the intact intestinal epithelium and (ii) polarized cell monolayers treated with IL-1β as an inflammation model of increased intestinal permeability.

Before conducting the analysis, we established the inflammation model conditions. Initially, we assessed the impact of IL-1β concentration on Caco-2 cell viability following 48 h of incubation. The MTT results revealed that IL-1β concentrations of 1 or 10 ng/mL did not cause any cytotoxic effect because cell viability was close to 100% (Figure S1A). When IL-1β was added at 100 ng/mL, cell viability tended to decrease to approximately 80%. However, differences versus control cells were not statistically significant. Next, we determined the concentration of EVs to be used in the experiments. For this purpose, Caco-2 cell monolayers were exposed to EVs derived from EcN or EcoR12 at two different doses, 10 µg/mL and 60 µg/mL, for 48 h. The expression of the serotonergic genes *TPH1* (encoding tryptophan hydroxylase-1), *SERT* (encoding serotonin reuptake transporter), and *MAO* (encoding monoamine oxidase) was analyzed through RT-qPCR (Figure S1B). At the lowest concentration of EVs (10 µg/mL), no significant differences in the mRNA levels of these genes were observed compared to untreated control cells, except for *TPH1*, which was upregulated through treatment with EcN EVs ($p < 0.05$). Increasing the concentration of EcN EVs to 60 µg/mL resulted in higher *TPH1* mRNA levels ($p \leq 0.01$). Regarding *SERT* expression, upregulation of this gene was only observed at the highest concentration (60 µg/mL) of both EcN and EcoR12 EVs ($p < 0.05$ vs. control). In contrast, *MAO* mRNA expression was not influenced by treatment with EcN EVs or EcoR12 EVs at any concentration tested.

Based on these results and the existing literature [40], we established the experimental conditions for the inflammation model as follows. Polarized Caco-2 cells were subjected to a 3 h pretreatment with EVs (60 µg/mL) derived from either the probiotic EcN or the commensal EcoR12 followed by exposure to IL-1β (10 ng/mL) for an additional 48 h. The EVs were kept in the culture medium until the end of the experiment. In the model of an intact intestinal epithelium, Caco-2 cells were treated with EVs (60 µg/mL) for 48 h in the absence of IL-1β.

In the model mimicking an intact intestinal epithelium, the results from the RT-qPCR analysis showed differential patterns of gene expression depending on the treatment (Figure 1A). As stated above, EcN EVs significantly upregulated *TPH1* ($p \leq 0.05$ vs. control), whereas EcoR12 EVs did not modify its expression, resulting in *TPH1* mRNA levels that were indistinguishable from those of untreated control cells. Both EcN EVs ($p \leq 0.01$) and EcoR12 EVs ($p \leq 0.05$) triggered *SERT* upregulation. Under IL-1β-induced inflammation conditions (Figure 1B), treatment with this cytokine significantly decreased *SERT* expression ($p \leq 0.05$ vs. control). Remarkably, *SERT* downregulation was counteracted by EcN and EcoR12 EVs, leading to *SERT* mRNA levels that were higher than those of untreated control cells. The induction of *TPH1* expression by EcN EVs was not evident under IL-1β-induced inflammation conditions.

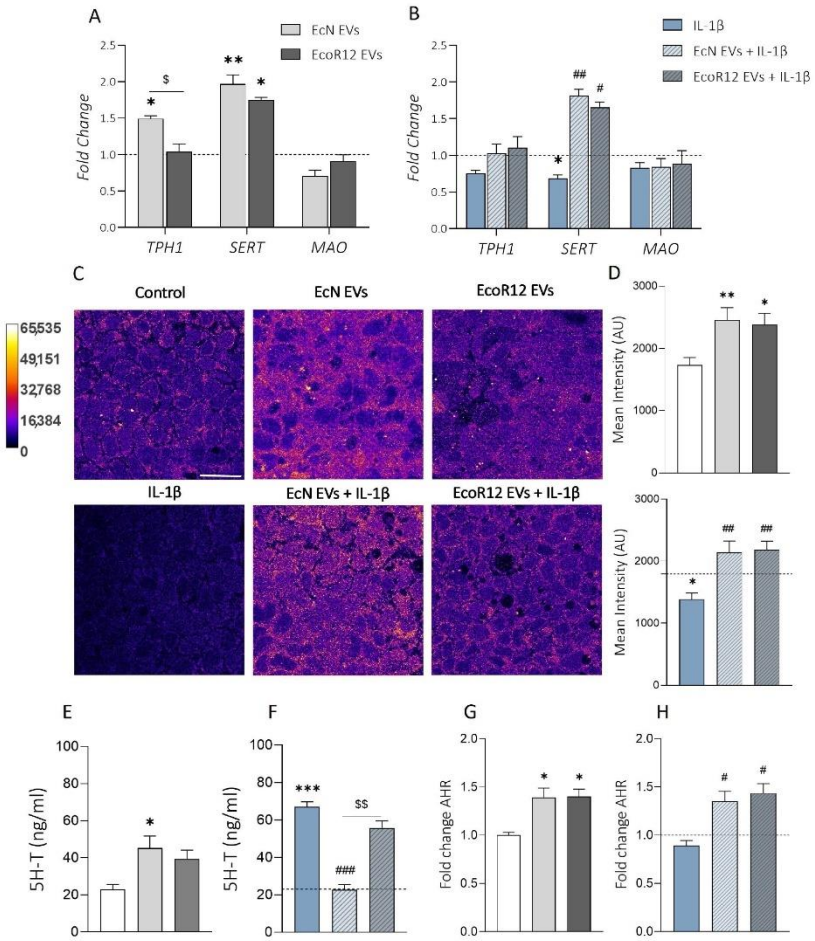


Figure 1. Modulation of the serotonergic system by EVs from the probiotic EcN and the commensal EcoR12 in Caco-2 cells. (**A**,**B**) mRNA expression levels of *SERT*, *TPH1*, and *MAO* in Caco-2 cell monolayers. Relative mRNA levels were measured through RT-qPCR using GAPDH as the reference gene. (**A**) Caco-2 cells were challenged with EVs (60 µg/mL) from EcN or EcoR12 for 48 h (intact intestinal epithelial model). (**B**) Caco-2 cells were pretreated with EVs (60 µg/mL) from EcN or EcoR12 for 3 h and then challenged with IL-1β (10 ng/mL) for 48 h (intestinal inflammation model). (**C**,**D**) Quantification of SERT through immunofluorescence confocal microscopy. (**C**) Representative confocal maximal projection images are shown. Images are color-coded with the Fire look-up table, and its calibration bar is shown on the left. Scale bar, 20 µm. Consistent with the intracellular SERT trafficking through membranous structures, the fluorescent signal is distributed in the cytoplasm. (**D**) Quantification of the SERT mean intensity in Caco-2 cells after the indicated treatments. Data are presented as mean ± SEM of arbitrary intensity units (AU) (n = 3 independent biological replicates). (**E**,**F**) Secreted 5-HT levels were quantified through ELISA in culture supernatant after 48 h of incubation

following the model of the intact intestinal epithelium (**E**) or the inflammation model (**F**). (**G**,**H**) Relative mRNA levels of *AHR* in the model of the intact intestinal epithelium (**G**) or under conditions of IL-1β-induced inflammation (**H**). In all panels, data are expressed as mean ± SEM from 3 independent experiments, and control values were indicated by bars or dashed lines. Differences were evaluated with one-way ANOVA, followed by post hoc Tukey's. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ vs. control (white bar or dashed line); # $p \leq 0.05$, ## $p \leq 0.01$, ### $p \leq 0.001$ vs. IL-1β group; $ $p \leq 0.05$, $$ $p \leq 0.01$, significance between cells stimulated with EcN and EcoR12 EVs.

To confirm the impact of EcN and EcoR12 EVs on *SERT* expression, we carried out immunofluorescence staining followed by confocal laser scanning microscopy to quantify SERT protein levels in Caco-2 cell monolayers challenged under the established experimental conditions. Representative images are presented in Figure 1C. The SERT signal was quantified as described in the Material and Methods section (data collected from three independent biological experiments with five different fields of view with 30–40 cells each). Consistent with the mRNA expression profiles, the upregulation of SERT in cells incubated with EVs was accompanied by an increase in the signal intensity (Figure 1D). This correlation was observed in the model of the intact intestinal epithelium ($p \leq 0.01$ for EcN EVs, $p \leq 0.05$ for EcoR12 EVs vs. control) and in the inflammation model induced by IL-1β ($p \leq 0.01$ for both EcN and EcoR12 EVs vs. IL-1β treated cells).

To assess the impact of SERT modulation by microbiota/probiotic EVs on serotonin levels, 5-HT was quantified through ELISA in the culture supernatants. In the model of the intact intestinal epithelium, 5-HT secreted levels were increased through treatment with EcN EVs ($p \leq 0.05$) or EcoR12 EVs compared to control cells (Figure 1E). However, under conditions of IL-1β-induced inflammation, the results showed differential regulation by EcN and EcoR12 EVs. Treatment with IL-1β resulted in a three-fold increase in secreted 5-HT levels compared to control cells ($p \leq 0.001$). The IL-1β-induced increase in 5-HT secretion was impaired by EcN EVs ($p < 0.01$ vs. IL-1β), whereas EcoR12 EVs did not exhibit any modulatory effect on 5-HT availability (Figure 1F).

In addition to its conversion into serotonin by host metabolism, dietary tryptophan is metabolized to different bioactive compounds through microbial enzymes. These microbial metabolites interact with the intracellular receptor AHR of epithelial cells to modulate several pathways, including intestinal inflammation [10]. In this context, we sought to analyze the regulation of the *AHR* gene by EcN or EcoR12 EVs in our experimental model. EVs from both gut-beneficial strains upregulated *AHR* in all conditions tested ($p \leq 0.05$), without significant differences between strains (Figure 1G,H).

2.2. Regulation of miRNAs That Target SERT mRNA by EcN or EcoR12 EVs

The results presented above suggested a complex regulatory network governing serotonin availability in response to microbiota/probiotic EVs in the context of intestinal inflammation. To examine these regulatory mechanisms, the expression of miRNAs known to post-transcriptionally regulate SERT expression, namely miR-24 and miR-200a [41,42], was evaluated.

Under conditions of an intact intestinal epithelium, no differences in the relative levels of miR-24 and miR-200a were observed between control and EV-treated cells (Figure 2A). In contrast, under conditions of IL-1β-induced inflammation, the RT-qPCR results revealed distinctive miRNA expression patterns. When compared to the control, exposure to IL-1β induced a significant upregulation of miR-24 ($p < 0.01$) and miR-200a ($p < 0.05$) (Figure 2B). Remarkably, incubation with EcN EVs caused a significant decrease in the expression of both miRNAs compared to IL-1β-treated cells in the absence of EVs ($p < 0.05$). In contrast, stimulation with EcoR12 EVs was unable to prevent the IL-1β-induced-upregulation of both miRNAs (Figure 2B). These results revealed an inverse correlation between the expression levels of the examined miRNAs and *SERT* in Caco-2 cells treated with IL-1β. This finding is consistent with the fact that upregulation of miR-24 and miR-200a during intestinal inflammation suppresses *SERT* mRNA and protein expression. In turn, SERT suppression is associated with increased 5-HT availability, as assessed through ELISA in the supernatant

of Caco-2 cells treated with IL-1β (Figure 1F). In the IL-1β model, the upregulation of *SERT* in cells treated with EVs from the probiotic EcN correlated well with the downregulation of both miRNAs. However, this inverse association was not observed in cells treated with EcoR12 EVs, thus suggesting that EVs from this commensal may regulate *SERT* expression through other mechanisms.

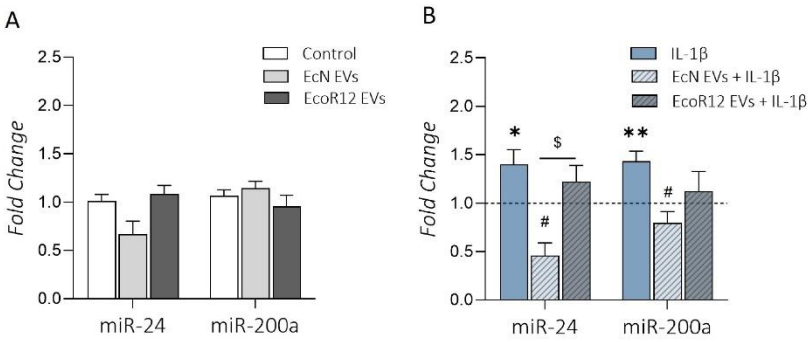


Figure 2. Regulation of miR-24 and miR-200a by EcN or ECOR12 EVs. (**A**) Intact intestinal epithelium model. Caco-2 cells were challenged with EVs (60 μg/mL) from EcN or EcoR12 for 48 h. (**B**) Inflammation model. Caco-2 cells were treated with EVs (60 μg/mL) from EcN or EcoR12 for 3 h and then challenged with IL-1β (10 ng/mL) for 48 h. Relative expression levels of the indicated miRNAs were measured through RT-qPCR and normalized to the U6 reference gene. In all panels, data are expressed as mean ± SEM from three independent experiments. Differences were evaluated with one-way ANOVA, followed by post hoc Tukey's. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ vs. control cells (bars in panel (**A**) or dashed line in panel (**B**)); $^{\#}$ $p \leq 0.05$ vs. IL-1β-treated cells; $^{\$}$ $p \leq 0.05$, significance between cells stimulated with EcN and EcoR12 EVs.

2.3. Modulation of Innate Immune Receptors by EcN or EcoR12 EVs

The interplay between microbiota signals and immune receptors has a great influence on the intestinal serotonin levels and inflammation [19]. To decipher the mechanisms underlying the differential modulation of the serotoninergic system by EcN and EcoR12 EVs under inflammatory conditions, we analyzed their impact on the expression of genes encoding TLR2, TLR4, and NOD1 in polarized Caco-2 cell monolayers. In the model of the intact intestinal epithelium, EcoR12 EVs promoted upregulation of *TLR4*, whereas EcN EVs triggered upregulation of *NOD1* compared to untreated control cells (Figure 3A). In both cases, the increase in the mRNA levels of these genes, although statistically significant ($p \leq 0.05$), was lower than 1.5-fold. In the intestinal inflammation model, the exposure to IL-1β significantly increased *TLR4* mRNA levels by about 3.5-fold ($p < 0.01$) but had very little effect on *TLR2* and *NOD1* expression. Upregulation of *TLR4* by IL-1β was significantly reversed by treatment with EcN EVs ($p < 0.05$). In contrast, EcoR12 EVs were unable to counteract the elevated *TLR4* mRNA levels triggered by IL-1β (Figure 3B). In the presence of this pro-inflammatory cytokine, EcN EVs also reduced *NOD1* expression ($p < 0.05$).

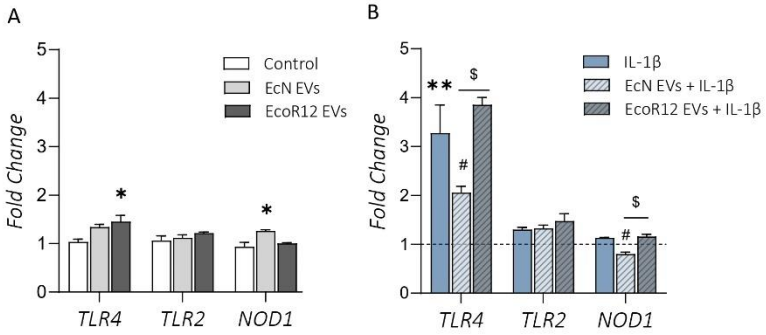


Figure 3. Modulation of TLR2, TLR4, and NOD1 gene expression by EcN or EcoR12 EVs. (**A**) Intact intestinal epithelium model. Caco-2 cells were challenged with EVs (60 μg/mL) from EcN or EcoR12 for 48 h. (**B**) Inflammation model. Caco-2 cells were treated with EVs (60 μg/mL) from EcN or EcoR12 for 3 h and then challenged with IL-1β (10 ng/mL) for 48 h. Relative mRNA levels of the indicated genes were measured through RT-qPCR using GAPDH as the reference gene. In all panels, data are expressed as mean ± SEM from three independent experiments. Differences were evaluated with one-way ANOVA, followed by post hoc Tukey's. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ vs. control cells (bars in panel (**A**) or dashed line in panel (**B**)); # $p \leq 0.05$ vs. IL-1β-treated cells; $ $p \leq 0.05$, significance between cells stimulated with EcN and EcoR12 EVs.

2.4. Modulation of Pro-Inflammatory and Oxidative Stress Markers by EcN or EcoR12 EVs

The differential regulation of immune receptors by EVs from the probiotic EcN or the commensal EcoR12 under inflammatory conditions led us to analyze their influence on the expression of inflammatory mediators and oxidative stress markers. This analysis included the cytokines IL-8, TNF-α, and IL-6 and the inflammatory enzymes cyclooxygenase-2 (COX-2) and the inducible nitric oxide synthase (iNOS), due to their pivotal roles in sustaining inflammation in IBD models, as well as the antioxidant enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), and glutathione reductase (GSR), given their critical function in neutralizing free radicals and managing oxidative stress during inflammation and conditions of excessive intestinal serotonin bioavailability.

In the model of the intact intestinal epithelium (Figure 4A), EVs from both strains significantly induced *IL8*, *IL6*, and *TNFA* mRNA levels ($p < 0.05$) compared to untreated control cells. The pro-inflammatory cytokines were also analyzed at the protein level through ELISA in the culture supernatants. Consistent with the mRNA profiles, the levels of secreted IL-8 and IL-6 were significantly higher in Caco-2 cells incubated with EcN or EcoR12 EVs than in untreated control cells ($p \leq 0.01$). Regarding the antioxidant enzymes, both EcN and EcoR12 EVs triggered upregulation of *SOD* ($p < 0.05$) and *CAT* ($p < 0.01$) compared to control cells. Additionally, *iNOS* expression was induced specifically in response to EcoR12 EVs ($p < 0.05$). No significant changes in the mRNA levels of *COX2*, *GSR*, or *GPx* were observed between cells treated with EVs and those not treated with EVs.

In the model of IL-1β-induced inflammation, treatment with this cytokine promoted a significant upregulation of all of the pro-inflammatory cytokines analyzed (Figure 4B). Again, the modulatory effects mediated by EVs from EcN or EcoR12 were strain-specific. In the presence of IL-1β, treatment with EVs from the probiotic EcN significantly reduced *IL8* and *TNFA* mRNA levels ($p < 0.05$). In contrast, EcoR12 EVs were unable to counteract the increased expression of these genes triggered by IL-1β. At the protein level, ELISA assays confirmed the anti-inflammatory effects of EcN EVs assessed according to their ability to diminish the secreted levels of IL-8 and IL-6 cytokines ($p < 0.05$).

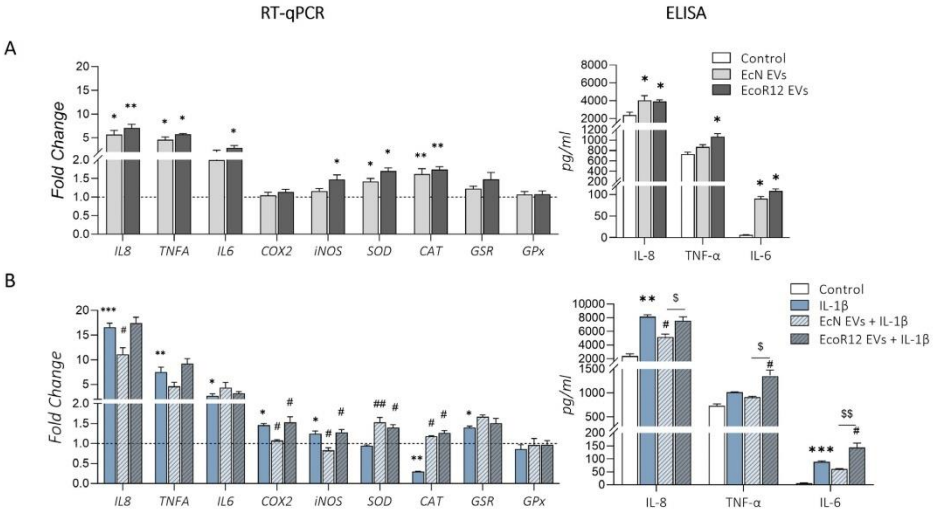


Figure 4. Effects of EcN or EcoR12 EVs on IL-1β-induced production of pro-inflammatory cytokines and oxidative stress enzymes. (**A**) Intact intestinal epithelium model. Caco-2 cells were challenged with EVs (60 μg/mL) from EcN or EcoR12 for 48 h. (**B**) Inflammation model. Caco-2 cells were treated with EVs (60 μg/mL) from EcN or EcoR12 for 3 h and then challenged with IL-1β (10 ng/mL) for 48 h. Relative mRNA levels of the indicated genes were measured through RT-qPCR using GAPDH as the reference gene. Secreted IL-8, IL-6, and TNF-α were quantified through ELISA in the culture supernatants. In all panels, data are expressed as mean ± SEM from three independent experiments. Differences were evaluated with one-way ANOVA, followed by post hoc Tukey's. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ vs. control cells (white bars or dashed lines); $^{\#}$ $p \leq 0.05$, $^{\#\#}$ $p \leq 0.01$ vs. IL-1β-treated cells; $^{\$}$ $p \leq 0.05$, $^{\$\$}$ $p \leq 0.01$, significance between cells stimulated with EcN and EcoR12 EVs.

On the contrary, treatment with EcoR12 EVs did not diminish the secretion of any of the pro-inflammatory cytokines analyzed. This resulted in cytokine concentration values that were similar to or even higher than those observed in Caco-2 cells treated with IL-1β alone. Additionally, *COX2* and *iNOS* were significantly upregulated under conditions of IL-1β-induced inflammation in Caco-2 cells ($p < 0.05$). In this context, treatment with EVs EcN prevented the IL-1β-induced upregulation of both genes ($p < 0.05$), resulting in *COX2* and *iNOS* mRNA levels that were similar to those of untreated control cells. In contrast, EcoR12 EVs did not exhibit any compensatory effect on *COX2* and *iNOS* expression (Figure 4B). Regarding the antioxidant enzymes, the results showed a significant downregulation of *CAT* mRNA levels under conditions of IL-1β-induced inflammation ($p < 0.01$ vs. control), which was prevented by treatment with either EcN EVs ($p < 0.01$) or EcoR12 EVs ($p < 0.05$). In contrast, both treatments involving microbiota/probiotic EVs did not counteract the increased expression of GSR under inflammatory conditions. Although IL-1β did not modify *SOD* expression, upregulation of this gene by EcN and EcoR12 EVs was also observed in the presence of this pro-inflammatory cytokine.

2.5. Effects of EcN or EcoR12 EVs on IL-1β-Induced Epithelial Barrier Damage

Intestinal inflammation and serotonin dysregulation are linked to alterations in the epithelial barrier's integrity/permeability, especially affecting TJ-associated proteins [43,44]. In this context, we sought to analyze the ability of EcN EVs or EcoR12 EVs to preserve

epithelial barrier integrity in Caco-2 cell monolayers challenged with IL-1β in comparison with normal intestinal epithelium conditions.

The epithelial barrier function was analyzed by measuring the transepithelial electrical resistance (TER). To this end, Caco-2 cell monolayers grown in Transwell membrane supports were challenged with IL-1β for 48 h in the absence or presence of EVs from EcN or EcoR12. Untreated cell monolayers were used as a control. Treatment with IL-1β significantly reduced the TER values of polarized cell monolayers compared to untreated control cells. However, apical stimulation with EcN EVs neutralized the decrease in TER caused by this pro-inflammatory cytokine, with values that did not significantly differ from those of untreated control cells. In contrast, EcoR12 EVs did not prevent IL-1β-mediated epithelial barrier disruption (Figure 5C).

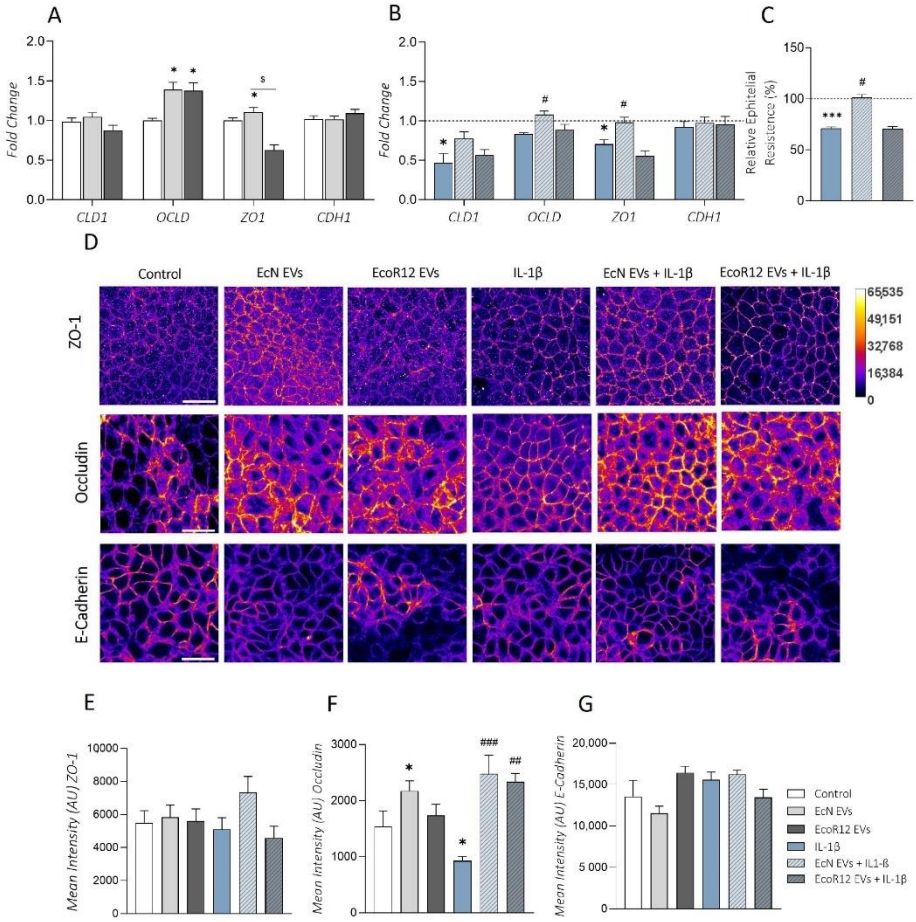


Figure 5. Effects of EcN or EcoR12 EVs on preventing IL-1β-induced alterations on epithelial tight junctions. The bar code for all the conditions analyzed is indicated next to panel G. (**A**) Gene expression

analysis of TJ proteins in Caco-2 cell monolayers treated with EVs (60 µg/mL) from EcN or EcoR12 for 48 h (model of intact intestinal epithelium). (**B**) Gene expression analysis of TJ proteins in Caco-2 cell monolayers in the IL-1β-induced inflammation model. In both panels, relative mRNA levels of the indicated genes were measured through RT-qPCR using GAPDH as the reference gene. (**C**) TER measurement under conditions of IL-1β-induced inflammation. TER values were measured before and after 48 h treatment with IL-1β in the presence and absence of EcN EVs or EcoR12 EVs. Data are presented as percentage of changes in TER from the initial value compared to untreated control cells, which were assigned 100% (dashed line). (**D**) Immunofluorescence staining of ZO-1, occludin, and E-cadherin in Caco-2 cell monolayers challenged with the indicated treatments. Representative confocal maximal projection images are shown in Fire LUT after image processing. Calibration bar of Fire LUT intensity is shown on the right. Scale bar: 20 µm. (**E**–**G**) Quantification of ZO-1, occludin, and E-cadherin total mean intensity, respectively, in Caco-2 cells after the indicated treatments. Data are presented as arbitrary intensity units (AU). In all panels, data are expressed as mean ± SEM from three independent experiments. Differences were evaluated with one-way ANOVA, followed by post hoc Tukey's. * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$ vs. control cells (white bars or dashed line depending on the panel); $^{\#}$ $p \leq 0.05$, $^{\#\#}$ $p \leq 0.01$, $^{\#\#\#}$ $p \leq 0.001$ vs. IL-1β-treated cells; $^{\$}$ $p \leq 0.05$, significance between cells stimulated with EcN and EcoR12 EVs.

Concerning the impact on tight junctions, the expression of major TJ proteins was analyzed both at the mRNA and protein levels after 48 h treatment. Under conditions of a normal intestinal epithelium, EVs isolated from both strains significantly upregulated occludin (*OCLD*) compared to untreated control cells ($p \leq 0.05$). In addition, EcN EVs also caused a significant upregulation of *ZO1* ($p \leq 0.05$). None of the treatments involving EVs altered the mRNA levels of *CLD1* (encoding claudin-1) or *CDH1* (encoding E-cadherin) compared to control cells (Figure 5A). We also carried out immunofluorescence staining followed by confocal laser scanning microscopy of ZO-1, occludin, and E-cadherin (Figure 5D). The results for occludin and E-cadherin were consistent with their gene expression levels (Figure 5F,G). Concerning ZO-1, microscopy images showed an increased signal in the cell boundaries of Caco-2 monolayers treated EcN EVs, whereas this effect was not apparent in cells incubated with EcoR12 EVs. In this case, the ZO-1 signal was similar to that of control cells (Figure 5D). The upregulation and peripheral distribution of ZO-1 by EcN EVs in Caco-2 cell monolayers was previously reported by our group [30]. However, the increased expression of occludin after 48 h of incubation with either EcN or EcoR12 EVs was been observed at 24 h [30].

Under conditions of IL-1β-induced inflammation, exposure of Caco-2 cells to this pro-inflammatory cytokine significantly affected the expression of TJ proteins. Specifically, this treatment led to a significant downregulation of *CLD1* and *ZO1* compared to untreated control cells ($p \leq 0.05$), with a trend towards reduced OCLD expression (Figure 5B). In contrast, expression of *CDH1* was not affected by IL-1β treatment. Importantly, at the gene expression level, only EcN EVs were able to counteract the negative impact of IL-1β on *ZO1* and *OCLD* mRNA levels ($p < 0.05$), yielding values that were similar to those of untreated control cells. Clearly, EcoR12 EVs did not prevent downregulation of *ZO1* in cells treated with IL-1β but tended to increase the *OCLD* expression levels, although differences did not reach statistical significance (Figure 5B). The upregulation of *ZO1* by EcN EVs was accompanied by the redistribution of the protein to the cell boundaries, as evidenced by the immunofluorescence signal (Figure 5D,E). Although the occludin protein levels were higher in the presence of either EcN or EcoR12 EVs compared to IL-1β-treated cells, differences in the subcellular distribution were apparent depending on the strain. In particular, there was a lower peripheral occludin signal in Caco-2 cells incubated with EcoR12 EVs (Figure 5D,E).

3. Discussion

IBD is a chronic, relapsing, and multifactorial inflammatory condition that involves environmental factors, alterations in local and systemic immune responses, and imbalances

in the gut microbiota composition in genetically susceptible individuals. The two main forms of IBD are CD and UC, which differ in the location and nature of inflammation. While CD can cause transmural inflammation and affect any part of the gastrointestinal tract, UC inflammation is limited to the colonic mucosa [45,46]. Several genetic variants have been associated with disease susceptibility, with most affecting barrier- and immune-related genes. This could contribute to the exacerbated immune response [47]. Regarding the factors triggering the initiation and pathogenesis of chronic IBD, accumulating evidence implicates altered host defense responses against the gut microbiota at the mucosal interface, resulting in disrupted intestinal epithelial barrier function [48].

Serotonin is an important mediator of intestinal homeostasis, and it functions under physiological and pathological conditions. Disturbances in serotonin bioavailability and signaling have been linked to the onset and severity of gut inflammatory disorders, particularly in IBD [10,18,19]. Both the gut microbiota and inflammation mediators modulate the expression of genes involved in serotonin synthesis, reuptake, and signaling. In turn, serotonin influences the integrity/permeability of the epithelial barrier, intestinal motility and secretion, inflammatory responses, and the gut microbiota balance [23]. In IBD, elevated serotonin levels and/or signaling exacerbate the inflammatory state and dysbiosis. The strong connection between the gut microbiota, barrier function, and immunity has encouraged the use of probiotics as a promising therapeutic strategy to ameliorate inflammation and restore intestinal homeostasis in IBD [49]. In this context, clinical trials have revealed the therapeutic benefits of the probiotic EcN in inducing and maintaining the remission of UC [50,51].

Under physiological conditions, the regulation of serotonin metabolism by the gut microbiota has primarily been studied in cellular models and germ-free animals [10]. The microbial factors involved in such regulation include secreted bacterial metabolites [8,52] and bacterial EVs [12,13]. However, whether these secreted microbial factors could attenuate disturbances in the serotonin system under inflammatory conditions remains a relatively unexplored issue.

Previous studies from our group proved the ability of EVs from probiotic and commensal *E. coli* strains to differentially modulate host immune and defense responses to safeguard intestinal homeostasis in several cellular and experimental models [4]. In the present study, we analyzed the ability of EV isolated from the probiotic EcN and the commensal EcoR12 to modulate the serotonin system and related genes in Caco-2 cells under conditions of health and disease affecting the epithelial barrier, including (i) a normal intestinal epithelium model and (ii) an IL-1β-induced inflammation model. We have applied this inflammation model because IL-1β is an important mediator of inflammation and tissue damage in IBD [39,53]. Elevated levels of IL-1β are correlated with disease severity. This pro-inflammatory cytokine induces barrier dysfunction by disrupting TJs [43], leading to increased intestinal permeability, which exacerbates dysregulated inflammatory responses in IBD patients. Indeed, immune blockade of IL-1β has shown therapeutic effects in experimental colitis mouse models [54].

The results from the present study showed that in the absence of IL-1β challenge, EVs from both strains elicit similar regulatory effects, principally affecting serotonin bioavailability and the expression of the antioxidant enzymes CAT and SOD. Cells exposed to EcN or EcoR12 EVs secreted higher serotonin levels than control cells. At the gene level, both types of EVs triggered upregulation of SERT mRNA and protein levels (clearance pathway), but only EcN EVs were able to activate the expression of the rate-limiting enzyme of the serotonin biosynthesis pathway TPH1. These findings suggest that under physiological conditions, EVs from these microbiota *E. coli* strains may help to fine-tune appropriate intestinal serotonin levels by regulating genes involved in the serotonin circuit. It should be noted that maintaining a proper level of free intestinal serotonin is essential for preserving gut function through interactions with specific receptor subtypes.

The observed effects on serotonin genes are consistent with those reported for the EVs of beneficial microbiota species, such as *A. muciniphila* and *F. prausnitzi,* in the Caco-2 model

of the intestinal epithelium or in healthy mice [12,13]. The ability of live suspensions of the probiotic EcN to enhance the bioavailability of serotonin in gut tissue explants through modulation of the synthesis and clearance pathways has already been described, although the nature of the effector signal was unknown [11]. Here, we show that the effects are mediated by released EVs. In addition, our results show that EcN and EcoR12 EVs can improve the intestinal barrier function by upregulating *AHR*. It is known that *E. coli* strains metabolize dietary tryptophan into indole-related compounds, which exert beneficial effects on the integrity and function of the intestinal mucosa through their interaction with the AHR nuclear receptor [55,56]. Therefore, the positive regulation of AHR expression by EVs released by intestinal *E. coli* strains provides a mechanism to reinforce the action of microbial indole metabolites in preserving intestinal homeostasis and microbiota balance.

Under inflammatory conditions, the effects elicited by the EVs differed depending on whether they were produced by the probiotic EcN or the commensal EcoR12. Concerning the regulation of the serotonin system, only EcN EVs were able to prevent the increased production of serotonin induced by IL-1β treatment. In the context of serotonin bioavailability, SERT has a key role in controlling free serotonin levels in the intestinal mucosa by promoting its reuptake by enterocytes. Continuous clearance is needed for the proper functioning of the serotonin circuit to regulate the biological effects of released serotonin. Indeed, reduced expression of SERT has been observed in the epithelium of CD and UC patients [20]. Our results also showed reduced SERT mRNA and protein levels in Caco-2 cells after IL-1β treatment. Interestingly, both EcN and EcoR12 EVs prevented SERT downregulation, resulting in mRNA and protein levels that were higher than those of untreated control cells. The fold-change increase in SERT expression (mRNA and protein) induced by EcN or EcoR12 EVs was comparable between cells treated under normal and inflammatory conditions, suggesting that the regulatory mechanism was not altered by inflammation mediators. In contrast, *TPH1* induction by EcN EVs in normal Caco-2 cells was abolished in the presence of IL-1β. This fact may explain, at least in part, the reduced levels of secreted serotonin in cells treated with EcN following the inflammation model. In addition, SERT overexpression should also correlate with reduced levels of free serotonin. The results obtained with EcN EVs matched this hypothesis. However, in cells treated with IL-1β in the presence of EcoR12 EVs, extracellular serotonin did not diminish (vs. IL-1β) despite elevated SERT levels. This discrepancy may have several explanations, such as the involvement of other regulatory mechanisms affecting SERT activity and/or membrane trafficking, as well as subcellular distribution. In intestinal epithelial cells, serotonin reuptake activity relies on the proper location of SERT in the apical membrane [15]. Moreover, diverse post-translational modifications of the serotonin transporter have been studied, with a particular focus on their influence in the brain's serotonin neurotransmitter function [57,58]. In the gut, there is evidence that SERT is post-transcriptionally regulated by miR-24 and miR-200a. Both miRNAs were found upregulated in intestinal mucosa samples from both IBD patients and experimental IBD animal models [41,42,59]. The elevated expression of these miRNAs in IBD correlates with reduced SERT mRNA and protein levels in gut tissue samples. In addition, high levels of miR-24 in UC have been associated with impaired barrier integrity due to the downregulation of the TJ protein cingulin [22]. The results from the present study show that EVs from the probiotic EcN prevented the increase in miR-24 and miR-200a levels induced by IL-1β in Caco2 cells. This regulatory effect may explain the counteracting activity of EcN EVs on SERT expression and free serotonin under inflammatory conditions. In contrast, miR-24 and miR-200a expression did not differ between cells challenged with IL-1β in the absence and presence of EVs from the commensal EcoR12. It is important to note that the regulation of SERT involves intricate molecular interactions that encompass miRNAs, transcription factors, and signaling pathways. Thus, miR-24 and miR-200a are merely a couple of contributors to this complex network. In this context, we focused our attention on studying the influence of EcN and EcoR12 EVs on the expression of TLR2, TLR4, and NOD1, immune receptors activated by microbiota molecules and known to influence intestinal serotonin bioavailability by downregulating

SERT expression and function [15,60]. In addition, overexpression of TLR2, TLR4, and their coreceptor CD14 has been found in different sections of the intestinal mucosa of UC and CD patients depending on the disease stage [61]. Our results showed that the IL-1β-driven inflammation in Caco-2 cells resulted in higher TLR4 mRNA levels, which could be significantly reduced by EcN EVs but not by EcoR12 EVs. In the inflammation model, treatment with EcN EVs also diminished NOD1 expression. Consistently, in cells treated with IL-1β, the elevated expression and secretion of pro-inflammatory mediators that are modulated by TLR downstream signaling pathways, such as IL-8, TNF-α, COX-2, and iNOS, could only be counteracted by EVs from the probiotic strain. The lack of correlation between SERT and its regulators TLR4, miR-24, and miR-200a in cells treated with EcoR12 EVs suggests the involvement of other regulatory mechanisms that have not yet been identified.

Overall, the results suggested that EVs from the probiotic EcN may preserve SERT expression under conditions of intestinal inflammation through several regulatory mechanisms, including the downregulation of the microRNAs miR-24 and miR-200a and the immune receptors TLR4 and NOD1. To our knowledge, this is the first study demonstrating the regulation of these miRNAs by probiotic-derived EVs. Considering that microbiota EVs carry a wide diversity of cargo molecules, including common MAMPs that are recognized by immune receptors, strain-specific produced molecules should mediate the differential EVs' effects.

Oxidative stress is tightly associated with inflammatory responses and, therefore, it has been implicated in the development and exacerbation of IBD [62]. In this context, intestinal inflammatory mediators, including serotonin, have been shown to inhibit the expression of antioxidant enzymes in intestinal epithelial cells [60]. It has been proposed that this prooxidant mechanism might help to exacerbate inflammation by damaging the intestinal epithelium. In our inflammation model, the ability of IL-1β to promote oxidative stress was evidenced by two regulatory findings: (i) upregulation of the inflammatory enzymes COX-2 and iNOS involved in the generation of reactive oxygen/nitrogen species, and (ii) downregulation of the antioxidant enzyme CAT. Importantly, EcN EVs performed better than EcoR12 EVs in counteracting the IL-1β-induced alterations. Whereas EcN EVs prevented changes in the expression of both prooxidant and antioxidant enzymes, EcoR12 EVs only positively affected the antioxidant enzymes.

Disruption of the intestinal epithelial barrier and increased intestinal permeability are well-recognized hallmarks of mucosal inflammation that contribute to the severity of IBD [63,64]. Moreover, in inflamed intestinal tissue, dysregulation of serotonin levels can aggravate intestinal inflammation, motility, and diarrhea [44,65]. The permeability of the epithelial barrier is controlled by epithelial TJs. Previous results from our group proved the ability of EcN EVs to strengthen the intestinal epithelial barrier and reduce gut permeability by modulating the TJ proteins ZO-1, claudin-14, and claudin-2 in Caco-2 cell monolayers [30]. Additionally, they protect the barrier's integrity against damage caused by enteropathogenic *E. coli* by counteracting the altered expression and subcellular distribution of TJ proteins [66]. The results from the present study show that EVs from the probiotic EcN can also prevent IL-1β-induced damage to the epithelial barrier, assessed using TER assays and TJ protein/mRNA expression analysis (ZO-1 and occludin). Again, the effects were strain-specific, as EVs from the commensal EcoR12 could not compensate for the reduced expression of these TJ proteins.

Current IBD therapies used to control symptoms, such as aminoacylates, corticosteroids, and immunosuppressants, have considerable side-effects. In addition, a significant proportion of patients do not respond to these drugs (non-primer responders) or are prone to losing their response after long treatments [67]. Therefore, there is a need for the discovery of novel effective therapeutic approaches. Among them, microbiome-based strategies are changing the perspective of IBD therapy. The biotic therapies, such as probiotics, prebiotics, and synbiotics, aim to restore the gut microbiota balance in favor of anti-inflammatory and mucosa-healing profiles [24,26,68,69]. The newest component of the "biotics" strategy refers to postbiotics, a term that encompasses bioactive compounds (metabolites, bacterial

project using the maximum intensity projection method. Segmentation was performed by using a pre-trained Labkit classifier [75].

To analyze the mean intensity of SERT staining, images were first filtered with a median filter (radius = 1) and then segmented using the Huang algorithm [76]. Measurements were performed on all focal planes of the original images masked with the previously obtained binary stacks.

4.10. Statistical Analysis

The data were collected from a minimum of three independent biological experiments, each conducted in triplicate. Statistical analysis and graph generation were performed using GraphPad Prism 7.0 software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Data were tested for normal distribution using the Shapiro–Wilk test. All data are presented as the mean ± standard error (SEM). Group comparisons were assessed through one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-test. A p-value of <0.05 was considered statistically significant.

5. Conclusions

This study provides new insights into the regulation of serotonin metabolism and related intestinal functions by EVs of probiotic and commensal *E. coli* strains in intestinal epithelial cells, with a focus on their potential use as a postbiotic strategy for treating IBD. Considering that intestinal serotonin levels and microbiota EVs are important mediators in the gut–brain communication axis, the results presented here point to other potential applications of microbiota EVs in treating neurological disorders associated with leaky gut. Further research and clinical trials are needed to confirm the benefits of microbiota EV-based interventions in leaky gut and serotonin-related disorders in humans.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms25105338/s1.

Author Contributions: Conceptualization, L.B. and J.B.; methodology, Y.O.-M., C.C.-A. and S.M.-R.; formal analysis, Y.O.-M., S.M.-R. and M.B.; investigation, Y.O.-M. and C.C.-A.; data curation, Y.O.-M., S.M.-R. and M.B.; writing—original draft preparation. L.B. and Y.O.-M.; writing—review and editing, J.B., S.M.-R., Y.O.-M. and C.C.-A.; supervision, L.B. and J.B.; funding acquisition, L.B. and J.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by MICIU/AEI/10.13039/501100011033, grant number PID2022-137192OB-I00. The APC was funded by the University of Barcelona.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The original contributions presented in this study are included in the article/Supplementary Materials. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

Acknowledgments: We acknowledge Ardeypharm laboratories for providing the probiotic EcN. S. Martínez-Ruiz acknowledges his FPI fellowship from the Spanish Ministry of Science and Innovation (Ref: PRE2020-093851). Y. Olivo-Martínez acknowledges the Ministry of Science, Technology and Innovation (Minciencias) of Colombia for their doctoral scholarship awarded through the International Doctorate Call N_860/2020. We acknowledge financial support from the Universitat de Barcelona for open access publication.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Jandhyala, S.M.; Talukdar, R.; Subramanyam, C.; Vuyyuru, H.; Sasikala, M.; Nageshwar Reddy, D. Role of the Normal Gut Microbiota. *World J. Gastroenterol.* **2015**, *21*, 8787–8803. [CrossRef] [PubMed]
2. Donaldson, G.P.; Lee, S.M.; Mazmanian, S.K. Gut Biogeography of the Bacterial Microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* **2016**, *14*, 20–32. [CrossRef] [PubMed]

components, secreted factors) produced by probiotics or gut-beneficial bacteria. In this context, microbiota/probiotic-derived EVs are emerging as future postbiotics as they exhibit the requirements and benefits necessary to fit within this biotherapy group [28,29,70,71]. Due to their nano-size structure and stability and the great variety of cargo molecules, microbiota-derived EVs can penetrate the mucus layer and modulate host intestinal immune and barrier responses. In addition, EVs from gut microbes can cross the epithelial barrier, enter the bloodstream, and reach distal tissues.

We previously reported that EVs from the probiotic EcN could serve as a safe postbiotic alternative to the utilization of live probiotic bacteria in ameliorating DSS-induced colitis in mice [36], as well as in improving diarrhea, clinical symptoms, and immunity against rotavirus infection in neonatal rats [72]. Results from the present study show that in intestinal epithelial cells, EVs from the probiotic strain EcN attenuate the IL-1β-induced alterations affecting serotonin metabolism, oxidative stress, and barrier integrity, thereby pointing to their potential application as a postbiotic in IBD. Importantly, they provide evidence of the molecular mechanisms underlying the vesicle-mediated reduction of free serotonin levels under inflammatory conditions through the regulation of SERT, miR-200a, and miR-24. Understanding the molecular mechanisms activated by microbiota/probiotic bioactive molecules is essential before their translation to human health as pharmabiotics or functional food ingredients.

4. Materials and Methods

4.1. Bacterial Strains and Isolation of EVs

The probiotic *E. coli* Nissle 1917 (EcN) was from Ardeypharm (GmbH, Herdecke, Germany). The *E. coli* strain EcoR12, included in the ECOR reference collection, was isolated from a fecal sample of a healthy human adult [73].

For the isolation of the EVs, bacterial strains were cultured in Luria–Bertani broth for 16 h. Subsequently, bacterial cells were pelleted through centrifugation, and the culture supernatants were used for EV extraction, as described previously [34]. In brief, the supernatants underwent filtration through a 0.22 µm pore size filter (Merck, Millipore, MA, USA) to remove residual bacterial cells. The filtrate was then concentrated using Centricon Plus-70 centrifugal filters with a 100 kDa cutoff (Merck, Millipore, MA, USA). Following an additional filtration step (0.22 µm pore size), vesicles were isolated through ultracentrifugation at 150,000× *g* for 1 h at 4 °C. The pelleted EVs were washed and resuspended in phosphate-buffered saline (PBS). Quantification of the EV samples, in terms of total protein content, was performed using the Pierce BCA method, and sterility was confirmed by plating on LB agar. Aliquots of the EVs were stored at −20 °C until use. Image analysis of EcN and EcoR12 EVs was previously assessed through Cryo-Transmission Electron Microscopy [33].

4.2. Cell Culture and Stimulation Conditions

Human colonic epithelial Caco-2 cells (ATCC HTB37) were routinely grown in Dulbecco's modified essential medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 25 mM of HEPES, 1% non-essential amino acids, and 1× penicillin–streptomycin (Corning, Fisher Scientific Inc., Barcelona, SpainProduct Number 30-002-CI). The cultures were maintained at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO_2. The cells were sub-cultured with trypsin-EDTA (Gibco-BRL, Fisher Scientific Inc., Barcelona, Spain) once a week.

The in vitro model of intestinal inflammation used in this study involved Caco-2 cell monolayers exposed to IL-1β (Recombinant Human IL-1 beta/IL-1F2 Protein; Bio-Techne R&D Systems, S.L.U., Madrid, Spain). Caco-2 cells were seeded at a density of 2×10^5 cells/mL in 12-well plates and cultured for 14 days, while replacing the culture medium every 2 days. The cell monolayers were pre-incubated with EcN EVs or EcoR12 EVs at a dose of 60 µg/mL for 3 h and subsequently treated with IL-1β (10 ng/mL). Unless otherwise indicated, the duration of IL-1β treatment was 48 h. Throughout the experiment, both the EVs and IL-1β were maintained in the culture medium. As a control, cells treated

with IL-1β in the absence of bacterial EVs were cultured in parallel. For comparison, the effect of EcN or EcoR12 EVs (60 μg/mL) was also analyzed in Caco-2 cell monolayers in the absence of IL-1β-induced inflammation after 48 h of incubation as a model that mimics the normal intestinal epithelium state. In all cases, culture supernatants and cells were collected for ELISA and quantitative RT-PCR assays, respectively.

4.3. Cell Viability Assays

To assess the cytotoxic effect of IL-1β on Caco-2 cells, cell viability was determined using the MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay. Each well of a 96-well plate was seeded with 100 μL of Caco-2 cells (1×10^5 cells/mL) and incubated for 24 h at 37 °C. Subsequently, IL-1β was added at concentrations ranging from 1 to 100 ng/mL. Following a 48 h incubation period, cells were treated with a 0.25% MTT solution (Sigma-Aldrich Chemical Co, St. Louis, MO, USA) in PBS and allowed to react for 2 h at 37 °C. The medium was then removed, and 0.1 mL of a solubilization reagent (99% dimethyl sulfoxide) was added. Cell viability was measured at 570 nm using a Variouskan LUX multimode microplate reader (Thermo Fisher Scientific Inc., Barcelona, Spain). The results were expressed as the percentage of cell survival relative to untreated control cells.

4.4. Measurement of Transepithelial Electrical Resistance (TER)

Caco-2 cells were seeded at a density of 1×10^5 cells/cm^2 in the apical compartment of 12 mm polycarbonate Transwell cell culture inserts (0.4 μm, Transwell Millipore, Merck Life Sciences, Madrid, Spain) and cultured for 14 days. The basolateral compartment was filled with 1.5 mL of culture medium. Throughout the growth and differentiation period, the medium in both compartments was replaced every 2 days. The integrity of the cell monolayer was monitored by measuring TER. Stimulations were carried out on Caco-2 cell monolayers with initial TER values exceeding 700 Ω·cm^2. Apical stimulation was performed with EcN EVs or EcoR12 EVs (60 μg/mL) for 3 h, followed by IL-1β treatment. After 48 h, the Caco-2 cell monolayers were washed in PBS, and TER was evaluated with a Millicel-ERS-2 voltmeter (Millipore, Merck Life Sciences, Madrid, Spain). The ohmic resistance of a blank (cell-free culture inset) was also measured. To obtain the sample resistance, the blank value was subtracted from the total sample resistance. The final unit area resistance (Ω cm^2) was calculated by multiplying the sample resistance (Ω) by the effective membrane area (1.12 cm^2).

4.5. RNA Extraction and Quantitative Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

Gene expression was analyzed through RT-qPCR. The total RNA was extracted using the miRNeasy mini Kit (Qiagen, Crawley, UK) according to the manufacturer's protocol. First, 1 μg of RNA was reverse-transcribed in a final volume of 20 μL using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Quantitative PCR reactions were carried out on a QuantstudioTM^3 real-time PCR system (Applied Biosystems) utilizing SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) using specific oligonucleotides for genes related to the serotonergic pathway (*SERT*, *TPH1*, *MAO*, *AHR*), inflammation (*IL6*, *IL8*, *TNFA*, *TLR2*, *TLR4*, *NOD1*), tight junctions (*CDH1*, *ZO1*, *OCLDN*, *CLDN1*), and oxidative stress (*SOD*, *CAT*, *GSR*, *GPx*, *COX2*, *iNOS*), which are listed in Table S1. The housekeeping *GAPDH* gene was used as the internal control. The reaction program included one denaturation cycle for 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C. A control reaction was carried out in the absence of RNA.

For microRNA expression analysis, reverse transcription of RNA (5 ng/μL) was performed using the miRCURY LNA RT kit (Qiagen, Iberia S.L., Barcelona, Spain), followed by quantitative PCR using the miRCURY LNA PCR Assay (Qiagen). The U6 snRNA reference gene was used for normalization. The primers used were hsa-miR-24-3p miRCURY LNA primer (Qiagen) (MiRBase accession # MIMAT0000080), hsa-miR-200-a3p miRCURY LNA primer (Qiagen) (MiRBase accession # MIMAT0000682), and the U6 snRNA control primer

set (Qiagen). The standard PCR program consisted of one denaturation cycle for 2 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 10 s at 95 °C and 1 min at 56 °C.

For both mRNA and miRNA analyses, the relative gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formula. The data were presented as the fold change relative to the experimental control (untreated cells or IL-1β-treated cells, depending on the model).

4.6. Quantification of Cytokines and Serotonin (5-HT) through ELISA

For these assays, a total of 2×10^5 Caco-2 cells were initially seeded in 12-well plates and cultured for a duration of 14 days. Following the indicated treatments, the culture supernatants were collected, centrifuged at 10,000× *g* for 20 min at 4 °C, and stored at −80 °C until analysis. The secreted levels of IL-8, IL-6, and TNF-α were quantified using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) sets (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The results were expressed as pg/mL. The serotonin concentration was assessed using the 5-HT (Serotonin/5-Hydroxytryptamine) ELISA Kit supplied by Elabscience Biotechnology Co., Ltd., Tebu-Bio S.L., Barcelona, Spain in accordance with the manufacturer's guidelines. The results were expressed in ng/mL.

4.7. Immunofluorescence Labelling

Caco-2 cells were seeded at a density of 1×10^4 cells/mL in an 8-well chamber slide (µ-Slide 8 well Glass bottom, Ibidi, Inycom, Zaragoza, Spain). Cells were grown for 7 days and then stimulated as described above. At the end of the incubation period, cells were washed with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde in PBS, permeabilized with 0.05% saponin (Sigma-Aldrich, Chemical Co., St. Louis, MO, USA), and blocked using PBS containing 1% bovine serum albumin, as previously described [31]. The TJ proteins ZO-1, E-cadherin, and occludin were stained using, respectively, anti-ZO-1 (1:100, Invitrogen, Fisher Scientific Inc., Barcelona, Spain, Catalog # 33-9100), anti-E-cadherin (1:70, BD Biosciences, Catalog # 610181), and anti-occludin (1:1000, Invitrogen, Catalog # 331588) mouse IgG monoclonal antibodies for 2 h at room temperature, followed by incubation with Alexa-Fluor-488-conjugated F(ab')2 goat anti-mouse IgG (H+L) polyclonal antibody (1:500, Invitrogen, Catalog #A-11029) for 3 h at room temperature. Nuclei were labeled with DAPI (0.125 µg/mL, Sigma Aldrich, Chemical Co., St. Louis, MO, USA) for 20 min at room temperature. Immunostaining of SERT was performed using anti-SERT Recombinant Rabbit Polyclonal Antibody (1:250, Thermo Fisher, Catalog # 711108,) for 3 h at room temperature and Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Superclonal™ Secondary Antibody, Alexa Fluor® 488 conjugate (1:500, Thermo Fisher, Catalog # A27034) for 2 h at room temperature. Immunolabelling of ZO-1 and occludin was previously established in our laboratory [31]. For SERT and E-cadherin immunostaining, antibody negative control assays were performed to rule out nonspecific binding of the secondary antibodies.

4.8. Confocal Microscopy

Cells were observed using a Zeiss LSM880 confocal microscope (Carl Zeiss Iberia S.L., Jena, Germany) equipped with a 63×/1.4 objective, an Argon laser, and a 405 nm laser diode. The 488 nm line of the Argon laser was used to collect the fluorescence of the Alexa Fluor 488, and the 405 nm diode was used to detect the DAPI emission fluorescence. Images were acquired with a voxel size of 0.13 µm × 0.13 µm × 0.37 µm (x, y, z, respectively). For each experimental condition and replicates (n = 3), 5 different fields of view with 40–100 cells each were acquired.

4.9. Image Analysis

Images were processed and analyzed using the Fiji software v1.53t [74]. The mean intensity measurement of ZO-1 staining was performed following the protocol described previously [30]. Mainly, images were filtered and processed to remove the background and to finally trace the tight junction fluorescence using the Tubeness plugin (sigma = 0.13) and

3. Okumura, R.; Takeda, K. Roles of Intestinal Epithelial Cells in the Maintenance of Gut Homeostasis. *Exp. Mol. Med.* **2017**, *49*, e338–e345. [CrossRef] [PubMed]
4. Díaz-Garrido, N.; Badia, J.; Baldomà, L. Microbiota-derived Extracellular Vesicles in Interkingdom Communication in the Gut. *J. Extracell. Vesicles* **2021**, *10*, e12161. [CrossRef]
5. Lloyd-Price, J.; Arze, C.; Ananthakrishnan, A.N.; Schirmer, M.; Avila-Pacheco, J.; Poon, T.W.; Andrews, E.; Ajami, N.J.; Bonham, K.S.; Brislawn, C.J.; et al. Multi-Omics of the Gut Microbial Ecosystem in Inflammatory Bowel Diseases. *Nature* **2019**, *569*, 655–662. [CrossRef] [PubMed]
6. Tilg, H.; Cani, P.D.; Mayer, E.A. Gut Microbiome and Liver Diseases. *Gut* **2016**, *65*, 2035–2044. [CrossRef]
7. Tilg, H.; Adolph, T.E.; Gerner, R.R.; Moschen, A.R. The Intestinal Microbiota in Colorectal Cancer. *Cancer Cell* **2018**, *33*, 954–964. [CrossRef] [PubMed]
8. Yano, J.M.; Yu, K.; Donaldson, G.P.; Shastri, G.G.; Ann, P.; Ma, L.; Nagler, C.R.; Ismagilov, R.F.; Mazmanian, S.K.; Hsiao, E.Y. Indigenous Bacteria from the Gut Microbiota Regulate Host Serotonin Biosynthesis. *Cell* **2015**, *161*, 264–276. [CrossRef] [PubMed]
9. de Vos, W.M.; Tilg, H.; Van Hul, M.; Cani, P.D. Gut Microbiome and Health: Mechanistic Insights. *Gut* **2022**, *71*, 1020–1032. [CrossRef]
10. Koopman, N.; Katsavelis, D.; Ten Hove, A.; Brul, S.; de Jonge, W.; Seppen, J. The Multifaceted Role of Serotonin in Intestinal Homeostasis. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 9487. [CrossRef] [PubMed]
11. Nzakizwanayo, J.; Dedi, C.; Standen, G.; Macfarlane, W.M.; Patel, B.A.; Jones, B.V. Escherichia Coli Nissle 1917 Enhances Bioavailability of Serotonin in Gut Tissues through Modulation of Synthesis and Clearance. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 17324. [CrossRef] [PubMed]
12. Yaghoubfar, R.; Behrouzi, A.; Zare Banadkoki, E.; Ashrafian, F.; Lari, A.; Vaziri, F.; Nojoumi, S.A.; Fateh, A.; Khatami, S.; Siadat, S.D. Effect of Akkermansia Muciniphila, Faecalibacterium Prausnitzii, and Their Extracellular Vesicles on the Serotonin System in Intestinal Epithelial Cells. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **2021**, *13*, 1546–1556. [CrossRef] [PubMed]
13. Yaghoubfar, R.; Behrouzi, A.; Ashrafian, F.; Shahryari, A.; Moradi, H.R.; Choopani, S.; Hadifar, S.; Vaziri, F.; Nojoumi, S.A.; Fateh, A.; et al. Modulation of Serotonin Signaling/Metabolism by Akkermansia Muciniphila and Its Extracellular Vesicles through the Gut-Brain Axis in Mice. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 22119. [CrossRef] [PubMed]
14. Layunta, E.; Latorre, E.; Forcén, R.; Grasa, L.; Plaza, M.A.; Arias, M.; Alcalde, A.I.; Mesonero, J.E. NOD1 Downregulates Intestinal Serotonin Transporter and Interacts with Other Pattern Recognition Receptors. *J. Cell Physiol.* **2018**, *233*, 4183–4193. [CrossRef] [PubMed]
15. Latorre, E.; Layunta, E.; Grasa, L.; Castro, M.; Pardo, J.; Gomollón, F.; Alcalde, A.I.; Mesonero, J.E. Intestinal Serotonin Transporter Inhibition by Toll-Like Receptor 2 Activation. A Feedback Modulation. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0169303. [CrossRef] [PubMed]
16. Qasem, A.; Naser, A.E.; Naser, S.A. Enteropathogenic Infections Modulate Intestinal Serotonin Transporter (SERT) Function by Activating Toll-like Receptor 2 (TLR-2) in Crohn's Disease. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 22624. [CrossRef]
17. Lamas, B.; Natividad, J.M.; Sokol, H. Aryl Hydrocarbon Receptor and Intestinal Immunity. *Mucosal Immunol.* **2018**, *11*, 1024–1038. [CrossRef] [PubMed]
18. Coates, M.D.; Tekin, I.; Vrana, K.E.; Mawe, G.M. Review Article: The Many Potential Roles of Intestinal Serotonin (5-Hydroxytryptamine, 5-HT) Signalling in Inflammatory Bowel Disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2017**, *46*, 569–580. [CrossRef] [PubMed]
19. González Delgado, S.; Garza-Veloz, I.; Trejo-Vazquez, F.; Martinez-Fierro, M.L. Interplay between Serotonin, Immune Response, and Intestinal Dysbiosis in Inflammatory Bowel Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 5632. [CrossRef] [PubMed]
20. Jørandli, J.W.; Thorsvik, S.; Skovdahl, H.K.; Kornfeld, B.; Sæterstad, S.; Gustafsson, B.I.; Sandvik, A.K.; Van Beelen Granlund, A. The Serotonin Reuptake Transporter Is Reduced in the Epithelium of Active Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2020**, *319*, 761–768. [CrossRef]
21. Datta, N.; Johnson, C.; Kao, D.; Gurnani, P.; Alexander, C.; Polytarchou, C.; Monaghan, T.M. MicroRNA-Based Therapeutics for Inflammatory Disorders of the Microbiota-Gut-Brain Axis. *Pharmacol. Res.* **2023**, *194*, 6870. [CrossRef] [PubMed]
22. Soroosh, A.; Rankin, C.R.; Polytarchou, C.; Lokhandwala, Z.A.; Patel, A.; Chang, L.; Pothoulakis, C.; Iliopoulos, D.; Padua, D.M. MiR-24 Is Elevated in Ulcerative Colitis Patients and Regulates Intestinal Epithelial Barrier Function. *Am. J. Pathol.* **2019**, *189*, 1763–1774. [CrossRef] [PubMed]
23. Kwon, Y.H.; Wang, H.; Denou, E.; Ghia, J.E.; Rossi, L.; Fontes, M.E.; Bernier, S.P.; Shajib, M.S.; Banskota, S.; Collins, S.M.; et al. Modulation of Gut Microbiota Composition by Serotonin Signaling Influences Intestinal Immune Response and Susceptibility to Colitis. *CMGH* **2019**, *7*, 709–728. [CrossRef] [PubMed]
24. Jia, K.; Tong, X.; Wang, R.; Song, X. The Clinical Effects of Probiotics for Inflammatory Bowel Disease. *Medicine* **2018**, *97*, e13792. [CrossRef] [PubMed]
25. De Filippis, F.; Esposito, A.; Ercolini, D. Outlook on Next-Generation Probiotics from the Human Gut. *Cell. Mol. Life Sci.* **2022**, *79*, 14–18. [CrossRef]
26. Ma, L.; Tu, H.; Chen, T. Postbiotics in Human Health: A Narrative Review. *Nutrients* **2023**, *15*, 291. [CrossRef] [PubMed]
27. Salminen, S.; Collado, M.C.; Endo, A.; Hill, C.; Lebeer, S.; Quigley, E.M.M.; Sanders, M.E.; Shamir, R.; Swann, J.R.; Szajewska, H.; et al. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) Consensus Statement on the Definition and Scope of Postbiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2021**, *18*, 649–667. [CrossRef] [PubMed]

28. González-Lozano, E.; García-García, J.; Gálvez, J.; Hidalgo-García, L.; Rodríguez-Nogales, A.; Rodríguez-Cabezas, M.E.; Sánchez, M. Novel Horizons in Postbiotics: Lactobacillaceae Extracellular Vesicles and Their Applications in Health and Disease. *Nutrients* **2022**, *14*, 5296. [CrossRef] [PubMed]
29. Xie, J.; Li, Q.; Nie, S. Bacterial Extracellular Vesicles: An Emerging Postbiotic. *Trends Food Sci. Technol.* **2024**, *143*, 104275. [CrossRef]
30. Alvarez, C.-S.; Badia, J.; Bosch, M.; Giménez, R.; Baldomà, L. Outer Membrane Vesicles and Soluble Factors Released by Probiotic Escherichia Coli Nissle 1917 and Commensal ECOR63 Enhance Barrier Function by Regulating Expression of Tight Junction Proteins in Intestinal Epithelial Cells. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1981. [CrossRef]
31. Olivo-Martínez, Y.; Bosch, M.; Badia, J.; Baldomà, L. Modulation of the Intestinal Barrier Integrity and Repair by Microbiota Extracellular Vesicles through the Differential Regulation of Trefoil Factor 3 in LS174T Goblet Cells. *Nutrients* **2023**, *15*, 2437. [CrossRef] [PubMed]
32. Cañas, M.A.; Fábrega, M.J.; Giménez, R.; Badia, J.; Baldomà, L. Outer Membrane Vesicles from Probiotic and Commensal Escherichia Coli Activate NOD1-Mediated Immune Responses in Intestinal Epithelial Cells. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 948. [CrossRef] [PubMed]
33. Diaz-Garrido, N.; Fábrega, M.-J.; Vera, R.; Giménez, R.; Badia, J.; Baldomà, L. Membrane Vesicles from the Probiotic Nissle 1917 and Gut Resident Escherichia Coli Strains Distinctly Modulate Human Dendritic Cells and Subsequent T Cell Responses. *J. Funct. Foods* **2019**, *61*, 103495. [CrossRef]
34. Diaz-Garrido, N.; Badia, J.; Baldomà, L. Modulation of Dendritic Cells by Microbiota Extracellular Vesicles Influences the Cytokine Profile and Exosome Cargo. *Nutrients* **2022**, *14*, 344. [CrossRef] [PubMed]
35. Díaz-Garrido, N.; Bonnin, S.; Riera, M.; Gíménez, R.; Badia, J.; Baldomà, L. Transcriptomic MicroRNA Profiling of Dendritic Cells in Response to Gut Microbiota-Secreted Vesicles. *Cells* **2020**, *9*, 1534. [CrossRef] [PubMed]
36. Fábrega, M.-J.; Rodríguez-Nogales, A.; Garrido-Mesa, J.; Algieri, F.; Badía, J.; Giménez, R.; Gálvez, J.; Baldomà, L. Intestinal Anti-Inflammatory Effects of Outer Membrane Vesicles from Escherichia Coli Nissle 1917 in DSS-Experimental Colitis in Mice. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1274. [CrossRef] [PubMed]
37. Mayorgas, A.; Dotti, I.; Salas, A. Microbial Metabolites, Postbiotics, and Intestinal Epithelial Function. *Mol. Nutr. Food Res.* **2021**, *65*, 188. [CrossRef] [PubMed]
38. Kavita; Om, H.; Chand, U.; Kushawaha, P.K. Postbiotics: An Alternative and Innovative Intervention for the Therapy of Inflammatory Bowel Disease. *Microbiol. Res.* **2024**, *279*, 127550. [CrossRef] [PubMed]
39. Dosh, R.H.; Jordan-Mahy, N.; Sammon, C.; Le Maitre, C. Interleukin 1 Is a Key Driver of Inflammatory Bowel Disease-Demonstration in a Murine IL-1Ra Knockout Model. *Oncotarget* **2019**, *10*, 3559–3575. [CrossRef] [PubMed]
40. Al-Sadi, R.; Guo, S.; Ye, D.; Dokladny, K.; Alhmoud, T.; Ereifej, L.; Said, H.M.; Ma, T.Y. Mechanism of IL-1β Modulation of Intestinal Epithelial Barrier Involves P38 Kinase and Activating Transcription Factor-2 Activation. *J. Immunol.* **2013**, *190*, 6596–6606. [CrossRef] [PubMed]
41. Liao, X.J.; Mao, W.M.; Wang, Q.; Yang, G.G.; Wu, W.J.; Shao, S.X. MicroRNA-24 Inhibits Serotonin Reuptake Transporter Expression and Aggravates Irritable Bowel Syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *469*, 288–293. [CrossRef] [PubMed]
42. Hou, Q.; Huang, Y.; Zhang, C.; Zhu, S.; Li, P.; Chen, X.; Hou, Z.; Liu, F. MicroRNA-200a Targets Cannabinoid Receptor 1 and Serotonin Transporter to Increase Visceral Hyperalgesia in Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome Rats. *J. Neurogastroenterol. Motil.* **2018**, *24*, 656–668. [CrossRef] [PubMed]
43. Kaminsky, L.W.; Al-Sadi, R.; Ma, T.Y. IL-1β and the Intestinal Epithelial Tight Junction Barrier. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 767456. [CrossRef] [PubMed]
44. Keszthelyi, D.; Troost, F.J.; Jonkers, D.M.; van Eijk, H.M.; Lindsey, P.J.; Dekker, J.; Buurman, W.A.; Masclee, A.A.M. Serotonergic Reinforcement of Intestinal Barrier Function Is Impaired in Irritable Bowel Syndrome. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2014**, *40*, 392–402. [CrossRef] [PubMed]
45. Saeid Seyedian, S.; Nokhostin, F.; Dargahi Malamir, M. A Review of the Diagnosis, Prevention, and Treatment Methods of Inflammatory Bowel Disease. *J. Med. Life* **2019**, *12*, 113–122. [CrossRef] [PubMed]
46. Kaplan, G.G.; Ng, S.C. Understanding and Preventing the Global Increase of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* **2017**, *152*, 313–321.e2. [CrossRef] [PubMed]
47. Annese, V. Genetics and Epigenetics of IBD. *Pharmacol. Res.* **2020**, *159*, 4892. [CrossRef] [PubMed]
48. Dowdell, A.S.; Colgan, S.P. Metabolic Host–Microbiota Interactions in Autophagy and the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease (Ibd). *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 708. [CrossRef] [PubMed]
49. Haneishi, Y.; Furuya, Y.; Hasegawa, M.; Picarelli, A.; Rossi, M.; Miyamoto, J. Inflammatory Bowel Diseases and Gut Microbiota. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 3817. [CrossRef] [PubMed]
50. Losurdo, G.; Iannone, A.; Contaldo, A.; Ierardi, E.; Di Leo, A.; Principi, M. Escherichia Coli Nissle 1917 in Ulcerative Colitis Treatment: Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Gastrointest. Liver Dis.* **2015**, *24*, 499–505. [CrossRef]
51. Scaldaferri, F.; Gerardi, V.; Mangiola, F.; Lopetuso, L.R.; Pizzoferrato, M.; Petito, V.; Papa, A.; Stojanovic, J.; Poscia, A.; Cammarota, G.; et al. Role and Mechanisms of Action of Escherichia Coli Nissle 1917 in the Maintenance of Remission in Ulcerative Colitis Patients: An Update. *World J. Gastroenterol.* **2016**, *22*, 5505–5511. [CrossRef] [PubMed]
52. Lavelle, A.; Sokol, H. Gut Microbiota-Derived Metabolites as Key Actors in Inflammatory Bowel Disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2020**, *17*, 223–237. [CrossRef] [PubMed]

53. Aggeletopoulou, I.; Kalafateli, M.; Tsounis, E.P.; Triantos, C. Exploring the Role of IL-1β in Inflammatory Bowel Disease Pathogenesis. *Front. Med.* **2024**, *11*, 7394. [CrossRef] [PubMed]
54. Yin, Q.; Pi, X.; Jiang, Y.; Ren, G.; Liu, Z.; Liu, H.; Wang, M.; Sun, W.; Li, S.; Gao, Z.; et al. An Immuno-Blocking Agent Targeting IL-1β and IL-17A Reduces the Lesion of DSS-Induced Ulcerative Colitis in Mice. *Inflammation* **2021**, *44*, 1724–1736. [CrossRef] [PubMed]
55. Shimada, Y.; Kinoshita, M.; Harada, K.; Mizutani, M.; Masahata, K.; Kayama, H.; Takeda, K. Commensal Bacteria-Dependent Indole Production Enhances Epithelial Barrier Function in the Colon. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e80604. [CrossRef] [PubMed]
56. Gao, J.; Xu, K.; Liu, H.; Liu, G.; Bai, M.; Peng, C.; Li, T.; Yin, Y. Impact of the Gut Microbiota on Intestinal Immunity Mediated by Tryptophan Metabolism. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2018**, *8*, 13. [CrossRef]
57. Baudry, A.; Pietri, M.; Launay, J.-M.; Kellermann, O.; Schneider, B. Multifaceted Regulations of the Serotonin Transporter: Impact on Antidepressant Response. *Front. Neurosci.* **2019**, *13*, 91. [CrossRef] [PubMed]
58. Cooper, A.; Woulfe, D.; Kilic, F. Post-Translational Modifications of Serotonin Transporter. *Pharmacol. Res.* **2019**, *140*, 7–13. [CrossRef] [PubMed]
59. Khalil, E.H.; Shaker, O.G.; Hasona, N.A. LncRNA H-19 and MiR-200a Implication and Frequency of LncRNA H-19 Rs2170425 SNP in Ulcerative Colitis and Crohn's Disease. *Comp. Clin. Path* **2023**, *32*, 565–571. [CrossRef]
60. Latorre, E.; Matheus, N.; Layunta, E.; Alcalde, A.I.; Mesonero, J.E. IL-10 Counteracts Proinflammatory Mediator Evoked Oxidative Stress in Caco-2 Cells. *Mediat. Inflamm.* **2014**, *2014*, 982639. [CrossRef] [PubMed]
61. Frolova, L.; Drastich, P.; Rossmann, P.; Klimesova, K.; Tlaskalova-Hogenova, H. Expression of Toll-like Receptor 2 (TLR2), TLR4, and CD14 in Biopsy Samples of Patients with Inflammatory Bowel Diseases: Upregulated Expression of TLR2 in Terminal Ileum of Patients with Ulcerative Colitis. *J. Histochem. Cytochem.* **2008**, *56*, 267–274. [CrossRef]
62. Tian, T.; Wang, Z.; Zhang, J. Pathomechanisms of Oxidative Stress in Inflammatory Bowel Disease and Potential Antioxidant Therapies. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, 4535194. [CrossRef] [PubMed]
63. Landy, J.; Ronde, E.; English, N.; Clark, S.K.; Hart, A.L.; Knight, S.C.; Ciclitira, P.J.; Al-Hassi, H.O. Tight Junctions in Inflammatory Bowel Diseases and Inflammatory Bowel Disease Associated Colorectal Cancer. *World J. Gastroenterol.* **2016**, *22*, 3117–3126. [CrossRef] [PubMed]
64. Nakai, D.; Miyake, M. Intestinal Membrane Function in Inflammatory Bowel Disease. *Pharmaceutics* **2023**, *16*, 29. [CrossRef] [PubMed]
65. Mishima, Y.; Ishihara, S. Enteric Microbiota-Mediated Serotonergic Signaling in Pathogenesis of Irritable Bowel Syndrome. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 235. [CrossRef] [PubMed]
66. Alvarez, C.S.; Giménez, R.; Cañas, M.A.; Vera, R.; Díaz-Garrido, N.; Badia, J.; Baldomà, L. Extracellular Vesicles and Soluble Factors Secreted by Escherichia Coli Nissle 1917 and ECOR63 Protect against Enteropathogenic E. Coli-Induced Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction. *BMC Microbiol.* **2019**, *19*, 166. [CrossRef]
67. Kotla, N.G.; Rochev, Y. IBD Disease-Modifying Therapies: Insights from Emerging Therapeutics. *Trends Mol. Med.* **2023**, *29*, 241–253. [CrossRef] [PubMed]
68. Martyniak, A.; Medyńska-Przęczek, A.; Wędrychowicz, A.; Skoczeń, S.; Tomasik, P.J. Prebiotics, Probiotics, Synbiotics, Paraprobiotics and Postbiotic Compounds in IBD. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1903. [CrossRef] [PubMed]
69. Pesce, M.; Seguella, L.; Del Re, A.; Lu, J.; Palenca, I.; Corpetti, C.; Rurgo, S.; Sanseverino, W.; Sarnelli, G.; Esposito, G. Next-Generation Probiotics for Inflammatory Bowel Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 5466. [CrossRef] [PubMed]
70. Yang, J.; Shin, T.-S.; Kim, J.S.; Jee, Y.-K.; Kim, Y.-K. A New Horizon of Precision Medicine: Combination of the Microbiome and Extracellular Vesicles. *Exp. Mol. Med.* **2022**, *54*, 466–482. [CrossRef] [PubMed]
71. Krzyżek, P.; Marinacci, B.; Vitale, I.; Grande, R. Extracellular Vesicles of Probiotics: Shedding Light on the Biological Activity and Future Applications. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 522. [CrossRef] [PubMed]
72. Martínez-Ruiz, S.; Olivo-Martínez, Y.; Cordero, C.; Rodríguez-Lagunas, M.J.; Pérez-Cano, F.J.; Badia, J.; Baldoma, L. Microbiota-Derived Extracellular Vesicles as a Postbiotic Strategy to Alleviate Diarrhea and Enhance Immunity in Rotavirus-Infected Neonatal Rats. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 1184. [CrossRef] [PubMed]
73. Ochman, H.; Selander, R.K. Standard Reference Strains of Escherichia Coli from Natural Populations. *J. Bacteriol.* **1984**, *157*, 690–693. [CrossRef] [PubMed]
74. Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; et al. Fiji: An Open-Source Platform for Biological-Image Analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 676–682. [CrossRef] [PubMed]
75. Arzt, M.; Deschamps, J.; Schmied, C.; Pietzsch, T.; Schmidt, D.; Tomancak, P.; Haase, R.; Jug, F. LABKIT: Labeling and Segmentation Toolkit for Big Image Data. *Front. Comput. Sci.* **2022**, *4*, 777728. [CrossRef]
76. Huang, L.-K.; Wang, M.-J.J. Image Thresholding by Minimizing the Measures of Fuzziness. *Pattern Recognit.* **1995**, *28*, 41–51. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



5. CAPITULO 3

Extracellular vesicles of the probiotic Escherichia coli Nissle 1917 reduce PepT1 levels in IL-1β-treated Caco-2 cells via upregulation of miR-193a-3p

Extracellular vesicles of the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 reduce PepT1 levels in IL-1β-treated Caco-2 cells via upregulation of miR-193a-3p

Yenifer Olivo-Martínez [1,2,3,4], Sergio Martínez-Ruiz [1,3,4], Cecilia Cordero [1,3,4], Josefa Badia [1,3,4,*,†], and Laura Baldoma [1,3,4,*,†]

[1] Departament de Bioquímica i Fisiologia, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain
[2] Biochemistry and Diseases Research Group, Facultad de Medicina, Universidad de Cartagena, Cartagena 130015, Colombia
[3] Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), 08028 Barcelona, Spain
[4] Institut de Recerca Sant Joan de Déu (IRSJD), 08950 Barcelona, Spain

Nutrients (Under Review)

- ISSN 2072-6643
- **Journal Rank:** JCR - Q1 (*Nutrition & Dietetics*) / CiteScore - Q1 (*Nutrition and Dietetics*)
- **Impact Factor:** 5.9 (2022); 5-Year Impact Factor: 6.6 (2022)

RESUMEN

Introducción

PepT1 es un miembro de la familia de transportadores de oligopéptidos acoplados a protones que desempeña un papel relevante en el mantenimiento de la homeostasis intestinal. En el intestino, PepT1 se expresa principalmente en los enterocitos del intestino delgado, donde media la absorción de dipéptidos y tripéptidos derivados de las proteínas dietéticas. Sin embargo, la expresión de PepT1 es mínima en el epitelio colónico para evitar respuestas exacerbadas contra péptidos proinflamatorios derivados de la microbiota intestinal. Es importante destacar que la regulación positiva de PepT1 en el colon se ha asociado con EII y cáncer asociado a colitis. A pesar de la intensa investigación en modelos animales de enfermedades humanas que demuestran los beneficios de las vesículas extracelulares (EVs) de comensales intestinales beneficiosos en la mejora de la EII, el uso de las EVs probióticas en la salud humana como estrategia postbiótica requiere un conocimiento profundo de los mecanismos de acción.

Objetivo y Metodología

Investigamos el potencial de las EVs de EcN y del comensal EcoR12 para prevenir la expresión alterada de PepT1 en condiciones inflamatorias, utilizando un modelo de inflamación inducida por IL-1β en células Caco-2. Se evaluaron los efectos analizando la expresión de PepT1 (mRNA y proteína), miR-193a-3p y miR-92b, que regulan respectivamente la traducción y degradación del mRNA de PepT1. La influencia de las EVs de la microbiota sobre la expresión de PepT1 también se analizó en presencia de péptidos bacterianos que son sustratos naturales de PepT1 colónico para dilucidar cómo funcionan los mecanismos regulatorios en condiciones tanto fisiológicas como patológicas.

Conclusiones

El principal hallazgo fue que las EVs de EcN disminuyeron significativamente la proteína PepT1 mediante la regulación positiva de miR-193a-3p. Es importante destacar que este efecto regulador fue específico de la cepa y solo se activó en células expuestas a IL-1β, lo que sugiere que las EVs de EcN no controlaron la expresión de PepT1 en condiciones

basales, pero pueden desempeñar un papel fundamental en respuesta a la inflamación como factor estresante. Mediante este mecanismo, las EVs de EcN pueden reducir la inflamación en respuesta a la microbiota en trastornos intestinales crónicos al limitar la absorción de péptidos proinflamatorios bacterianos.

nutrients

MDPI

Article

Extracellular vesicles of the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 reduce PepT1 levels in IL-1β-treated Caco-2 cells via up-regulation of miR-193a-3p

Yenifer Olivo-Martínez[1,2,3,4], Sergio Martinez[1,3,4], Cecilia Cordero-Alday[1,3,4], Josefa Badia[1,3,4*], Laura Baldoma[1,3,4*]

1 Departament de Bioquímica i Fisiologia, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain.
2 Biochemistry and Diseases Research Group, Facultad de Medicina, Universidad de Cartagena, Cartagena 130015, Colombia
3 Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), 08028 Barcelona, Spain.
4 Institut de Recerca Sant Joan de Déu (IRSJD), 08950 Barcelona, Spain.
* Correspondence: lbaldoma@ub.edu; josefabadia@ub.edu.

Abstract: PepT1 is a member of the proton-coupled oligopeptide transporter family that plays a relevant role in the maintenance of intestinal homeostasis. In the gut, PepT1 is primarily expressed in the enterocytes of the small intestine, where it mediates the absorption of di/tri-peptides derived from dietary proteins. Yet, PepT1 expression is negligible in the colonic epithelium to avoid exacerbated responses against proinflammatory peptides derived from the gut microbiota. Importantly, upregulation of colonic PepT1 has been associated with chronic inflammatory diseases and colitis-associated cancer. Despite intense research in animal models of human diseases demonstrating the benefits of extracellular vesicles (EVs) from beneficial gut commensals in ameliorating IBD, translating of probiotic EVs to human health as a postbiotic strategy requires a deep knowledge of the mechanisms of action. Here, we investigate the potential of EVs of the probiotic Nissle 1917 (EcN) and the commensal EcoR12 in preventing altered PepT1 expression under inflammatory conditions, using an interleukin (IL)-1- induced inflammation model in Caco-2 cells. The effects were evaluated by analyzing the expression of PepT1 (mRNA and protein) and miR-193a-3p and miR-92b, which respectively regulate PepT1 mRNA translation and degradation. The influence of microbiota EVs on PepT1 expression was also analyzed in the presence of bacterial peptides that are natural substrates of colonic PepT1 to elucidate how the regulatory mechanisms function under both physiological and pathological conditions. The main finding was that EcN EVs significantly decreased PepT1 protein via upregulation of miR-193a-3p. Importantly, this regulatory effect was strain-specific and only activated in cells exposed to IL-1β, suggesting that EcN EVs did not control PepT1 expression under basal conditions but can play a pivotal role in response to inflammation as a stressor. By this mechanism, EcN EVs may reduce inflammation in response to microbiota in chronic intestinal disorders by limiting the uptake of bacterial proinflammatory peptides.

Keywords: gut microbiota, postbiotics, extracellular vesicles, inflammatory bowel disease, PepT1, miR-92b, miR-193a-3p.

Citation: To be added by editorial staff during production.

Academic Editor: Firstname Last-name

Received: date
Revised: date
Accepted: date
Published: date

Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD) is a group of multifactorial and chronic inflammatory disorders that affect the gastrointestinal tract of genetically susceptible individuals. The two main forms of IBD are Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) [1,2]. Intestinal dysbiosis and altered immune responses to the gut microbiota are common traits in both IBD subtypes. The loss of immunological tolerance towards commensal bacteria in the intestine leads to a continuous activation of the intestinal immune system with

the subsequent release of proinflammatory cytokines that promote tissue damage, thus exacerbating the inflammatory response.

Intestinal inflammation is a complex process that depends on multiple factors, including the dysregulation of specific transporters. Under physiological conditions, epithelial cells of the small intestine highly express the proton-coupled oligopeptide transporter PepT1 that mediates the transport and absorption of dietary di/tripeptides. However, the expression of this transporter is minimal or practically undetectable in the colon [3,4]. Importantly, chronic inflammation leads to a significant increase in colonic PepT1 expression. Upregulation of PepT1 in colonic samples of IBD patients point to its role in the disease pathogenesis [1,5,6].

Regulation of colonic PepT1 expression occurs mainly at the transcriptional level in response to bacterial metabolites and derived peptides. In the colon, PepT1 mediates the uptake of bacterial peptides, including the proinflammatory peptide N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP), and peptidoglycan degradation products such as muramyl dipeptide (MDP) and L-Ala-γ-D-Glu-meso-diaminopimelic acid (Tri-DAP) [7]. The transport activity of PepT1 is closely related to the activation of intracellular immune receptors, in particular nucleotide-binding site–leucine-rich repeat (NOD) receptors, which recognize bacterial peptidoglycan fragments. NOD1 detects peptides containing meso-diaminopimelic acid (DAP) present in peptidoglycan of Gram-negative bacteria, while NOD2 senses MDP, which is common to all groups of bacteria. Interaction of NOD with the specific ligand initiates the signaling cascade that activates the NF-kB and mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways, leading to the subsequent expression of inflammatory genes. Therefore, the transport function of PepT1 plays a crucial role in determining the intracellular levels of NOD ligands and the consequent activation of inflammatory pathways [8–11]. In addition to peptide substrates, the expression of PepT1 is upregulated by proinflammatory cytokines IL-1β, IFN-γ, and TNF-α [5], as well as oxidative stress through the activation of the transcription factor nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) [3]. Additionally, bacterial pathogens such as enteropathogenic *Escherichia coli* and *Citrobacter rodentium* can also upregulate PepT1 expression [5].

Dysregulation of PepT1 expression has important implications in intestinal inflammation. Under pathophysiological conditions, bacteria present in the colon can generate significant amounts of MDP and Tri-DAP, which activate the expression of PepT1. The increased uptake of these peptidoglycan fragments triggers an inflammatory response in the intestinal epithelium through NOD downstream pathways [5]. In addition, uptake of fMLP by colonic epithelial activates the expression of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules, making these cells more sensitive to bacterial peptides and prone to triggering an inflammatory response [2]. Indeed, treatment of Caco-2 cells with fMLP resulted in the activation of the proinflammatory transcription factors NF-κB and activator protein-1 (AP-1) [12].

At the posttranscriptional level, PepT1 expression is regulated by miRNAs in intestinal epithelial cells. miR-92b inhibits PepT1 expression by binding to the 3′-unstranslated region of PepT1 mRNA and promoting its degradation. This finding pointed to miR-92b as a suppressor of proinflammatory responses induced by bacterial peptides in intestinal epithelial cells [7]. Moreover, an inverse correlation between PepT1 and miR-193a-3p levels has been reported in inflamed colon tissues with active UC. This miRNA inhibits PepT1 mRNA translation without affecting the mRNA levels. Consequently, miR-193a-3p reduced PepT1 protein levels and activity, thus suppressing the subsequent activation of inflammatory transcription factors [13]. Both miRNAs, miR92b and miR-193a-3p, are regulators of colonic PepT1 and contribute to maintaining intestinal homeostasis.

The relevant role of PepT1 overexpression on the inflammatory response against gut microbiota peptides opens new avenues for understanding and developing novel treatment strategies for IBD. Among microbiome-based strategies, manipulating the composition and function of the gut microbiota through probiotic interventions stands out. Currently, *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) is one of the few probiotics authorized for the

treatment of gastrointestinal diseases, including UC. In addition, EcN is one of the best studied probiotic strains due to its immunomodulatory and anti-inflammatory properties [14–16]. Despite the benefits and safety of probiotics, consuming viable bacteria may cause adverse events, particularly in patients with underlying medical conditions and weakened immune systems. In these patients, probiotic treatment could aggravate inflammatory responses and convert the probiotic bacteria into harmful microbes. In this scenario, the newest microbiome-based therapies targeting the gut involve the use of postbiotics [17]. According to the definition provided by International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP), postbiotics are non-viable bacterial components and products produced by beneficial microbes that confer a health benefit on the host. This group includes bacterial cell fragments, biomolecules, and secreted bioactive compounds [18]. In this field, extracellular vesicles (EVs) released by probiotic and microbiota strains are emerging as potential new postbiotics [19–21].

Previous studies of our group have provided evidence on the role of microbiota EVs as key players in the interkingdom communication in the gut, acting as mediators of the microbiota functions on the host [22]. The EVs from the probiotic EcN and commensal *E. coli* strains modulate epithelial barrier function [23] and activate regulatory mechanisms to preserve balanced anti- and pro-inflammatory responses in a strain-specific manner [24]. Internalized EVs induce an innate immune response in intestinal epithelial cells by activating NOD1 signaling cascades. Constant stimulation of NOD1 by microbiota EVs results in controlled inflammatory responses that are essential for immune training and intestinal homeostasis [25]. In experimental models of IBD and rotavirus-induced diarrhea, oral administration of EVs from the probiotic EcN ameliorate disease progression by counteracting the altered expression of inflammatory mediators and proteins involved in the epithelial barrier integrity and repair [26,27]. Moreover, in *in vitro* models of intestinal epithelial cells (goblet cells and enterocytes), EcN EVs modulate the expression of miRNAs dysregulated in IBD, in particular those that control the trefoil factor 3 (TFF3) and serotonergic genes [28,29]

This study aims to evaluate whether EVs isolated from the probiotic EcN and the commensal EcoR12 could prevent altered PepT1 expression under inflammatory conditions through the regulation of miR92b and miR-193a-3p. We used the interleukin (IL)-1β induced inflammation model in Caco-2 cells. The effects of bacterial EVs were evaluated by analyzing the relative levels of PepT1 mRNA and the two regulatory miRNAs by RT-qPCR, and the PepT1 protein levels by ELISA and immunofluorescence confocal microscopy. The Influence of microbiota EVs on PepT1 expression was also analyzed under conditions of normal induction by the natural transporter substrate Tri-DAP to elucidate the regulatory mechanisms functioning under both physiological and pathological conditions.

2. Materials and Methods

2.1 Bacterial Strains and Isolation of EVs

The probiotic *E. coli* Nissle 1917 (EcN) was from Ardeypharm (GmbH, Herdecke, Germany). The commensal *E. coli* strain EcoR12, included in the ECOR reference collection, was isolated from a fecal sample of a healthy human adult [30].

For the isolation of the EVs, bacterial strains were cultured in Luria–Bertani broth for 16 h. Subsequently, bacterial cells were pelleted by centrifugation and the culture supernatants were used for EV extraction as described previously [28]. In brief, the supernatants underwent filtration through a 0.22 µm pore size filter (Merck, Millipore, MA, USA) to remove residual bacterial cells. The filtrate was then concentrated using Centricon Plus-70 centrifugal filters 100 kDa cutoff (Merck, Millipore, MA, USA). Following an additional filtration step (0.22 µm pore size), EVs were isolated by ultracentrifugation at 150,000× g for 1 h at 4 °C. The pelleted EVs were washed and resuspended in phosphate-buffered saline (PBS). Quantification of the EV samples, in terms of total protein content, was

performed using the Pierce BCA method, and sterility was confirmed by plating on LB agar. The integrity and structure of the EVs from EcN and EcoR12 isolated following this protocol was already confirmed by Cryo-Transmission Electron Microscopy [31]. Aliquots of the EVs were stored at −20 °C until use.

2.2 Cell Culture and Stimulation Conditions

Human colonic epithelial Caco-2 cells (ATCC HTB37) were routinely grown in Dulbecco's modified essential medium (DMEM), supplemented with 10% fetal bovine serum, 25 mM HEPES, 1% non-essential amino acids, and 1× penicillin-streptomycin (Corning, Fisher Scientific Inc., Barcelona, Spain, Catalogue # 30-002-CI). The cultures were maintained at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO_2. The cells were sub-cultured with trypsin-EDTA (Gibco-BRL, Fisher Scientific Inc., Barcelona, Spain) once a week.

To analyze the regulation of PepT1 expression by microbiota EVs, two stimulation conditions were set up in Caco-2 cells: (i) Polarized cell monolayers treated with IL-1β as a model of intestinal inflammation. (ii) Polarized cell monolayers exposed to Tri-DAP (L-Ala-γ-D-Glu-meso-diamino-pimelic acid) as a model of PepT1 regulation by substrate bacterial peptides.

The *in vitro* model of intestinal inflammation used in this study was carried out as previously described [28]. Briefly, Caco-2 cells were seeded at a density of 2×10^5 cells/mL in 12-well plates and cultured for 14 days, replacing the culture medium on alternate days. The polarized cell monolayers were pre-incubated with EcN EVs or EcoR12 EVs at a dose of 60 μg/mL for 3 h, and subsequently treated with IL-1β (10 ng/mL) for 48 h. In the Tri-DAP model, the experimental set up was the same, except that after incubation with EcN EVs or EcoR12 EVs (60 μg/mL, 3 h), the cell monolayers were treated with Tri-DAP at 5 μg/mL (InvivoGen, Ibian Technologies, Zaragoza, Spain) for 8 h. Throughout the experiments, the EVs, Tri-DAP and IL-1β were maintained in the culture medium. In both models, non-treated polarized cell monolayers incubated in the absence or presence of EVs were processed in parallel as a control. Culture supernatants and cells were collected for ELISA and quantitative RT-PCR assays, respectively.

2.3 Cell viability assays

To assess the cytotoxic effect of Tri-DAP on Caco-2 cells, cell viability was estimated by the MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay. Each well of a 96-well plate was seeded with 100 μl of Caco-2 cells (1×10^5 cells/mL) and incubated for 24 hours at 37 °C. Subsequently, Tri-DAP was added at concentrations of 1, 5, and 10 μg/mL. Following 24 h incubation, cells were treated with a 0.25% MTT solution (Sigma-Aldrich Chemical Co, St. Louis, MO, USA) in PBS and allowed to react for 2 hours at 37 °C. The medium was then removed, and 0.1 ml of a solubilization reagent (99% dimethyl sulfoxide) was added. Cell viability was measured at 570 nm using a Variouskan LUX multimode microplate reader (Thermo Fisher Scientific Inc., Barcelona, Spain). The results were expressed as the percentage of cell survival relative to untreated control cells.

2.4 RNA Extraction and Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

Gene expression was analyzed by RT-qPCR. The total RNA was extracted using the miRNeasy mini-Kit (Qiagen, Crawley, UK) according to the manufacturer's protocol. First, 1 μg of RNA was reverse-transcribed in a final volume of 20 μL using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Quantitative PCR reactions were carried out on a QuantstudioTM3 real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) utilizing SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The primers for hPepT1 were sense 5′-CGTG-CACGTAGCACTGTCCAT-3′, and antisense 5′-GGCTTGATTCCTCCTGTACCA-3. The primers used to analyze the proinflammatory cytokines IL-8 and TNF-α were already published [29]. The housekeeping GAPDH gene was used as the internal control (primers

sense 5′-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3′ and antisense 5′- GACAA-GCTTCCCGTTCTCAG-3′). The reaction program included one denaturation cycle for 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C. A control reaction was carried out in the absence of RNA. The relative gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formula. The data were presented as the fold change relative to the experimental control (untreated cells, or IL-1β or Tri-DAP treated cells, depending on the model).

2.5 Quantification of mature miRNA expression

For microRNA expression analysis, reverse transcription of RNA (5 ng/μL) was performed using the miRCURY LNA RT kit (Qiagen, Crawley, UK), followed by quantitative PCR using the miRCURY LNA PCR Assay (Qiagen). The U6 snRNA reference gene was used for normalization.

The primers used were hsa-miR-193-a3p miRCURY LNA primer (Qiagen, Crawley, UK) (MiRBase accession # MIMAT0000459), hsa-miR-92b-3p miRCURY LNA primer (Qiagen, Crawley, UK) (MiRBase accession # MIMAT0003218) and the U6 snRNA control primer set (Qiagen, Crawley, UK). The standard PCR program consisted of one denaturation cycle for 2 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 10 s at 95 °C and 1 min at 56 °C. The relative gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formula. The data were presented as the fold change relative to the experimental control (untreated cells, or IL-1β or Tri-DAP treated cells, depending on the model).

2.6 Quantification of cytokines by ELISA

Total of 2×10^5 Caco-2 cells were initially seeded in 12-well plates and cultured for 14 days to get a polarized cell monolayer. Following the indicated treatments, the culture supernatants were collected, centrifuged at 10,000 × g for 20 min at 4°C and stored at -80°C until analysis. The secreted levels of IL-8 and TNF-α were quantified using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) sets (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The results were expressed as pg/ml.

2.7 Quantification of PepT1 by ELISA

Caco-2 cells were grown for 14 days as indicated in the previous section. Following the indicated treatments, adherent cells were rinsed in cold PBS, detached with trypsin and collected by centrifugation at 1,000 × g for 5 minutes. The cells were resuspended in fresh lysis buffer (Cloud-Clone Corp, TX, USA, Catalogue # CC-IS007-1) at a final concentration of 10^7 cells/mL and incubated until the solution was clarified. The cell lysate was then centrifuged at 1500 x g for 10 minutes at 2-8 °C and stored at −20 °C until use. PepT1 levels were quantified by the enzyme-linked immunosorbent assay Kit for Hydrogen Ion/Peptide Transporter 1(HPEPT1) (Cloud-Clone Corp, TX, USA, Catalogue # SEE429Hu), according to the manufacturer's instructions. The results were expressed as ng/mL.

2.8 Immunofluorescence, Confocal Microscopy, and Image Analysis

Caco-2 cells were seeded at a cell density of 1×10^4 cells/mL in an 8-well chamber slide (μ-Slide 8 well Glass bottom, Ibidi, Inycom, Zaragoza, Spain). After 7 days of culture, cells were stimulated as described above. At the end of the incubation period, cells were rinsed in PBS, fixed with 4% paraformaldehyde in PBS, permeabilized with 0.05% saponin (Sigma-Aldrich, Chemical Co., St. Louis, MO, USA) and blocked using PBS containing 1% bovine serum albumin as previously described [28]. Immunostaining of hPepT1 was performed using anti-hPepT1 Recombinant Rabbit Polyclonal Antibody (1:500, Catalogue # BS-10588R, Fisher Scientific, Inc., Barcelona, Spain) for 4 h at room temperature and Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Superclonal™ Secondary Antibody, Alexa Fluor® 488 conjugate (1:200, Catalogue # A27034, Fisher Scientific Inc., Barcelona, Spain) for 2 h at room temperature. Nuclei were labeled with DAPI (0.125 μg/mL, Sigma Aldrich, Chemical Co., St. Louis, MO, USA) for 20 min at room temperature.

Confocal microscopy was performed using a Zeiss LSM880 confocal microscope (Carl Zeiss Iberia S.L., Jena, Germany) equipped with a 63×/1.4 objective, an Argon laser, and a 405 nm laser diode on the Advanced Optical Microscopy Unit from the Scientific and Technological Centers (CCiT-UB), University of Barcelona. The 488 nm line of the Argon laser was used to collect the fluorescence of the Alexa Fluor 488 and the 405 nm diode was used to detect the DAPI emission fluorescence. Images were acquired with a voxel size of 0.13 µm × 0.13 µm × 0.37 µm (x, y, z, respectively). For each experimental condition and replicate (n = 3), 5 different fields of view with 50–100 cells each were acquired. Images were processed and analyzed using the Fiji software v1.53t [32]. To analyze the mean intensity of PepT1 staining, images were first filtered with a median filter (radius = 1) and then segmented using the Huang algorithm [33]. Measurements were performed on all focal planes of the original images masked with the previously obtained binary stacks.

2.9 *Statistical Analysis*

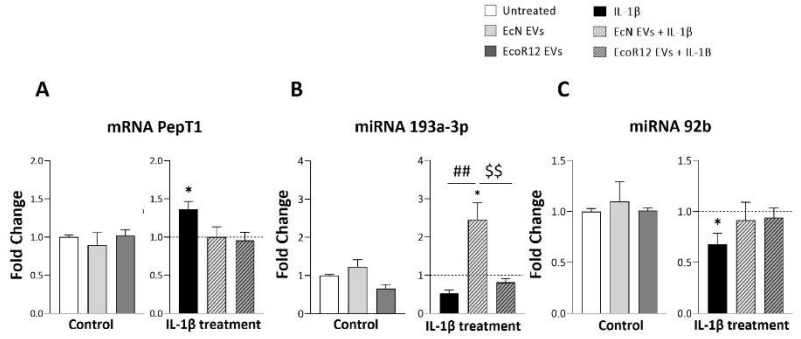
The data were collected from a minimum of three independent biological experiments, each conducted in triplicate. Statistical analysis and graph generation were performed using GraphPad Prism 7.0 software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Data were tested for normal distribution using the Shapiro-Wilk test. Group comparisons were assessed through one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-test. A p-value of < 0.05 was considered statistically significant. All data are presented as the mean ± standard error (SEM).

3. Results

3.1 *Modulation of PepT1 by EcN or EcoR12 EVs Under Conditions of IL-1β-Induced Inflammation*

Overexpression of PepT1 in the colonic epithelium of patients with IBD provides an entry route for bacteria-derived peptides such as MDP, fMLP, and Tri-DAP, which activate NOD signaling cascades and contribute to chronic inflammation [9]. Here, we investigated the ability of EVs from the probiotic EcN or the commensal EcoR12 to modulate PepT1 expression in the IL-1β inflammation model. For this assay, polarized Caco-2 cells were pre-treated with EVs (60 µg/mL) for 3 h, followed by exposure to IL-1β (10 ng/mL) for additional 48 hours. In parallel, modulation of PepT1 expression by EcN or EcoR12 EVs was analyzed in Caco-2 cell monolayers in the absence of IL-β treatment as a control of physiological conditions.

In the absence of inflammatory signals (conditions that mimic the intact intestinal epithelium), the PepT1 mRNA expression levels were not altered by treatment with EcN EVs or EcoR12 EVs compared to untreated control cells (Figure 1A).



CAPITULO 3

Figure 1. Modulation of PepT1 expression and its regulatory miRNAs miR-193a-3p and miR-92b by EcN or EcoR12 EVs in the *in vitro* IL-1β-Inflammation model. In panels labelled as IL-1β treatment, Caco-2 cells were incubated with EVs (60 μg/mL) from EcN or EcoR12 for 3 h and then challenged with IL-1β (10 ng/mL) for 48 h. In panels labeled as control, Caco-2 cells were challenged with EVs (60 μg/mL) from EcN or EcoR12 and incubated for 48 h. (A) Relative mRNA levels of PepT1 were measured by RT-qPCR using GAPDH as the reference gene. (B, C) Relative expression levels of the indicated miRNAs were measured by RT-qPCR and normalized to the U6 reference gene. In all panels, data are expressed as mean ± SEM from three independent experiments. Differences were evaluated with one-way ANOVA, followed by post hoc Tukey's. * $p \leq 0.05$ vs. untreated control cells (white bars or dashed lines); ## $p \leq 0.01$ vs. IL-1β treated cells, and $$ $p \leq 0.01$ between cells stimulated with EcN or EcoR12 EVs.

In the intestinal inflammation model, exposure to IL-1β significantly upregulated PepT1 expression in Caco-2 cells ($p \leq 0,05$). Incubation with EcN or EcoR12 EVs prevented the IL-1β-mediated upregulation of PepT1, resulting in mRNA levels similar to those of untreated control cells (Figure 1A)

The expression of PepT1 was also analyzed at the protein level by ELISA and immunofluorescence confocal microscopy in Caco-2 cell monolayers under both established experimental conditions (Figure 2). In the model that mimics the intact intestinal epithelium, values of PepT1 protein were consistent with the mRNA expression levels assessed by RT-qPCR (presented in Figure 1). Regardless of the methodology used for quantification, no significant differences in the PepT1 protein levels were detected between untreated or EV-treated cells (Figure 2, control panels). However, no correlation between PepT1 mRNA and protein levels were observed in the IL-1β inflammation model, especially in cells treated with EcN EVs. As expected, IL-1β-treated cells exhibited higher PepT1 levels than untreated control cells ($p \leq 0,01$). Remarkably, this increase in PepT1 protein was significantly counteracted by EcN EVs ($p \leq 0,01$). EcoR12 EVs displayed a minor compensatory effect. Indeed, both PepT1 quantification methods yielded significant differences between cells treated with EVs from the probiotic or the commensal strain (Figure 2A-B).

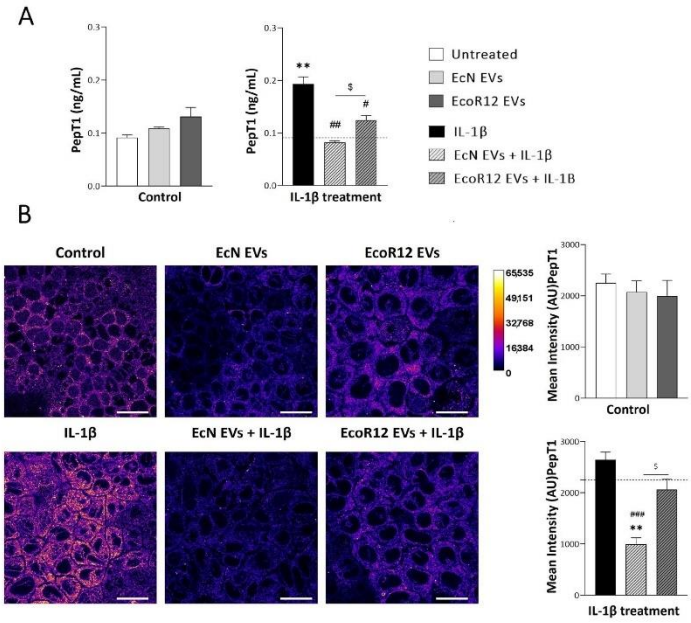


Figure 2. Quantification of PepT1 protein levels in Caco-2 cells following the IL-1β-Inflammation model. IL-1β treatment conditions: Caco-2 cells were incubated with EVs (60 μg/mL) from EcN or EcoR12 for 3 h and then challenged with IL-1β (10 ng/mL) for 48 h. Control conditions: Caco-2 cells were challenged with EVs (60 μg/mL) from EcN or EcoR12 and incubated for 48 h. (A) PepT1 protein was quantified by ELISA in cell lysates. Data are expressed as mean ± SEM from 3 independent experiments. (B) Quantification of PepT1 by immunofluorescence confocal microscopy. Representative confocal maximal projection images of cells treated as indicated are shown in Fire LUT after image processing. Quantification of the PepT1 mean intensity is shown for each model (control or IL-1β treatment) together with the calibration bar of Fire LUT intensity on the right. Scale bar: 20 μm. Data are presented as mean ± SEM of arbitrary intensity units (AU) (n = 3 independent biological replicates). Statistical differences were assessed with one-way ANOVA, followed by post hoc Tukey's. ** $p \leq 0.01$ vs control cells (dashed line); # $p \leq 0.05$, ## $p \leq 0.01$, ### $p \leq 0.001$ vs IL-1β treated cells, $ $p \leq 0.05$ between cells stimulated with EcN or EcoR12 EVs.

3.2 *Regulation of miRNAs that Target PepT1 mRNA by EcN and EcoR12 EVs Under Conditions of IL-1β-Induced Inflammation.*

The lack of correlation between PepT1 mRNA and protein levels in cells challenged with IL-1β in the presence of probiotic/microbiota EVs led us to analyze the expression of miRNAs known to postranscriptiotnaly regulate PepT1 by different mechanisms. In particular, miR-193a-3p that inhibits PepT1 mRNA translation without altering the mRNA levels [13] and miR-92b that promotes PepT1 mRNA degradation [34].

Under conditions of intact intestinal epithelium, the expression of both miRNAs did not significantly differ between untreated and EV-treated cells (Figure 1B,C; control panels). In the inflammation model, the exposure of Caco-2 cells to IL-1β resulted in the downregulation of miR-193a-3p (near significance, $p = 0.056$) and miR-92b ($p \leq 0.05$) (Figure 1B,C). These results were consistent with the higher PepT1 mRNA and protein levels quantified in IL-1β-treated cells. Under these inflammatory conditions, the results showed differential regulation by EcN and EcoR12 EVs. The incubation with EcN EVs led to a nearly 3-fold increase in the expression of miR-193a-3p compared to both untreated control cells ($p \leq 0.05$) and cells treated with IL-1β in the absence of EVs ($p \leq 0.01$) (Figure 1B). In contrast, incubation with EcoR12 EVs resulted in miR-193a-3p expression levels similar to those of untreated control cells. The overexpression of miR-193a-3p by EVs from the probiotic EcN under inflammatory conditions may account for the reduced PepT1 protein levels detected in this model. Concerning miR-92b, the results showed that EVs from both EcN and EcoR12 strains were able to prevent the IL-1β-mediated downregulation of miR-92b and preserve the basal expression levels of the untreated control cells (Figure 1C).

3.3 *Effects of EcN and EcoR12 EVs on The Regulation of Tri-DAP Expression by Peptide Substrates*

In the colon, bacterial peptides derived from peptidoglycan degradation (MDP, Tri-DAP) are internalized by the PepT1 transporter [9]. Moreover, di/tripeptide substrates are inducers of PepT1 expression in intestinal epithelial cells [35]. In this scenario, we sought to analyze whether EVs from probiotic and commensal strains could influence the activation of PepT1 expression by natural substrates, such as Tri-DAP. Prior to the study, we stablished the experimental conditions to select the Tri-DAP dose and the optimal incubation time to achieve a response. To this end, Caco-2 cell monolayers were incubated with different concentrations of Tri-DAP (1, 5, 10 μg/mL) for 8 and 24 h. The MTT assay revealed that Tri-DAP, at the concentrations used, did not cause any cytotoxic effect, as cell viability was close to 100% after 24 h incubation (Figure 3B).

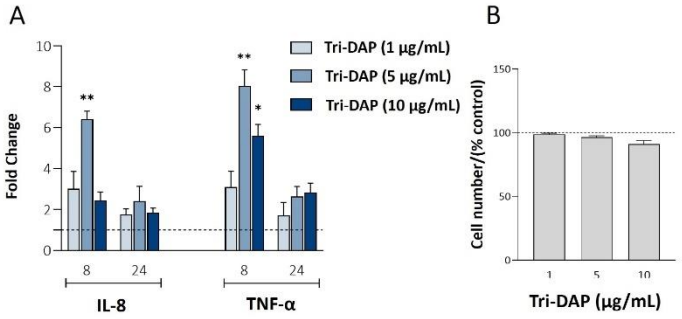


Figure 3. Setting up the experimental conditions for the Tri-DAP model. (A) Influence of the Tri-DAP concentration on the expression of genes encoding the pro-inflammatory cytokines IL-8 and TNF-α. Caco-2 cells were exposed to Tri-DAP at the final concentration of 1, 5 or 10 µg/mL for 8 and 24 h. Untreated cells were incubated in parallel as a control (dashed line). The relative mRNA levels of the indicated genes were measured by RT-qPCR using GAPDH as the reference gene. (B) Effect of the IL-1β concentration on cell viability assessed by the MTT assay. Caco-2 cell monolayers were exposed to the indicated Tri-DAP concentrations for 24 h. Untreated control cells were incubated in parallel (dashed line). In all panels, data are expressed as mean ± SEM from three independent experiments. Differences were evaluated with one-way ANOVA, followed by post hoc Tukey's. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ vs control.

The cell response was assessed by measuring the relative expression of IL-8 and TNF-α by RT-qPCR (Figure 3A). These proinflammatory cytokines serve as markers of NOD1 activation by internalized Tri-DAP. The results indicated that the maximal expression of IL-8 and TNF-α was achieved at 8 h incubation with TRI-DAP at a final concentration of 5 µg/mL, indicating that Tri-DAP induced a quick inflammatory response that decreased with time.

Based on the results we stablished the experimental conditions as follows: Caco-2 cell monolayers were pre-incubated with EcN EVs or EcoR12 EVs at a dose of 60 µg/mL for 3 h, and subsequently treated with Tri-DAP (5 µg/mL) for 8 h. For comparison, polarized cell monolayers incubated for 8 h with 60 µg/mL EcN EVs or EcoR12 EVs were used as a model of the intact intestinal epithelium.

In this model, the expression of PepT1 was assessed by RT-qPCR (Figure 4A). The relative PepT1 mRNA levels significantly increased in cells stimulated with Tri-DAP ($p \leq 0.05$), a finding that was consistent with the activation effect of the transporter substrates. Remarkably, EVs from the probiotic EcN prevented Tri-DAP-mediated PepT1 upregulation ($p \leq 0.05$). In these cells, PepT1 mRNA levels were similar to those of untreated control cells. EVs from the commensal EcoR12 exhibited a minor protective effect, with differences that did not reach statistical significance (Figure 4A, Tri-DAP treatment panel). Comparable to the model of intact intestinal epithelium presented in Figure 1 (48 h incubation), treatment of Caco-2 cells with EcN or EcoR12 EVs for a shorter period of time did not affect PepT1 mRNA levels compared to untreated control cells (Figure 4A, control panel).

CAPITULO 3

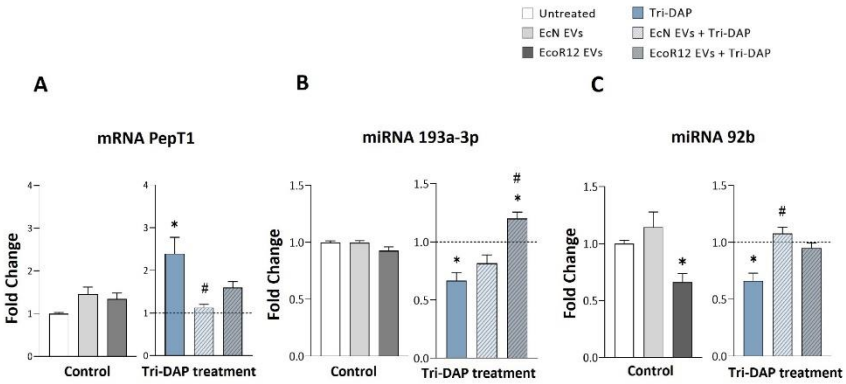


Figure 4. Modulation of PepT1 expression and its regulatory miRNAs miR-193a-3p and miR-92b by EcN or EcoR12 EVs in the Tri-DAP induction model. In panels labelled as Tri-DAP treatment, Caco-2 cells were incubated with EVs (60 μg/ml.) from EcN or EcoR12 for 3 h and then challenged with Tri-DAP (5 μg/mL) for 8 h. In panels labeled as control, Caco-2 cells were challenged with EVs (60 μg/mL) from EcN or EcoR12 and incubated for 8 h. (A) Relative mRNA levels of PepT1 were measured by RT-qPCR using GAPDH as the reference gene. (B, C) Relative expression levels of the indicated miRNAs were measured by RT-qPCR and normalized to the U6 reference gene. In all panels, data are expressed as mean ± SEM from three independent experiments. Differences were evaluated with one-way ANOVA, followed by post hoc Tukey's. * $p \leq 0.05$ vs. untreated control cells (white bars or dashed lines); # $p \leq 0.05$ vs Tri-DAP treated cells.

The expression of miR-193a-3p and miR-92b was also analyzed in cells challenged with Tri-DAP (Figure 4B,C). In the absence of probiotic / microbiota EVs, this pro-inflammatory bacterial peptide promoted significant downregulation of both miRNAs ($p \leq 0.05$). The reduced expression of miR-92b correlated with the increased expression of the PepT1 mRNA target. Notably, the Tri-DAP downregulatory effect on miR-92b was counteracted by EVs from either EcN or EcoR12 strains. Again, EcN EVs showed a more prominent effect ($p \leq 0.05$) (Figure 4C, Tri-DAP panel). In the absence of Tri-DAP, EVs from the commensal EcoR12 reduced miR-92b levels ($p \leq 0.05$) (Figure 4C, control panel). This effect was not observed at longer incubation times (Figure 1).

Regarding miR-193a-3p, the expression profile differed depending on whether cells were treated with EcN or Ecor12 EVs. EcN EVs tended to preserve the basal expression levels of untreated control cells, whereas EcoR12 EVs upregulated miR-193a-3p over the basal expression level ($p \leq 0.05$) (Figure 4B, Tri-DAP panel). In the absence of Tri-DAP, no differences were detected in miR-193a-3p levels between untreated or EV-treated cells (Figure 4B, control panel). Thus, in the absence of additional signals, EVs from EcN and EcoR12 did not modulate early or late miR-miR-193a-3p expression.

The differential regulation of PepT1 and miR193a-3p by EcN or EcoR12 EVs in the presence of the PepT1 substrate prompted us to quantify PepT1 protein levels. The results from ELISA (Figure 5A) and immunofluorescence confocal microscopy assays (Figure 5B,C) revealed that PepT1 protein levels did not differ between cells, even though mRNA PepT1 levels were significantly different.

In the absence of Tri-DAP, the results matched the expected protein expression profile (Figure 5, control panels). In the presence of Tri-DAP, the regulatory effects exerted by microbiota/probiotic EVs on PepT1 mRNA, miR-92b and miR-193a-3p expression could explain why these cells exhibited similar PepT1 protein levels as untreated control cells. In this sense, although PepT1 mRNA levels were somehow higher in EcoR12 EVs +

Tri-DAP treated cells that control cells (Figure 4), the upregulation of miR-193a-3p by EcoR12 EVs under these conditions could compensate for the expected higher synthesis of PepT1. In cells treated with EcN EVs + Tri-DAP, the relative expression of PepT1 mRNA, miR-92b and miR-193a-3p did not significantly differ from those of untreated control cells, a fact that is consistent with similar PepT1 amounts detected. In the absence of EVs, the downregulation of miR-193a-3p by Tri-DAP should result in higher PepT1 protein levels. However, in cells stimulated with Tri-DAP the total PepT1 amount did not differ from that of control cells (Figure 5), suggesting that peptide substrates may activate additional regulatory mechanisms to preserve low levels of colonic PepT1 in order to maintain intestinal homeostasis.

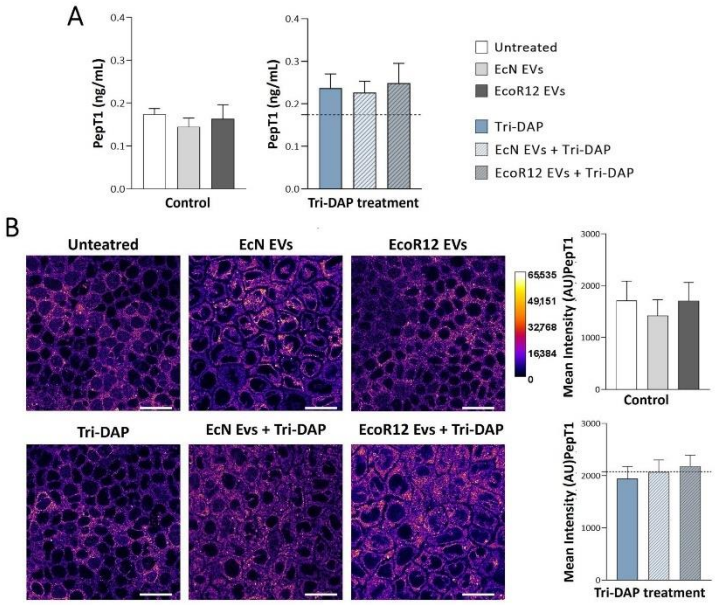


Figure 5. Quantification of PepT1 protein levels in Caco-2 cells stimulated with the peptide substrate Tri-DAP. Tri-DAP stimulation conditions: Caco-2 cells were incubated with EVs (60 µg/mL) from EcN or EcoR12 for 3 h and then challenged with Tri-DAP (5 µg/mL) for 8 h. Control conditions: Caco-2 cells were challenged with EVs (60 µg/mL) from EcN or EcoR12 and incubated for 8 h. (A) PepT1 protein was quantified by ELISA in cell lysates. Data are expressed as mean ± SEM from 3 independent experiments. (B) Quantification of PepT1 by immunofluorescence confocal microscopy. Representative confocal maximal projection images of cells treated as indicated are shown in Fire LUT after image processing. The Quantification of the PepT1 mean intensity is given for each model (control or Tri-DAP treatment) together with the calibration bar of Fire LUT intensity on the right. Scale bar: 20 µm. Data are presented as mean ± SEM of arbitrary intensity units (AU) (n = 3 independent biological replicates). No statistically significant differences were obtained with one-way ANOVA, followed by post hoc Tukey's.

CAPITULO 3

3.4 *Modulation of Proinflammatory Cytokines by EcN or EcoR12 EVs in Caco-2 Cells Stimulated with Tri-DAP*

The uptake of Tri-DAP by PepT1 and the subsequent elevation of proinflammatory cytokines through the activation of NOD receptors are well-documented [1]. In this context, we analyzed the ability of EcN or EcoR12 EVs to influence the expression of these inflammatory mediators after PepT1 activation. This analysis included the cytokines IL-8 and TNF-α. Treatment of Caco-2 cells with EcN or EcoR12 EVs significantly induced IL-8 and TNF-α, both at the mRNA and protein level, compared to untreated control cells (Figure 6). This finding was consistent with the activation of immune receptors (TLRs, NOD1) by microbial-associated molecular patterns (MAMPs) carried and delivered to epithelial cells by the bacterial EVs.

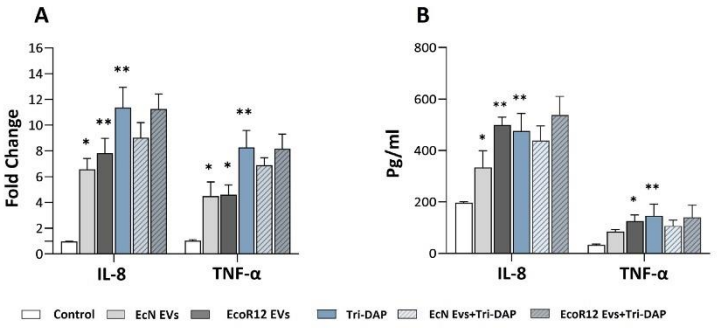


Figure 6. Expression analysis of proinflammatory cytokines in cells stimulated with Tri-DAP in the absence or presence of EcN EVs or EcoR12 EVs. Tri-DAP stimulation conditions: Caco-2 cells were incubated with EVs (60 μg/mL) from EcN or EcoR12 for 3 h and then challenged with Tri-DAP (5 μg/mL) for 8 h (blue and dashed bars). Control conditions: Caco-2 cells were challenged with EVs (60 μg/mL) from EcN or EcoR12 and incubated for 8 h (white and gray bars). (A) Relative mRNA levels of the indicated cytokines were measured by RT-qPCR using GAPDH as the reference gene. (B) Secreted IL-8 and TNF-α were quantified by ELISA in the culture supernatants. In all panels, data are expressed as mean ± SEM from three independent experiments. Differences were evaluated with one-way ANOVA, followed by post hoc Tukey's. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ vs. control cells.

Treatment with Tri-DAP also triggered upregulation of IL-8 and TNF-α. In this case the mRNA levels were even higher than those elicited by EcN or EcoR12 EVs. Notably, EVs from these intestinal *E. coli* strains did not modify the expression profile of the pro-inflammatory cytokines in response to Tri-DAP. The relative expression of mRNA and the levels of secreted IL-8 and TNF-α were similar between cells challenged with TRI-DAP both in the absence or presence of EVs. In cells incubated with EVs from the probiotic EcN, the expression of both proinflammatory cytokines tended to be lower. Although not statistically significant, these differences are compatible with the anti-inflammatory activity of EcN EVs previously reported [26,29].

4. Discussion

PepT1 is a member of the proton-coupled oligopeptide transporter family that plays a relevant role in the maintenance of intestinal homeostasis. Indeed, dysregulation of PepT1 in the colon has been associated with chronic inflammatory diseases such as IBD and colitis-associated cancer [36].

In the normal gut, PepT1 is primarily expressed in the enterocytes of the small intestine, where it mediates the absorption of di/tri-peptides derived from the digestion of

dietary proteins. Yet, PepT1 expression is negligible in the colonic epithelium. PepT1 has a broad substrate specificity, being able to transport hundreds and thousands of different dipeptides and tripeptides from dietary protein sources, but also bacterial peptides and structurally related peptidic drugs such as β-lactam antibiotics, L-DOPA and acetylcholine esterase inhibitors among others [36,37]. In addition to its role in bioavailability of dietary peptides, PepT1 regulates the expression of specific miRNAs and target proteins along the crypt-villi axis of jejunum absorptive cells, contributing to important intestinal functions such as apoptosis and proliferation of intestinal epithelial cells [38]. Due to its essential role, PepT1 expression and function are regulated by multiple mechanisms acting at different levels [35]. At the transcriptional level, PepT1 expression is controlled by hormones and upregulated by substrate availability and inflammatory mediators, through the action of transcription factors including, among others, Cdx2 or Nfr2. At the posttranscriptional level, mRNA degradation and translation are inhibited by miR-92b and miR-193a-3p, respectively. Moreover, protein activity is regulated by phosphorylation through several kinases such as the AMP-Kinase, and also by interaction with other proteins involved in maintaining the proton gradient across the cell membrane (Na+/H+ exchanger, NHE3) or in the intracellular trafficking and proper location of PepT1 in the apical side of the enterocyte cell membrane [4,36].

In the colon, the mucosal surface is constantly exposed to microbiota and its derived bacterial metabolic products and proinflammatory peptides such as MDP, Tri-DAP or fMLP. The poor expression of PepT1 in healthy colonic epithelial cells limits the uptake of bacterial peptides and the subsequent activation of inflammatory pathways. However, the normal PepT1 expression pattern is altered in IBD. Several factors may contribute to the enhanced expression of PepT1 in the colonic epithelium of IBD patients such as the high levels of proinflammatory cytokines [39–41] and dysregulation of miRNAs that target PepT1 mRNA [13,42]. In this clinical condition, overexpression of PepT1 amplifies inflammation by transporting bacterial proinflammatory peptides that activate NOD signaling cascades. This mechanism contributes to the abnormal immune response against the gut microbiota. In fact, in the experimental model of dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis, overexpression of PepT1 in the colonic mucosa of transgenic mice aggravated inflammation [9], whereas knockout (KO) PepT1 animals exhibited reduced levels of proinflammatory cytokines than wild type animals. Interestingly, differences between KO-PepT1 and wild type mice were abolished by antibiotic treatment before colitis induction [43]. Moreover, there is evidence that overexpression of PepT1 regulates the colonic expression and secretion of certain miRNAs, such as miR-23, which is involved in active UC and CD, thereby contributing to disease progression [44]. All these findings point to PepT1 as a potential target for IBD treatment to ameliorate inflammation [6,45].

Previous studies of our group proved the efficacy of EVs from the probiotic EcN to improve inflammation and intestinal barrier disfunction in the experimental model of DSS-induced colitis in mice [26]. Further research allowed identification of the underlying molecular mechanisms, particularly those related with dysregulated miRNAs and their target genes. In goblet cells, EcN EVs increased TFF3 expression by promoting downregulation of miR-7-5p through the phosphatidyl-inositol-3-kinase (PI3K) signaling pathway. By this mechanisms EcN EVs can improve barrier function and repair [28]. Also, in the IL-1β-induced inflammation model, EVs from this probiotic promoted downregulation of miR-24 and miR-200a, which indirectly control free serotonin levels by posttranscriptionally regulating the serotonin reuptake transporter SERT [29]. The comparison with EVs isolated from the commensal EcoR12 revealed that the regulatory effects were strain-specific.

Based on these findings, here we explored the ability of EcN EVs to modulate the expression of PepT1 and its regulatory miRNAs miR-193a-3p and miR-92b under inflammatory conditions, using the well-characterized IL-1β inflammation model in Caco-2 cells [29]. The results showed that treatment with the proinflammatory cytokine IL-1β resulted in higher levels of PepT1 (both mRNA and protein) together with lower levels of both

miRNAs compared to untreated control cells. Although in the absence of inflammation (control cells), EVs from the probiotic EcN neither regulate PepT1 expression nor its regulatory miRNAs, in IL-1β treated cells, EcN EVs significantly reduced the PepT1 protein amount to levels even lower than those of control cells. The main mechanism underlying this effect was the upregulation of miR-193a-3p, which inhibits PepT1 synthesis without altering the mRNA levels [13]. This is a strain-specific mechanism since EVs from the commensal EcoR12 did not upregulate miR-193a-3p under inflammatory conditions. Concerning miR-92b, EVs from both strains prevented the IL-1β-induced downregulation of miR-92b. The relative expression levels of this miRNA and its target PepT1 mRNA were undistinguishable from those of untreated control cells.

When analyzing the effects of EcN and EcoR12 EVs on the regulation of PepT1 by the natural bacterial substrate Tri-DAP, we found that EVs from both strains prevented Tri-DAP-mediated downregulation of miR-193a-3p and miR-92b and the associated increase in the PepT1 mRNA levels. However, in this model of PepT1 induction, EVs from the probiotic strain did not upregulate miR-193a-3p compared to untreated control cells. This suggests that EcN EVs did not control PepT1 expression under basal conditions but can play a pivotal role in response to inflammation as a stressor. Other regulatory mechanisms elicited by EcN EVs, such as the anti-inflammatory effects or regulation of genes and miRNAs that control intestinal serotonin levels, are only active under inflammatory conditions [29]. It should be noted that although Tri-DAP increases PepT1 mRNA levels, the total protein amount does not significantly differ from control or EV-treated cells. This suggests that PepT1 is tightly controlled in the healthy colonic epithelium at the protein level. The transcriptional activation of PepT1 induced by the abundant proinflammatory bacterial peptides in the colon may be compensated by post-transcriptional mechanisms other than miR-193a-3p to prevent strong proinflammatory responses.

It is important to consider that the gut microbiota plays an essential role in the training of the innate immune system, which should quickly recognize and mount inflammatory responses against pathogens. The uptake of Tri-DAP through PepT1 induced a proinflammatory response with increased production of IL-8 and TNF-α. This finding was consistent with the recognition of Tri-DAP by cytosolic NOD receptors and the subsequent activation of NF-kB [7]. The inflammatory response was not prevented by EcN or EcoR12 EVs. In fact, treatment of Caco-2 cells with EVs from both strains also triggered the expression and secretion of the proinflammatory cytokines IL-8 and TNF-α. In this context, we had previously shown that EVs released by commensal microbiota are internalized by intestinal epithelial cells trough endocytosis and interact with NOD1 at the endosomal compartment [25]. Since PepT1 expression is negligible in healthy colonic epithelia, endocytosis of microbiota EVs provide a mechanism for peptidoglycan delivery into the host cytosol and the sensing of microbial products that steadily prime the innate immune system.

Clinical research is gradually moving towards personalized medicine. Understanding how host-microbe associations may impact human health and disease highlights microbiome research as a crucial element to drive future advancements in medicine and nutritional approaches [46,47]. This is especially relevant in the case of chronic intestinal inflammatory diseases, since current IBD therapies have substantial side effects, and in most cases, their efficacy diminishes after long-term treatments [48]. Moreover, proper control of chronic inflammation may reduce long-term complications such as colorectal cancer [49]. At present, the identification of novel probiotic strains for IBD treatment is a growing area. In this context, besides the well-known probiotic EcN, the gut colonizing bacteria *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii* are seen as promising candidates for next-generation probiotics [50,51]. The aim of biotherapies involving probiotics and prebiotics is to restore the gut microbiota balance towards anti-inflammatory and mucosa healing profiles [52,53]. Considering that the beneficial effects of probiotics are mediated by bioactive bacterial molecules, the paradigm of microbiome-based interventions is currently shifting towards postbiotics [17,54]. The administration of postbiotics is a harmless

strategy that exploits the biological activity of probiotic effectors, avoiding the risk of bacterial translocation in patients with disrupted intestinal barrier and altered immune responses. In addition, postbiotics generally exhibit good absorption and distribution, circumventing the technical challenges associated with bacterial viability and colonization efficiency. This characteristic facilitates their application in a wide variety of pharmaceuticals and functional foods. [55,56].

Now, EVs derived from gut beneficial microbes are emerging as upcoming postbiotics [20,57–59]. In the gut, microbiota-host communication principally relies on metabolites and secreted biomolecules and vesicles able to migrate through the mucus layer [60]. Accumulated evidence has shown that microbiota EVs serve as vehicles for the delivery of functional bacterial molecules to host cells in a protected environment. Microbiota EVs enclose a wide diversity of biological components produced by the parental strain, including typical MAMPs that engage host immune receptors, as well as specific proteins, metabolites, lipids, and nucleic acids that modulate host responses [22,61]. Therefore, some effects exerted by microbiota EVs are strain-specific as they depend on their bacterial origin and cargo.

Despite intense research in animal models of human diseases demonstrating the benefits of EVs from certain beneficial gut commensals in ameliorating IBD [26,62,63], translation of probiotic/microbiota EVs to human health as a postbiotic strategy requires deep knowledge of the action mechanisms. This study provides new insights on the molecular mechanisms triggered by EVs from the probiotic EcN to ameliorate inflammation in intestinal epithelial cells. The main finding was the EV-mediated upregulation of miR-193a-3p and the accompanying downregulation of PepT1 protein. Importantly, this regulatory effect was only activated in epithelial cells exposed to inflammatory mediators. By this mechanism, EcN EVs may reduce inflammation in response to microbiota in IBD and other chronic inflammatory disorders by limiting the entrance of bacterial proinflammatory peptides. Moreover, downregulation of miR-193a-3p in IBD has been related with the promotion of colitis-associated colorectal cancer [42,64] acting on the target mRNAs of the Interleukin-17 receptor D (IL-17RD) and the plasminogen activator urokinase (PLAU). IL-17RD is a multifunctional regulator of immune receptors and inflammatory signaling pathways [65], whereas PLAU is involved in cancer cell migration and angiogenesis [64]. In this context, upregulation of miR-193a-3p by EcN EVs may have additional beneficial effects preventing cancer onset and progression in chronically inflamed colon.

5. Conclusions

This study provides new insights into the regulation of PepT1 by EVs of the probiotic EcN in colonic epithelial cells under inflammatory conditions, with a focus on their potential use as a postbiotic strategy for treating IBD and associated cancer progression. Upregulation of miR-193a-3p and the subsequent downregulation of PepT1 in response to EcN EVs serve to limit the colonic uptake of bacterial proinflammatory peptides, thereby reducing intestinal inflammation in response to microbiota in chronic intestinal inflammation disorders. To the best of our knowledge, this is the first study providing evidence that EVs from a probiotic strain regulate PepT1 expression through upregulation of miR-193a-3p.

The results presented here, together with previous findings of our group show the potential of EcN EVs in: (i) repairing and reinforcing the intestinal epithelial barrier through regulation of TFF3/miR-7-5p and tight junction proteins; (ii) reducing serotonin levels through regulation of SERT expression at both the transcriptional and posttranscriptional levels; and (iii), counteracting oxidative stress through differential regulation of pro-inflammatory and antioxidant enzymes. These findings strongly support the potential application of EVs from the probiotic EcN as a safe postbiotic strategy for IBD, acting at multiple levels to improve intestinal homeostasis. Clinical trials are needed to confirm the benefits of interventions involving EcN EVs interventions in leaky gut and chronic inflammatory disorders in humans.

Supplementary Materials: No supplementary files

Author Contributions: Conceptualization, L.B. and J.B.; methodology, Y.O.-M., C.C.-A. and S.M.-R.; formal analysis, Y.O.-M, S.M.-R. and C.C.-A.; investigation, Y.O.-M; data curation, Y.O.-M., S.M.-R; writing—original draft preparation, L.B. and Y.O.-M.; writing—review and editing, J.B., S.M.-R, Y.O.-M. and C.C.-A.; supervision, L.B. and J.B.; funding acquisition, L.B. and J.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by MCIIN/AEI, grant number PID2019-107327RB-100, and MICIU/AEI/10.13039/501100011033, grant number PID2022-137192OB-I00.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The original contributions presented in the study are included in the article. Further inquiries can be directed to the corresponding author/s.

Acknowledgments: We acknowledge Ardeypharm laboratories for providing the probiotic EcN. Y. Olivo-Martínez acknowledges the Ministry of Science, Technology and Innovation (Minciencias) of Colombia for their doctoral scholarship awarded through the International Doctorate Call N_860/2020. S. Martínez-Ruiz acknowledges his FPI fellowship from the Spanish Ministry of Science and Innovation (Ref: PRE2020-093851). We thank Manel Bosch (Advanced Optical Microscopy Unit; CCiT-UB) for his support and advice on confocal microscopy.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

[1] Viennois E, Pujada A, Zen J, Merlin D. Function, regulation, and pathophysiological relevance of the POT superfamily, specifically PepT1 in inflammatory bowel disease. Compr Physiol 2018;8. https://doi.org/10.1002/cphy.c170032.

[2] Merlin D, Si-Tahar M, Sitaraman S V., Eastburn K, Williams I, Liu X, et al. Colonic epithelial hPepT1 expression occurs in inflammatory bowel disease: Transport of bacterial peptides influences expression of MHC class 1 molecules. Gastroenterology 2001;120. https://doi.org/10.1053/gast.2001.24845.

[3] Geillinger KE, Kipp AP, Schink K, Röder P V., Spanier B, Daniel H. Nrf2 regulates the expression of the peptide transporter PEPT1 in the human colon carcinoma cell line Caco-2. Biochim Biophys Acta Gen Subj 2014;1840. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.12.026.

[4] Spanier B, Rohm F. Proton coupled oligopeptide transporter 1 (PepT1) function, regulation, and influence on the intestinal homeostasis. Compr Physiol 2018;8. https://doi.org/10.1002/cphy.c170038.

[5] Ingersoll SA, Ayyadurai S, Charania MA, Laroui H, Yan Y, Merlin D. The role and pathophysiological relevance of membrane transporter pept1 in intestinal inflammation and inflammatory bowel disease. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2012;302. https://doi.org/10.1152/ajpgi.00477.2011.

[6] Viennois E, Ingersoll SA, Ayyadurai S, Zhao Y, Wang L, Zhang M, et al. Critical Role of PepT1 in Promoting Colitis-Associated Cancer and Therapeutic Benefits of the Anti-inflammatory PepT1-Mediated Tripeptide KPV in a Murine Model. CMGH 2016;2. https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2016.01.006.

[7] Dalmasso G, Nguyen HTT, Charrier-Hisamuddin L, Yan Y, Laroui H, Demoulin B, et al. PepT1 mediates transport of the proinflammatory bacterial tripeptide L-Ala-γ-D-Glu-meso-DAP in intestinal epithelial cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2010;299. https://doi.org/10.1152/ajpgi.00527.2009.

[8] Laroui H, Yan Y, Narui Y, Ingersoll SA, Ayyadurai S, Charania MA, et al. L-Ala-γ-D-Glu-meso-diaminopimelic acid (DAP) interacts directly with leucine-rich region domain of nucleotide-binding oligomerization domain 1, increasing phosphorylation activity of receptor-interacting serine/threonine- protein kinase 2 and its interaction with nucleotide-binding oligomerization domain 1. Journal of Biological Chemistry 2011;286. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.257501.

[9] Dalmasso G, Nguyen HTT, Ingersoll SA, Ayyadurai S, Laroui H, Charania MA, et al. The PepT1-NOD2 signaling pathway aggravates induced colitis in mice. Gastroenterology 2011;141. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.06.080.

[10] Caruso R, Warner N, Inohara N, Núñez G. NOD1 and NOD2: Signaling, host defense, and inflammatory disease. Immunity 2014;41. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.12.010.

[11] Wuensch T, Ullrich S, Schulz S, Chamaillard M, Schaltenberg N, Rath E, et al. Colonic expression of the peptide transporter PEPT1 is downregulated during intestinal inflammation and is not required for NOD2-dependent immune activation. Inflamm Bowel Dis 2014;20. https://doi.org/10.1097/01.MIB.0000443336.71488.08.

[12] Buyse M, Tsocas A, Walker F, Merlin D, Bado A. PepT1-mediated fMLP transport induces intestinal inflammation in vivo. Am J Physiol Cell Physiol 2002;283. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00186.2002.

[13] Dai X, Chen X, Chen Q, Shi L, Liang H, Zhou Z, et al. MicroRNA-193a-3p reduces intestinal inflammation in response to microbiota via down-regulation of colonic PepT1. Journal of Biological Chemistry 2015;290. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.659318.

[14] Sonnenborn U, Schulze J. The non-pathogenic Escherichia coli strain Nissle 1917-features of a versatile probiotic. Microb Ecol Health Dis 2009;21. https://doi.org/10.3109/08910600903444267.

[15] Jacobi CA, Malfertheiner P. Escherichia coli nissle 1917 (Mutaflor): New insights into an old probiotic bacterium. Digestive Diseases 2011;29. https://doi.org/10.1159/000333307.

[16] Behnsen J, Deriu E, Sassone-Corsi M, Raffatellu M. Probiotics: Properties, examples, and specific applications. Cold Spring Harb Perspect Biol 2013;5. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010074.

[17] Ma L, Tu H, Chen T. Postbiotics in Human Health: A Narrative Review. Nutrients 2023;15:1–17. https://doi.org/10.3390/nu15020291.

[18] Salminen S, Collado MC, Endo A, Hill C, Lebeer S, Quigley EMM, et al. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2021;18:649–67. https://doi.org/10.1038/s41575-021-00440-6.

[19] Olovo CV, Wiredu Ocansey DK, Ji Y, Huang X, Xu M. Bacterial membrane vesicles in the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel disease. Gut Microbes 2024;16:2341670. https://doi.org/10.1080/19490976.2024.2341670.

[20] González-Lozano E, García-García J, Gálvez J, Hidalgo-García L, Rodríguez-Nogales A, Rodríguez-Cabezas ME, et al. Novel Horizons in Postbiotics: Lactobacillaceae Extracellular Vesicles and Their Applications in Health and Disease. Nutrients 2022;14:1–19. https://doi.org/10.3390/nu14245296.

[21] Chang C-J, Lin T-L, Tsai Y-L, Wu T-R, Lai W-F, Lu C-C, et al. Next generation probiotics in disease amelioration. J Food Drug Anal 2019;27:615–22. https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.12.011.

[22] Díaz-Garrido N, Badia J, Baldomà L. Microbiota-derived extracellular vesicles in interkingdom communication in the gut. J Extracell Vesicles 2021;10:e12161. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jev2.12161.

[23] Alvarez C-S, Badia J, Bosch M, Giménez R, Baldomà L. Outer Membrane Vesicles and Soluble Factors Released by Probiotic Escherichia coli Nissle 1917 and Commensal ECOR63 Enhance Barrier Function by Regulating Expression of Tight Junction Proteins in Intestinal Epithelial Cells. Front Microbiol 2016;7:1–14. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01981.

[24] Diaz-Garrido N, Badia J, Baldomà L. Modulation of Dendritic Cells by Microbiota Extracellular Vesicles Influences the Cytokine Profile and Exosome Cargo. Nutrients 2022;14:1–20. https://doi.org/10.3390/nu14020344.

[25] Cañas M-A, Giménez R, Fábrega M-J, Toloza L, Baldomà L, Badia J. Outer Membrane Vesicles from the Probiotic Escherichia coli Nissle 1917 and the Commensal ECOR12 Enter Intestinal Epithelial Cells via Clathrin-Dependent Endocytosis and Elicit Differential Effects on DNA Damage. PLoS One 2016;11:1–22. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160374.

[26] Fábrega M-J, Rodríguez-Nogales A, Garrido-Mesa J, Algieri F, Badía J, Giménez R, et al. Intestinal Anti-inflammatory Effects of Outer Membrane Vesicles from Escherichia coli Nissle 1917 in DSS-Experimental Colitis in Mice. Front Microbiol 2017;8:1–13. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01274.

[27] Martínez-Ruiz S, Olivo-Martínez Y, Cordero C, Rodríguez-Lagunas MJ, Pérez-Cano FJ, Badia J, et al. Microbiota-Derived Extracellular Vesicles as a Postbiotic Strategy to Alleviate Diarrhea and Enhance Immunity in Rotavirus-Infected Neonatal Rats. Int J Mol Sci 2024;25:1184. https://doi.org/10.3390/ijms25021184.

[28] Olivo-Martínez Y, Bosch M, Badia J, Baldomà L. Modulation of the Intestinal Barrier Integrity and Repair by Microbiota Extracellular Vesicles through the Differential Regulation of Trefoil Factor 3 in LS174T Goblet Cells. Nutrients 2023;15:1–20. https://doi.org/10.3390/nu15112437.

[29] Olivo-Martínez Y, Martínez-Ruiz S, Cordero-Alday C, Bosch M, Badia J, Baldoma L. Modulation of Serotonin-Related Genes by Extracellular Vesicles of the Probiotic Escherichia coli Nissle 1917 in the Interleukin-1β-Induced Inflammation Model of Intestinal Epithelial Cells. Int J Mol Sci 2024;25. https://doi.org/10.3390/ijms25105338.

[30] Ochman H, Selander RK. Standard reference strains of Escherichia coli from natural populations. J Bacteriol 1984;157:690–3. https://doi.org/10.1128/jb.157.2.690-693.1984.

[31] Diaz-Garrido N, Fábrega M-J, Vera R, Giménez R, Badia J, Baldomà L. Membrane vesicles from the probiotic Nissle 1917 and gut resident Escherichia coli strains distinctly modulate human dendritic cells and subsequent T cell responses. J Funct Foods 2019;61:103495. https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103495.

[32] Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. Nat Methods 2012;9:676–82. https://doi.org/10.1038/nmeth.2019.

[33] Huang L-K, Wang M-JJ. Image thresholding by minimizing the measures of fuzziness. Pattern Recognit 1995;28:41–51. https://doi.org/10.1016/0031-3203(94)E0043-K.

[34] Dalmasso G, Nguyen HTT, Yan Y, Laroui H, Charania MA, Obertone TS, et al. MicroRNA-92b regulates expression of the oligopeptide transporter PepT1 in intestinal epithelial cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2011;300. https://doi.org/10.1152/ajpgi.00394.2010.

[35] Wang CY, Liu S, Xie XN, Tan ZR. Regulation profile of the intestinal peptide transporter 1 (PepT1). Drug Des Devel Ther 2017;11. https://doi.org/10.2147/DDDT.S151725.

[36] Viennois E, Pujada A, Sung J, Yang C, Gewirtz AT, Chassaing B, et al. Impact of PepT1 deletion on microbiota composition and colitis requires multiple generations. NPJ Biofilms Microbiomes 2020;6:27. https://doi.org/10.1038/s41522-020-0137-y.

[37] Newstead S. Recent advances in understanding proton coupled peptide transport via the POT family. Curr Opin Struct Biol 2017;45. https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.10.018.

[38] Zhang Y, Viennois E, Zhang M, Xiao B, Han MK, Walter L, et al. PepT1 Expression Helps Maintain Intestinal Homeostasis by Mediating the Differential Expression of miRNAs along the Crypt-Villus Axis. Sci Rep 2016;6. https://doi.org/10.1038/srep27119.

[39] Buyse M, Charrier L, Sitaraman S, Gewirtz A, Merlin D. Interferon-γ Increases hPepT1-Mediated Uptake of Di-Tripeptides Including the Bacterial Tripeptide fMLP in Polarized Intestinal Epithelia. American Journal of Pathology 2003;163. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63555-9.

[40] Vavricka SR, Musch MW, Fujiya M, Kles K, Chang L, Eloranta JJ, et al. Tumor necrosis factor-α and interferon-γ increase PepT1 expression and activity in the human colon carcinoma cell line Caco-2/bbe and in mouse intestine. Pflugers Arch 2006;452. https://doi.org/10.1007/s00424-005-0007-8.

[41] Wang P, Lu Y, Wen Y, Yu D, Ge L, Dong W, et al. IL-16 Induces Intestinal Inflammation via PepT1 Upregulation in a Pufferfish Model: New Insights into the Molecular Mechanism of Inflammatory Bowel Disease. The Journal of Immunology 2013;191. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202598.

[42] Berezin AE, Poplyonkin EI. Diagnostic and therapeutic value of micro-RNAs in inflammatory bowel disease. Biomedical Research and Therapy 2020;7. https://doi.org/10.15419/bmrat.v7i2.589.

[43] Ayyadurai S, Charania MA, Xiao B, Viennois E, Merlin D. PepT1 expressed in immune cells has an important role in promoting the immune response during experimentally induced colitis. Laboratory Investigation 2013;93. https://doi.org/10.1038/labinvest.2013.77.

[44] Ayyadurai S, Charania MA, Xiao B, Viennois E, Zhang Y, Merlin D. Colonic miRNA expression/secretion, regulated by intestinal epithelial PepT1, plays an important role in cell-to-cell communication during colitis. PLoS One 2014;9. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087614.

[45] Miyake M, Fujishima M, Nakai D. Inhibitory potency of marketed drugs for ulcerative colitis and Crohn's disease on PEPT1. Biol Pharm Bull 2017;40. https://doi.org/10.1248/bpb.b17-00181.

[46] Petrosino JF. The microbiome in precision medicine: The way forward. Genome Med 2018;10. https://doi.org/10.1186/s13073-018-0525-6.

[47] Behrouzi A, Nafari AH, Siadat SD. The significance of microbiome in personalized medicine. Clin Transl Med 2019;8. https://doi.org/10.1186/s40169-019-0232-y.

[48] Kotla NG, Rochev Y. IBD disease-modifying therapies: insights from emerging therapeutics. Trends Mol Med 2023;29. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2023.01.001.

[49] Long AG, Lundsmith ET, Hamilton KE. Inflammation and Colorectal Cancer. Curr Colorectal Cancer Rep 2017;13:341–51. https://doi.org/10.1007/s11888-017-0373-6.

[50] Pesce M, Seguella L, Del Re A, Lu J, Palenca I, Corpetti C, et al. Next-Generation Probiotics for Inflammatory Bowel Disease. Int J Mol Sci 2022;23:1–15. https://doi.org/10.3390/ijms23105466.

[51] De Filippis F, Esposito A, Ercolini D. Outlook on next-generation probiotics from the human gut. Cellular and Molecular Life Sciences 2022;79:14–8. https://doi.org/10.1007/s00018-021-04080-6.

[52] Jia K, Tong X, Wang R, Song X. The clinical effects of probiotics for inflammatory bowel disease: A meta-analysis. Medicine (United States) 2018;97. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000013792.

[53] Martyniak A, Medyńska-Przęczek A, Wędrychowicz A, Skoczeń S, Tomasik PJ. Prebiotics, Probiotics, Synbiotics, Paraprobiotics and Postbiotic Compounds in IBD. Biomolecules 2021;11:1–24. https://doi.org/10.3390/biom11121903.

[54] Mosca A, Abreu Y Abreu AT, Gwee KA, Ianiro G, Tack J, Nguyen TVH, et al. The clinical evidence for postbiotics as microbial therapeutics. Gut Microbes 2022;14. https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2117508.

[55] Wegh CAM, Geerlings SY, Knol J, Roeselers G, Belzer C. Postbiotics and Their Potential Applications in Early Life Nutrition and Beyond. International Journal of Molecular Sciences 2019, Vol 20, Page 4673 2019;20:4673. https://doi.org/10.3390/IJMS20194673.

[56] Afzaal M, Saeed F, Bibi M, Ejaz A, Shah YA, Faisal Z, et al. Nutritional, pharmaceutical, and functional aspects of rambutan in industrial perspective: An updated review. Food Sci Nutr 2023;11:3675–85. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/fsn3.3379.

[57] Yang J, Shin T-S, Kim JS, Jee Y-K, Kim Y-K. A new horizon of precision medicine: combination of the microbiome and extracellular vesicles. Exp Mol Med 2022;54:466–82. https://doi.org/10.1038/s12276-022-00748-6.

[58] Xie J, Li Q, Nie S. Bacterial extracellular vesicles: An emerging postbiotic. Trends Food Sci Technol 2024;143:1–14. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.104275.

[59] Krzyżek P, Marinacci B, Vitale I, Grande R. Extracellular Vesicles of Probiotics: Shedding Light on the Biological Activity and Future Applications. Pharmaceutics 2023;15:1–31. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020522.

[60] Shen Q, Huang Z, Yao J, Jin Y. Extracellular vesicles-mediated interaction within intestinal microenvironment in inflammatory bowel disease. J Adv Res 2022;37. https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.07.002.

[61] Sultan S, Mottawea W, Yeo J, Hammami R. Gut Microbiota Extracellular Vesicles as Signaling Molecules Mediating Host-Microbiota Communications. Int J Mol Sci 2021;22. https://doi.org/10.3390/IJMS222313166.

[62] Kang C sung, Ban M, Choi EJ, Moon HG, Jeon JS, Kim DK, et al. Extracellular Vesicles Derived from Gut Microbiota, Especially Akkermansia muciniphila, Protect the Progression of Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis. PLoS One 2013;8:e76520. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0076520.

[63] Ma L, Shen Q, Lyu W, lv L, Wang W, Yu M, et al. Clostridium butyricum and Its Derived Extracellular Vesicles Modulate Gut Homeostasis and Ameliorate Acute Experimental Colitis. Microbiol Spectr 2022;10. https://doi.org/10.1128/spectrum.01368-22.

[64] Lin M, Zhang Z, Gao M, Yu H, Sheng H, Huang J. MicroRNA-193a-3p suppresses the colorectal cancer cell proliferation and progression through downregulating the PLAU expression. Cancer Manag Res 2019;11. https://doi.org/10.2147/CMAR.S208233.

[65] Pande S, Yang X, Friesel R. Interleukin-17 receptor D (Sef) is a multi-functional regulator of cell signaling. Cell Communication and Signaling 2021;19:6. https://doi.org/10.1186/s12964-020-00695-7.



6. DISCUSIÓN

El estilo de vida de las sociedades modernas tiene un gran impacto en la salud humana. El estrés, los hábitos sociales, la dieta occidental, la inactividad física y el envejecimiento son los principales factores que predisponen a las personas a una amplia gama de enfermedades inflamatorias, metabólicas y neurológicas. La homeostasis intestinal y la salud humana dependen en gran medida de la microbiota intestinal y de la integridad de la barrera epitelial. Se ha demostrado que los desequilibrios en la composición y diversidad de la microbiota intestinal (disbiosis) que se traducen en un aumento de la permeabilidad intestinal son rasgos comunes en todas estas enfermedades [337]. En la EII, la alteración de la barrera epitelial y el consiguiente aumento de la permeabilidad paracelular permiten la translocación de microrganismos intestinales y componentes hacia la lámina propia. Las traslocación de productos metabólicos bacterianos activan el sistema inmunitario del huésped, desencadenando respuestas inflamatorias que provocan disfunción intestinal. Además, los altos niveles de mediadores proinflamatorios circulantes y productos microbianos alteran negativamente el funcionamiento normal de las vías de señalización entre el intestino y los órganos distales, contribuyendo así al desarrollo de una respuesta inmune exacerbada a nivel sistémico [337,338].

Las terapias actuales para la EII dirigidas al control de los síntomas y disminución de la inflamación a nivel intestinal como los aminoacilatos, los corticosteroides y los inmunosupresores, tienen efectos secundarios considerables. Además, se estima que entre el 10 y 30% de estos pacientes no responde a estos fármacos, y entre el 20 y 40% son propensos a perder la respuesta después de tratamientos prolongados [2]. Por lo tanto, existe la necesidad de descubrir nuevos enfoques terapéuticos eficaces. En este contexto, la fuerte asociación entre la microbiota intestinal y la salud humana promueve el diseño de nuevas estrategias nutricionales y terapéuticas orientadas al microbioma para restaurar la disbiosis y la homeostasis del huésped a favor de perfiles antiinflamatorios y de reparación de la mucosa intestinal. Las terapias bióticas para la EII incluyen el uso de probióticos, prebióticos y simbióticos [164,339,340].

Los probióticos son una de las primeras terapias bióticas usadas como opción de tratamiento para la manipulación de la microbiota intestinal y su impacto en los trastornos asociados a la permeabilidad intestinal. Sin embargo, el riesgo potencial para las personas inmunodeprimidas y las limitaciones tecnológicas para controlar la viabilidad bacteriana se consideran limitaciones potenciales para su aplicación como alimentos funcionales. Para evitar riesgos de seguridad, las futuras terapias basadas en microbiomas dirigidas al intestino se centrarán el uso de postbióticos [164,341,342]. El termino postbiótico incluye compuestos bioactivos (metabolitos, componentes bacterianos, factores secretados), no replicativos producidos por probióticos o bacterias beneficiosas en el intestino. Se caracterizan por presentar buena absorción, distribución y una alta capacidad de señalización en diferentes órganos y tejidos para desencadenar respuestas específicas del huésped [161]. En este contexto, las EVs derivadas de la microbiota y los probióticos están emergiendo como futuros postbióticos, ya que cumplen los requisitos y ofrecen los beneficios necesarios para incluirse en este grupo de bioterapia [312,343–345]. Debido a su estructura de tamaño nanométrico, su estabilidad y la gran variedad de moléculas de cargo, las EVs derivadas de la microbiota pueden transportar y entregar a las células huésped moléculas efectoras que modulan las vías de señalización y los procesos celulares, como las respuestas inmunes y de defensa. Los efectos ejercidos por EVs de la microbiota son específicos de cepa, ya que dependen de su origen y carga bacteriana [106].

Varios estudios *in vivo* en modelos murinos de EII han demostrado que la administración oral de EVs de *C. butyricum* [333], o de microbiota intestinal beneficiosa como *B. fragilis* [334] y *A. muciniphila* [335], mejora la función e integridad de la barrera epitelial intestinal. Estos efectos se logran a través de diversos mecanismos, que incluyen la modulación de las respuestas inflamatorias e inmunitarias, así como de las uniones estrechas y las proteínas relacionadas con la mucina [336]. En este contexto, nuestros grupo ha demostrado que las EVs de cepas probióticas y comensales de *E. coli* modulan la función de barrera epitelial [173] y activan mecanismos reguladores que mantienen un equilibrio entre las respuestas antiinflamatorias y proinflamatorias [329,346]. Las EVs de la microbiota estimulan las células dendríticas para promover respuestas específicas de

las células T a través de varios mecanismos, que incluyen la activación de vías de señalización de TLR, la regulación de la expresión de miRNAs y la liberación diferencial de mediadores inmunes a través de exosomas [330,347]. Además, la administración oral de las EVs del probiótico EcN mejoró la progresión de la colitis en ratones tratados con DSS [226] y también alivió los síntomas clínicos y mejoró la respuesta inmune contra la infección por rotavirus en ratas neonatales [331].

A pesar de la evidencia científica que respalda las propiedades beneficiosas de las EVs derivadas de cepas comensales y probióticas en el desarrollo del sistema inmunológico del huésped y en el mantenimiento de la barrera epitelial intestinal, los mecanismos moleculares involucrados en la regulación funcional de diferentes proteínas desreguladas en condiciones inflamatorias aún no están completamente comprendidos. Por tanto, el propósito principal de esta tesis fue evaluar los mecanismos moleculares que subyacen al efecto de EVs en la modulación de genes y miRNAs alterados en la EII, específicamente el péptido TFF3, los genes del sistema serotoninérgico y el trasportador de solutos PepT1.

6.1. Las EVs de EcN estimulan la producción de TFF3 mediante la activación de TLR-2 y la regulación negativa de miR-7-5p, favoreciendo así la reparación de la barrera celular.

Está bien documentado que las EVs derivadas de la microbiota modulan numerosas funciones esenciales para mantener la homeostasis intestinal, incluida la inmunidad intestinal y la función de barrera de la mucosa, mediante la regulación de las uniones estrechas [348]. Sin embargo, su papel en el mantenimiento y reparación de la mucosa intestinal, a través de la regulación de TFF3, está menos estudiado. En este contexto, nuestro grupo demostró que las EVs de EcN contrarrestan la expresión reducida de TFF3 en un modelo experimental de colitis inducida por DSS en ratones [226]. Esto nos llevó a especular que TFF3 responde de manera específica a la cepa de EcN y podría desempeñar un papel en el restablecimiento de las funciones de la barrera intestinal. Por lo tanto, en el trabajo realizado en el **capítulo 1** de esta tesis investigamos los mecanismos

moleculares implicados en la regulación de TFF3 por las EVs de la microbiota en células caliciformes LS174T y sus efectos posteriores sobre la integridad y reparación de la barrera epitelial intestinal en células Caco-2. Además, para determinar si estos efectos son específicos de la cepa, también investigamos las EVs del comensal EcoR12. Este enfoque se basa en estudios previos donde hemos evidenciado diferencias en las actividades inmunomoduladoras [347,349] y de fortalecimiento de barrera [173,332] entre las EVs de ambas cepas.

Los resultados de este estudio demuestran que las EVs de EcN estimulan la síntesis del péptido TFF3 a través de dos mecanismos moleculares i) regulación positiva de TLR-2 y ii) regulación negativa de miR-7-5p.

TLR-2 es un PRR que se encuentra presente en diversas células del sistema inmune y IECs. Se ha demostrado que la microbiota intestinal activa la expresión de TFF3 a través de la señalización de TLR-2 [218]. En este contexto, demostramos que la interacción de las EVs de EcN con las células LS174T induce la activación de la señalización de TLR-2, lo cual desencadena una serie de eventos intracelulares que conducen al aumento en la síntesis de TFF3. Confirmamos la participación de esta vía de señalización mediante el uso de C29, un inhibidor de TLR-2 que se une al dominio intracelular TIR de TLR-2 [350]. De manera consistente, observamos que la activación de la expresión y secreción de TFF3 por las EVs de EcN disminuyó en las células incubadas en presencia de C29.

El micro-RNA miR-7-5p ha sido descrito como un regulador negativo de la expresión de TFF3. Este miRNA se une específicamente a la región 3'-UTR del mRNA de TFF3 e induce su degradación [351]. Existe evidencia de que la activación de TFF3 activa la vía PI3K/AKT, lo que conduce a la regulación negativa de miR-7-5p. En condiciones saludables, los altos niveles de expresión de TFF3 se correlacionan con una expresión reducida de miR-7-5p. Por el contrario, cuando miR-7-5p se regula al alza (en la EII, por ejemplo), la degradación del mRNA de TFF3 da lugar a la inhibición de la vía PI3K/AKT [210,352]. Confirmamos la implicación de la vía PI3K/AKT mediante el uso del inhibidor LY294002. Nuestros resultados corroboran que la regulación positiva de TFF3 por las EVs de EcN se correlaciona con niveles reducidos de miR-7-5p. De manera consistente, observamos que

la inhibición de la vía PI3K induce la regulación positiva de miR-7-5p y, por lo tanto, la regulación negativa de TFF3. Hasta donde sabemos, aún no se ha explorado la regulación de miR-7-5p en las células caliciformes por las EVs de la microbiota. Nuestros resultados sugieren que la regulación negativa de miR-7-5p por parte de las EVs de EcN puede ser indirecta, a través del aumento de la producción de TFF3.

Además, los resultados de este estudio también demostraron que hay una regulación diferencial por las EVs de EcN y EcoR12 en la síntesis de TFF3 y en la regulación de la expresión de miR-7-5p. A diferencia de las EVs de EcN, las EVs de EcoR12 no estimularon la producción de TFF3 y regularon positivamente miR-7-5p a través de un mecanismo que no involucra la vía de señalización PI3K.

TFF3 es secretado junto a MUC2 por las células caliciformes. Ambas proteínas tienen un papel clave en el fortalecimiento y reparación de la barrera de la mucosa intestinal en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas [200]. TFF3 se regula al alza en respuesta al daño de la mucosa intestinal para favorecer la migración celular en la curación de la mucosa y disminuir la permeabilidad epitelial mediante la regulación de las proteínas de unión estrecha [353,354]. Nuestros resultados demostraron que las EVs de EcN estimularon la producción de TFF3 y MUC2 en células LS174T. En un estudio anterior, Engevik et al., (2019) demostraron que el comensal *Bifidobacterium dentium* promueve la secreción de MUC2 y TFF3 en células caliciformes, contribuyendo así a la reparación epitelial [355]. Además, recientemente nuestro grupo demostró en un modelo *in vivo* de rotavirus que las intervenciones con las EVs de EcN pueden contrarrestar la alteración de la función de las células caliciformes inducida por el rotavirus, aumentando la expresión de MUC2 y preservando la función de barrera [331].

Basado en estos hallazgos, planteamos la hipótesis de que las EVs de este probiótico podrían reforzar indirectamente las proteínas de unión estrecha y promover la restitución de la mucosa después de la lesión epitelial en células Caco-2. En este contexto, fue necesario el uso de medios condicionados recolectados de células LS174T estimuladas con las EVs de EcN o EcoR12 (GC-MC).

En cuanto a la actividad de fortalecimiento de barrera, en las células Caco-2 estimuladas con EcN-GC-CM, se evidenció una regulación positiva a nivel transcripcional de las proteínas ZO-1, ocludina y claudina-1, y una redistribución de ZO-1 a la membrana celular. Estos efectos han sido descritos por Hwang et al., (2017) quienes demostraron una regulación positiva indirecta de estas proteínas por TFF3 derivado de células caliciformes estimuladas por compuestos naturales con actividad antioxidante [356]. Nuestro grupo ha demostrado la regulación directa de las proteínas de unión estrecha por las EVs de EcN [173,332]. En esta tesis, evidenciamos que las EVs de EcN también refuerzan la barrera epitelial de forma indirecta a través de la activación de TFF3. En contraste, las EVs de EcoR12, no se asocian a efectos de fortalecimiento directo [173] o indirecto en la barrera epitelial.

En cuanto a la reparación de la barrera epitelial, un paso clave después de la lesión es la migración de las células epiteliales al área dañada para reconstruir la monocapa celular. Se ha demostrado que este proceso es estimulado por TFF3. En particular, nuestros resultados mostraron un aumento significativo en el cierre de la herida en monocapa de células Caco-2 mediante la estimulación con medio condicionado (EcN-GC-CM) derivado de células LS174T estimuladas con EVs de EcN. Esta actividad reparadora puede atribuirse a los efectos de TFF3 sobre la migración de células epiteliales. Sin embargo, este efecto no se observó tras la estimulación de células Caco-2 con EcoR12-GC-MC, que presentó niveles de TFF3 similares a los del control-GC-MC. Por otro lado, EcoR12-GC-CM estimula la proliferación de células Caco-2, aunque en un grado mucho menor que EcN-GC-CM. En este sentido, no se puede descartar la posibilidad de que los efectos proliferativos celulares inducidos por el medio condicionado de EcN-GC-CM estén mediados por factores distintos de TFF3 liberados por las células LS174T en respuesta a las EVs de la microbiota. Se sabe que, además de TFF3, los factores de crecimiento como FGF1, FGF2 y VEGF-C secretados por las células caliciformes son importantes reguladores de la restitución epitelial [357]. El hecho de que las EVs de la microbiota regulen positivamente otros factores en las células caliciformes está respaldado por los resultados de los ensayos de cicatrización de heridas realizados en la línea celular LS174T, donde las EVs de EcoR12 promueven la restitución celular sin aumentar los niveles de TFF3. Al contrastar nuestros

resultados con la evidencia científica publicada, no existe un consenso al momento de atribuir a TFF3 la función como regulador de la proliferación en células epiteliales. Estas discrepancias se pueden atribuir a las diferencias existentes en las líneas celulares y las condiciones experimentales utilizadas [220,358–360].

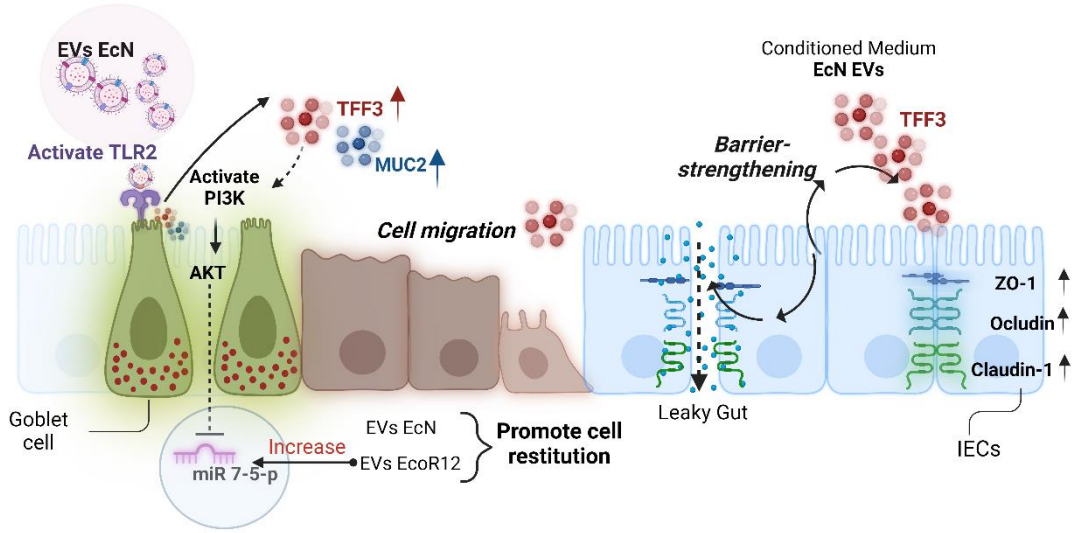


Figura 16. Resumen grafico de los aportes relevantes acorde con el capítulo 1 de esta tesis.

Creado con Biorender

6.2. Las EVs de EcN atenúan las alteraciones inducidas por IL-1β en el metabolismo de la serotonina, el estrés oxidativo y la integridad de la barrera epitelial.

La serotonina desempeña un papel crucial en la homeostasis intestinal tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Alteraciones en la biodisponibilidad y la señalización de la serotonina han sido asociadas con el desarrollo y la gravedad de la EII [235,252]. Tanto la microbiota intestinal como los mediadores de la inflamación regulan la expresión de genes implicados en la síntesis, recaptación y señalización de la serotonina. A su vez, la serotonina influye en la integridad y permeabilidad de la barrera epitelial, la respuesta inflamatoria y el equilibrio de la microbiota intestinal [242]. En este contexto, se ha planteado el uso de probióticos como una estrategia terapéutica para restaurar la homeostasis intestinal en la EII [53]. Actualmente se sabe que el beneficio de los probióticos en condiciones fisiológicas se debe en mayor parte a los metabolitos bacterianos secretados y a las EVs bacterianas [311,361,362]. Además, la regulación del metabolismo de la serotonina por la microbiota intestinal se ha estudiado principalmente en modelos celulares y animales *germ-free* [231]. Investigaciones previas realizadas por nuestro grupo demostraron, en diferentes modelos celulares y experimentales, el efecto de las EVs de cepas probióticas y comensales de *E. coli* en la modulación diferencial de la respuesta inmune del huésped y en el mantenimiento de la homeostasis intestinal [106]. Sin embargo, la capacidad de las EVs bacterianas para restablecer la homeostasis del sistema serotoninérgico en condiciones inflamatorias a nivel intestinal está menos estudiada.

Por lo tanto, en el trabajo realizado en el capítulo 2 de esta tesis, evaluamos el efecto de las EVs aisladas del probiótico EcN y del comensal EcoR12 en la modulación de la expresión de genes y proteínas del sistema serotoninérgico, así como su capacidad para contrarrestar las citocinas proinflamatorias y su efecto en la alteración de enzimas relacionadas con el estrés oxidativo y proteínas de unión estrecha en condiciones inflamatorias. Además, para profundizar en los mecanismos reguladores que subyacen a la modulación del sistema serotoninérgico, se abordó el análisis de la expresión de miRNAs reguladores de SERT. Todos los ensayos se realizaron en la línea celular Caco-2 tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, utilizando dos modelos

experimentales i) modelo de epitelio intestinal intacto y ii) modelo de inflamación inducida por IL-1β. Se eligió este modelo de inflamación porque la IL-1β es un mediador importante de la inflamación y de daño tisular en la EII [363,364].

Las EVs de EcN incrementan la expresión de SERT y contrarrestan la alteración de serotonina.

Respecto a los genes implicados en la síntesis (TPH1), degradación (MAO) y recaptación de serotonina (SERT) el análisis en ausencia de IL-1β mostró que las EVs de ambas cepas incrementan la expresión de SERT, tanto a nivel de mRNA como de proteína, así como los niveles de serotonina secretados. Sin embargo, solo las EVs de EcN activaron la expresión de TPH1. Estos hallazgos sugieren que, en condiciones fisiológicas, las EVs de ambas cepas podrían contribuir a regular la biodisponibilidad intestinal de serotonina mediante el aumento de la expresión de la proteína de recaptación SERT. En concordancia con estos resultados, Yaghoubfar et al., (2020/2021) demostraron que las EVs derivadas de *A. muciniphila* y *F. prausnitzii* modulan la expresión de los principales genes implicados en el sistema serotoninérgico en el modelo celular Caco-2 y en ratones sanos [362,365]. Estudios previos han mostrado que las suspensiones vivas del probiótico EcN mejoran la biodisponibilidad de la serotonina en explantes de tejido intestinal mediante la modulación de vías de síntesis. Sin embargo, la naturaleza de la señal efectora era desconocida. Nuestros hallazgos muestran que los efectos están mediados por las EVs liberadas por esta cepa probiótica [366].

Los resultados de esta tesis también mostraron que las EVs derivadas de las cepas EcN y EcoR12 regulan positivamente la expresión de AHR. Se sabe que las cepas de *E. coli* metabolizan el triptófano de la dieta en compuestos relacionados con el indol, y ejercen efectos beneficiosos sobre la integridad y función de la mucosa intestinal a través de su interacción con el receptor nuclear AHR [367,368]. Por lo tanto, la regulación positiva de la expresión de AHR por las EVs de estas cepas proporciona un mecanismo para reforzar la acción de los metabolitos microbianos del indol en la preservación de la homeostasis intestinal y el equilibrio de la microbiota.

A diferencia de los resultados anteriores, bajo condiciones inflamatorias observamos una regulación diferencial por las EVs de ambas cepas de *E. coli* en los parámetros evaluados. En cuanto a la regulación del sistema serotoninérgico, solo las EVs de EcN contrarrestaron el aumento de la producción de serotonina inducido por el tratamiento con IL-1β. SERT se expresa en las células epiteliales intestinales y favorece la internalización de 5-HT, desempeñando un papel critico en su regulación, disponibilidad y funciones a nivel intestinal. Por lo tanto, la alteración en su función puede generar niveles elevados de 5-HT extracelular [235]. Jørandli et al., (2020) demostraron una reducción significativa en la expresión de SERT en el epitelio de pacientes con UC y CD [251]. Nuestros resultados también mostraron niveles reducidos de mRNA y proteína SERT en células Caco-2 después del tratamiento con IL-1β. Además, tanto las EVs de EcN como EcoR12 impidieron la regulación negativa de SERT inducida por IL-1β, lo que resultó en un notable incremento de la expresión de SERT en condiciones inflamatorias. Este hallazgo fue consistente con lo observado en el modelo de epitelio intestinal intacto, sugiriendo que los mediadores de la inflamación no alteran el mecanismo regulador de SERT mediado por las EVs. Sin embargo, la inducción de TPH1 por las EVs de EcN en el epitelio intestinal intacto no tuvo lugar en presencia de IL-1β. Este resultado es consecuente con la modulación de los niveles de serotonina por las EVs de EcN en el contexto inflamatorio.

También observamos una correlación entre los niveles de expresión de SERT y secreción de serotonina en las células tratadas con las EVs de EcN. Sin embargo, las EVs de EcoR12 no contrarrestaron los niveles elevados de serotonina inducidos por el estímulo con IL-1β, a pesar de favorecer un aumento en la expresión de SERT. Es evidente que existen otros mecanismos involucrados que afectan la recaptación de SERT y su distribución subcelular [369].

Las EVs de EcN contrarrestan la alteración en la expresión de miR-24 y miR-200a mediada por IL-1β

A nivel intestinal, se ha demostrado la regulación postranscripcional de SERT por miR-24 y miR-200a. Ambos miRNAs están sobre-expresados en la mucosa intestinal de

pacientes con EII y en modelos experimentales de EII [262,263,370]. El incremento en los niveles de miR-24 en la colitis ulcerosa se han asociado con el deterioro en la integridad de la barrera intestinal debido a la regulación negativa de la proteína de unión estrecha cingulina [371].

En un modelo *in vivo* de ratones con EII inducido por TNBS, se observó una sobreexpresión de miR-24, lo cual condujo a una disminución en la expresión de SERT y a un aumento en la biodisponibilidad de serotonina. En este contexto, la inhibición de miR-24 aumentó la expresión de SERT y mejoró el estado inflamatorio [256]. En un modelo de EII en ratas, la transfección con un mimic de miR-200 logró inhibir significativamente la expresión de SERT [263]. Estudios previos de nuestro grupo han demostrado una regulación diferencial en la expresión de miRNA en células dendríticas por EVs de la microbiota. En concreto miR-24 y miR-200a son regulados positivamente por las EVs de EcoR12 [347].

En esta tesis, demostramos que las EVs de EcN contrarrestaron la expresión alterada de miR-24 y miR-200a inducida por IL-1β, estos resultados están estrechamente relacionados con la expresión de SERT y serotonina libre en condiciones inflamatorias. Esta investigación es la primera en demostrar la regulación de estos miRNAs por EVs de probióticos. En cuanto a las EVs de EcoR12, no mostraron efecto en la expresión de miR-24 y miR-200a, tanto en ausencia como en presencia de IL-1β. Es importante destacar que la regulación de SERT implica interacciones moleculares complejas que incluyen miRNAs, factores de transcripción y vías de señalización.

Las EVs de EcN contrarrestan la alteración en la expresión de TLR4 y NOD1 inducida por IL-1β, influyendo en la expresión de SERT.

En este contexto, nos enfocamos en estudiar la influencia de las EVs de EcN y EcoR12 en la expresión de TLR2, TLR4 y NOD1, receptores inmunes activados por la microbiota, que influyen en la biodisponibilidad intestinal de la serotonina al regular negativamente la expresión y función de SERT [369,372]. Nuestros resultados mostraron que la inflamación inducida por IL-1β en las células Caco-2 resultó en niveles más altos de

mRNA de TLR4 y NOD1, los cuales disminuyeron significativamente tras el tratamiento con las EVs de EcN. Estos resultados son consecuentes con la expresión de SERT, la secreción de serotonina y sus reguladores, miR-24 y miR-200a, en este modelo.

En la investigación realizada por Frolova et al., (2008) se observó una mayor expresión de TLR4 y de su correceptor CD14 en diferentes secciones de la mucosa intestinal de pacientes con EII [373]. La falta de correlación entre SERT y sus reguladores TLR4, miR-24 y miR-200a en células tratadas con las EVs de EcoR12 sugiere la existencia de otros mecanismos reguladores que aún no se han identificado. Investigaciones previas de nuestro grupo han demostrado el efecto antinflamatorio de las EVs de EcN [329]. En nuestro modelo, la IL-1β aumentó la expresión y secreción de mediadores proinflamatorios que están modulados por vías de señalización activadas por TLR, como IL-8, TNF-α, COX-2 e iNOS. De manera consistente, las EVs de EcN regularon la expresión de citocinas hacia un perfil antinflamatorio.

Con estos resultados consideramos que las EVs de EcN mantienen la expresión de SERT en condiciones de inflamación intestinal a través de varios mecanismos reguladores que implican la regulación positiva de miR-24 y miR-200a, y la regulación negativa de la expresión de TLR4 y NOD1.

Las EVs de EcN son más eficientes que las EVs de EcoR12 en la modulación del estrés oxidativo

En esta tesis, las EVs de EcN demostraron ser más efectivas que las EVs de EcoR12 para contrarrestar las alteraciones inducidas por IL-1β. El estrés oxidativo está asociado con respuestas inflamatorias y, por lo tanto, se ha implicado en el desarrollo y exacerbación de la EII [374]. En este contexto, se ha demostrado que los mediadores inflamatorios intestinales, incluida la serotonina, inhiben la expresión de enzimas antioxidantes en las células epiteliales intestinales [372]. Además, observamos que la IL-1β activó la expresión de enzimas inflamatorias COX-2 e iNOS, al mismo tiempo que ejerció una regulación negativa sobre la enzima antioxidante CAT. Las EVs de EcN impidieron los cambios en la expresión de las enzimas prooxidantes y antioxidantes secundarios al estimulo con IL-1β, mientras que las EVs de EcoR12 solo ejercieron una

regulación positiva en las enzimas antioxidantes. Estos resultados sugieren que las EVs de EcN podrían tener mayor potencial para mitigar el estrés oxidativo asociado con la inflamación intestinal.

Las EVs de EcN protegen contra el daño epitelial inducido por IL-1β

Las alteraciones en la barrera epitelial y el aumento de la permeabilidad intestinal son características clave de la inflamación en la mucosa que contribuyen a la gravedad de la EII [68-70]. Además, la desregulación de los niveles de serotonina se ha asociado con la exacerbación de la inflamación intestinal [48,71] y la permeabilidad de la barrera epitelial está regulada principalmente por las proteínas de unión estrecha. Estos hallazgos respaldan la necesidad de terapias dirigidas a fortalecer la integridad de la barrera intestinal.

Nuestros hallazgos demuestran que las EVs derivadas del probiótico EcN pueden prevenir el daño inducido por IL-1β en la barrera epitelial, al restaurar los niveles de expresión de las proteínas de unión estrecha ZO-1 y ocludina y mantener la TER. Estos resultados han sido consistentes con las investigaciones previas de nuestro grupo. En condiciones fisiológicas EcN refuerza la barrera epitelial intestinal y reduce la permeabilidad intestinal mediante la modulación de las proteínas de unión estrecha ZO-1 y claudina-14 y protege la integridad de la barrera contra el daño causado por *E. coli* enteropatógena al contrarrestar la expresión alterada y la distribución subcelular de las proteínas de unión estrecha [72]. Las EVs de una variedad de probióticos (*L. kefirgranum* PRCC-1301*, F. prausnitzii, C. butyricum, A. muciniphila*) se han implicado en la reparación de la barrera epitelial intestinal dañada como resultado de la colitis inducida con DSS en ratones, regulando al alza las proteínas de unión estrecha ocludina, claudina-1 y ZO-1 [320].

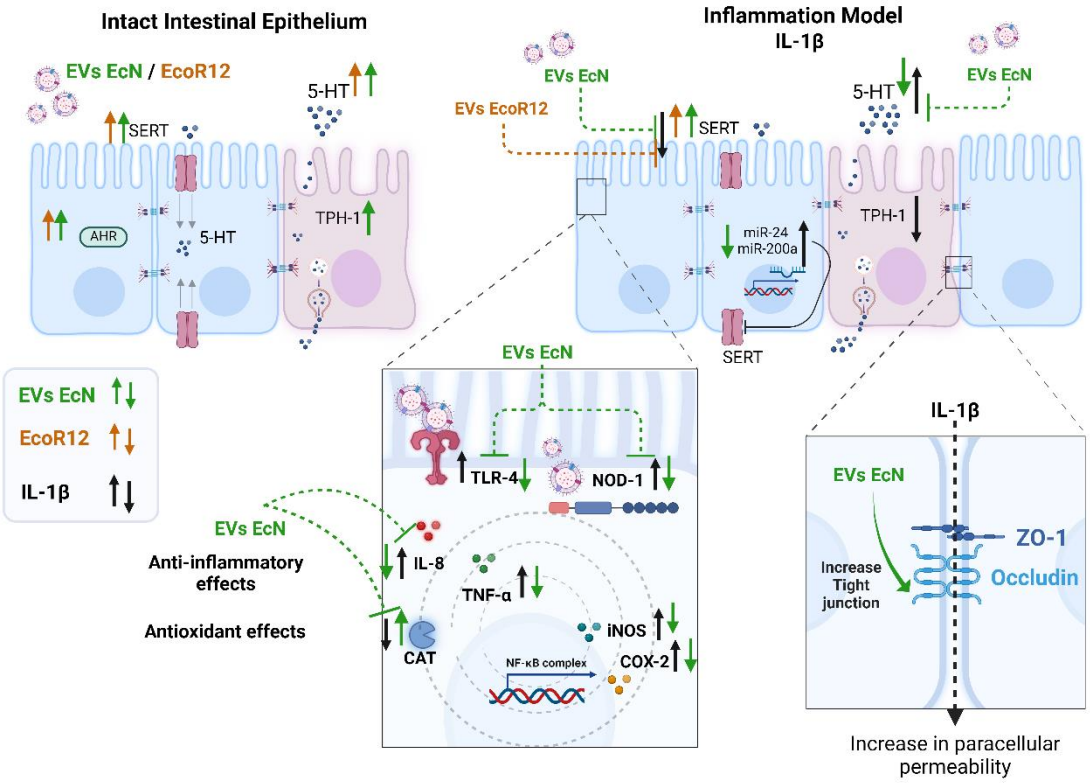


Figura 17. Resumen grafico de los aportes relevantes acorde con el **capítulo 2** de esta tesis.

5H-T, 5-hydroxytryptamine; SERT, serotonin reuptake transporter; AHR, aryl receptor; tryptophan hydroxylase enzyme; CAT, catalase; COX-2, cyclooxygenase 2; iNOS, inducible nitric oxide synthetase; NOD-1, nucleotide binding oligomerization domain; TLR-4, Toll like receptor; TNF-α Tumor Necrosis Factor alfa; IL-8, interleukin 8. Creado con Biorender

6.3. Las EVs de EcN contrarrestan la expresión alterada del transportador PepT1 en condiciones inflamatorias mediante la regulación positiva de miR-193a-3p.

La inflamación intestinal es un proceso complejo influenciado por múltiples factores, incluyendo la desregulación de transportadores específicos. En condiciones fisiológicas, el transportador de oligopéptidos PepT1 desempeña un papel relevante en el mantenimiento de la homeostasis intestinal, debido a que facilita el transporte y la absorción de di/tripéptidos de la dieta a nivel del intestino delgado. Sin embargo, la expresión de PepT1 es mínima o prácticamente indetectable en el colon [270,375]. El aumento de la expresión de este transportador en el colon está influenciado por el desequilibrio de la microbiota y la exposición constante a los productos metabólicos bacterianos y a los péptidos proinflamatorios, como MDP, Tri-DAP o fMLP, que desencadenan la activación de vías inflamatorias. Las investigaciones han demostrado que PepT1 colónico está sobreexpresado en pacientes con EII [268] posiblemente por los altos niveles de citocinas proinflamatorias [376–378] y la desregulación de microRNAs que se dirigen al mRNA de PepT1 [285,379]. Durante la EII, la sobreexpresión de PepT1 amplifica la inflamación al transportar péptidos proinflamatorios bacterianos que activan las cascadas de señalización NOD, contribuyendo a una respuesta inmune anormal contra la microbiota intestinal.

En un modelo de colitis inducida por DSS, la sobreexpresión de PepT1 en ratones transgénicos agravó la inflamación, mientras que los ratones knockout PepT1 mostraron niveles reducidos de citoquinas proinflamatorias. Estas diferencias desaparecieron tras el tratamiento con antibióticos antes de la inducción de la colitis [282]. Además, Ayyadurai et al. (2014), demostraron que la sobreexpresión de PepT1 regula tanto la expresión como la secreción de ciertos miRNAs colónicos, como el miR-23. La alteración de estos miRNAs en la EII contribuye significativamente a la progresión de la enfermedad [380]. Investigaciones previas realizadas por nuestro grupo demostraron la eficacia de las EVs de EcN para mejorar la inflamación y la disfunción de la barrera intestinal en el modelo experimental de colitis inducida por DSS en ratones [226]. Los resultados presentados en el capítulo 1 y 2 de esta tesis revelan que las EVs de EcN tienen efectos reguladores sobre miRNAs desregulados en

la EII y sus genes dianas. En particular, favorecen el incremento en la expresión de TFF3 al promover la regulación negativa de miR-7-5p, mejorando la función y la reparación de la barrera intestinal [328]. Además, promueven la regulación negativa de miR-24 y miR-200a, que controlan indirectamente los niveles de 5-HT libre mediante la regulación postranscripcional de SERT [381]. Sin embargo, la capacidad de las EVs bacterianas para para contrarrestar y/o prevenir la expresión alterada del transportador PepT1 en condiciones inflamatorias está menos estudiada.

Por lo tanto, en el trabajo realizado en el capítulo 3 de esta tesis, evaluamos la capacidad de las EVs de EcN para modular la expresión alterada de PepT1 y sus miRNAs reguladores miR-193a-3p y miR-92b en condiciones inflamatorias. Todos los ensayos se realizaron en la línea celular Caco-2 utilizando dos modelos experimentales i) modelo de inflamación inducida por IL-1β previamente establecido [381] y ii) modelo de regulación de PepT1 por péptidos bacterianos (Tri-DAP).

Encontramos que el tratamiento con IL-1β aumentó los niveles de PepT1 tanto a nivel de mRNA como de proteína y redujo los niveles de los miRNAs miR-193a-3p y miR-92b en comparación con las células control. En este contexto, las EVs de EcN contrarrestan la expresión alterada de PepT1 mediante la regulación positiva de miR-193a-3p, que inhibe la síntesis de PepT1 sin alterar los niveles de mRNA. Este es un mecanismo específico de cepa, ya que las EVs del comensal EcoR12 no presentaron este efecto. Xin Dai et al. (2015) demostraron una correlación inversa entre PepT1 y miR-193a-3p en tejido de colon inflamado de pacientes con colitis ulcerosa activa, revelando que miR-193a-3p reduce la expresión y actividad de PepT1, lo que lleva a la posterior supresión de la vía NF-κB [285]. Por otro lado, las EVs de ambas cepas previnieron la regulación negativa de miR-92b inducida por IL-1β. Los niveles relativos de expresión de miR-92b y su gen diana PepT1 se mantuvieron similares a los de las células control no tratadas.

Al analizar los efectos de las EVs de EcN y EcoR12 sobre la regulación de PepT1 por el sustrato bacteriano natural Tri-DAP, observamos que las EVs de ambas cepas impidieron la regulación negativa mediada por Tri-DAP de miR-193a-3p y miR-92b. Sin

embargo, las EVs de la cepa probiótica no regularon positivamente miR-193a-3p. Esto sugiere que las EVs de EcN no modulan la expresión de PepT1 en condiciones basales, pero pueden desempeñar un papel fundamental como respuesta a la inflamación. Anteriormente señalamos la capacidad de las EVs de EcN para modular genes y miRNAs relacionados con el sistema serotoninérgico, solo en condiciones inflamatorias [381]. Curiosamente, estudios recientes también han demostrado que las EVs afectan la expresión de los miRNA en la EII. La regulación a la baja o al alza de ciertos miRNAs en presencia de EVs no solo controla la progresión de la EII, sino que también mejora la inflamación. Por ejemplo, Shuchun Wei et al. (2023) demostraron que las EVs de *Fusobacterium nucleatum* promueven la colitis mediante la modulación de la autofagia a través del eje miR-574-5p/CARD3 [382]. Por su parte, Lingyan Ma et al. (2023) demostraron el efecto antiinflamatorio de las EVs derivadas de *Clostridium butyricum* en la colitis ulcerosa al restaurar la expresión de miR-199a-3p [383]. Además, la regulación negativa de miR-193a-3p en la EII se ha relacionado con la promoción del cáncer colorrectal asociado a colitis [379,384] que actúa sobre los mRNA diana del receptor D de interleucina-17 (IL-17RD) y el plasminógeno activador de la uroquinasa (PLAU). IL-17RD es un regulador multifuncional de receptores inmunes y vías de señalización inflamatoria [385], mientras que PLAU participa en la migración de células cancerosas y la angiogénesis [384]. En este contexto, la regulación positiva de miR-193a-3p por EVs de EcN puede tener efectos beneficiosos adicionales en la prevención de la aparición y progresión del cáncer en el colon con inflamación crónica.

Es importante destacar que la microbiota intestinal desempeña un papel esencial en el entrenamiento del sistema inmunológico innato, el cual debe reconocer y generar rápidamente respuestas inflamatorias contra los patógenos. La captación de Tri-DAP a través de PepT1 indujo una respuesta proinflamatoria con mayor producción de IL-8 y TNF-α. Este hallazgo fue consistente con el reconocimiento de Tri-DAP por los receptores NOD citosólicos y la posterior activación de NF-KB [275]. La respuesta inflamatoria no fue contrarrestada por EVs de EcN o EcoR12. De hecho, el tratamiento con EVs de ambas cepas también desencadenó la expresión y secreción de las

citocinas proinflamatorias IL-8 y TNF-α. En este contexto, habíamos demostrado previamente que las EVs derivadas por la microbiota comensal son internalizadas por las células epiteliales intestinales a través de endocitosis e interactúan con NOD1 en el compartimento endosómico [121]. Dado que la expresión colónica de PepT1 en condiciones normales es mínima, la endocitosis de las EVs de la microbiota proporciona un mecanismo de entrega de peptidoglicano en el citosol y la detección de productos microbianos, lo que prepara constantemente al sistema inmunológico innato.

Este estudio demuestra que las EVs del probiótico EcN mejoran la inflamación en las células epiteliales intestinales mediante la regulación positiva de miR-193a-3p y la consiguiente regulación negativa de la proteína PepT1. Este efecto se activa solo en presencia de mediadores inflamatorios, lo que sugiere que las EVs de EcN pueden reducir la inflamación intestinal en la EII y otros trastornos inflamatorios crónicos al limitar la entrada de péptidos bacterianos proinflamatorios.

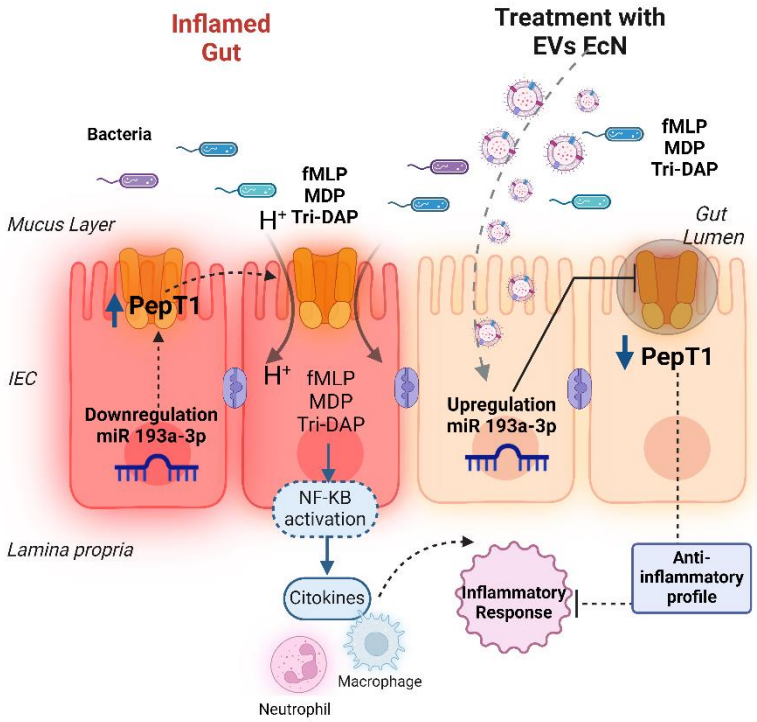


Figura 18. Resumen grafico de los aportes relevantes acorde con el **capítulo 3** de esta tesis.

6.4. Comentarios finales y perspectivas futuras

Esta tesis aporta nuevos conocimientos sobre los mecanismos moleculares utilizados por las EVs de la microbiota para modular genes y miRNAs desregulados en la EII. En este sentido, hemos demostrado que las EVs del probiótico EcN promueven la reparación de la mucosa intestinal y mantienen la permeabilidad al modular la expresión del péptido TFF3 y su miRNA regulador, miR-7-5p. Además, contrarrestan la expresión alterada de 5-HT y PepT1 en condiciones inflamatorias por diferentes mecanismos que incluyen la activación de vías de señalización y reguladores postranscripcionales como los miRNAs.

Los principales hallazgos se resumen en la Figura 18. Las EVs de EcN aumentan la expresión del péptido TFF3 mediante la activación de TLR2, la vía de señalización PI3K y regulación negativa de miR-7-5p. Este incremento en la expresión de TFF3 favorece la migración celular, promueve la restitución de la integridad celular y fortalece la barrera epitelial intestinal, procesos alterados en la EII. La alteración en los niveles de serotonina también se ha asociado con la EII debido a su papel en la homeostasis intestinal, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. La microbiota y los mediadores inflamatorios modulan los genes implicados en su regulación, y los niveles alterados de serotonina afectan la permeabilidad de la barrera intestinal, la inflamación y el equilibrio de la microbiota. En este contexto, las EVs de EcN atenúan las alteraciones inducidas por la inflamación a través de diferente mecanismos, tales como: disminuir la biodisponibilidad de 5-HT a través de incrementar la expresión de SERT, mediante regulación de las vías de señalización TLR4 y NOD1 y regulación positiva de miR-24 y miR200a. Finalmente, las EVs de EcN regulan positivamente a miR193a-3p que conduce a una diminución de la expresión de la proteína PepT1. En todos los casos las EVs de EcN regularon la expresión de citocinas hacia un perfil antinflamatorio.

La relación entre la microbiota intestinal y la EII ha impulsado el desarrollo de nuevas estrategias nutricionales y terapéuticas dirigidas al microbioma. En este contexto, los postbióticos emergen como nueva opción terapéutica. Nuestros hallazgos indican que las EVs del probiótico EcN tienen un potencial significativo como postbiótico en el tratamiento de la EII por su capacidad de restaurar la homeostasis intestinal a varios niveles. Por un lado, promueven un perfil antiinflamatorio por regulación de los

receptores inmunes TLR4 y NOD1, biodisponibilidad de serotonina y expresión del transportador PepT1 involucrado en la entrada de péptidos bacterianos con actividad proinflamatoria. Por otro lado, mejoran la función y reparación de la barrera intestinal, a través de la regulación de MUC2, TFF3 y proteínas de unión estrecha. Sin embargo, es necesario realizar estudios en modelos *in vivo,* así como ensayos clínicos, para validar los resultados obtenidos y asegurar una mayor evidencia científica que conduzca a conclusiones robustas y extrapolables al estado actual del campo de investigación relacionado con el uso de postbióticos como tratamiento de EII.

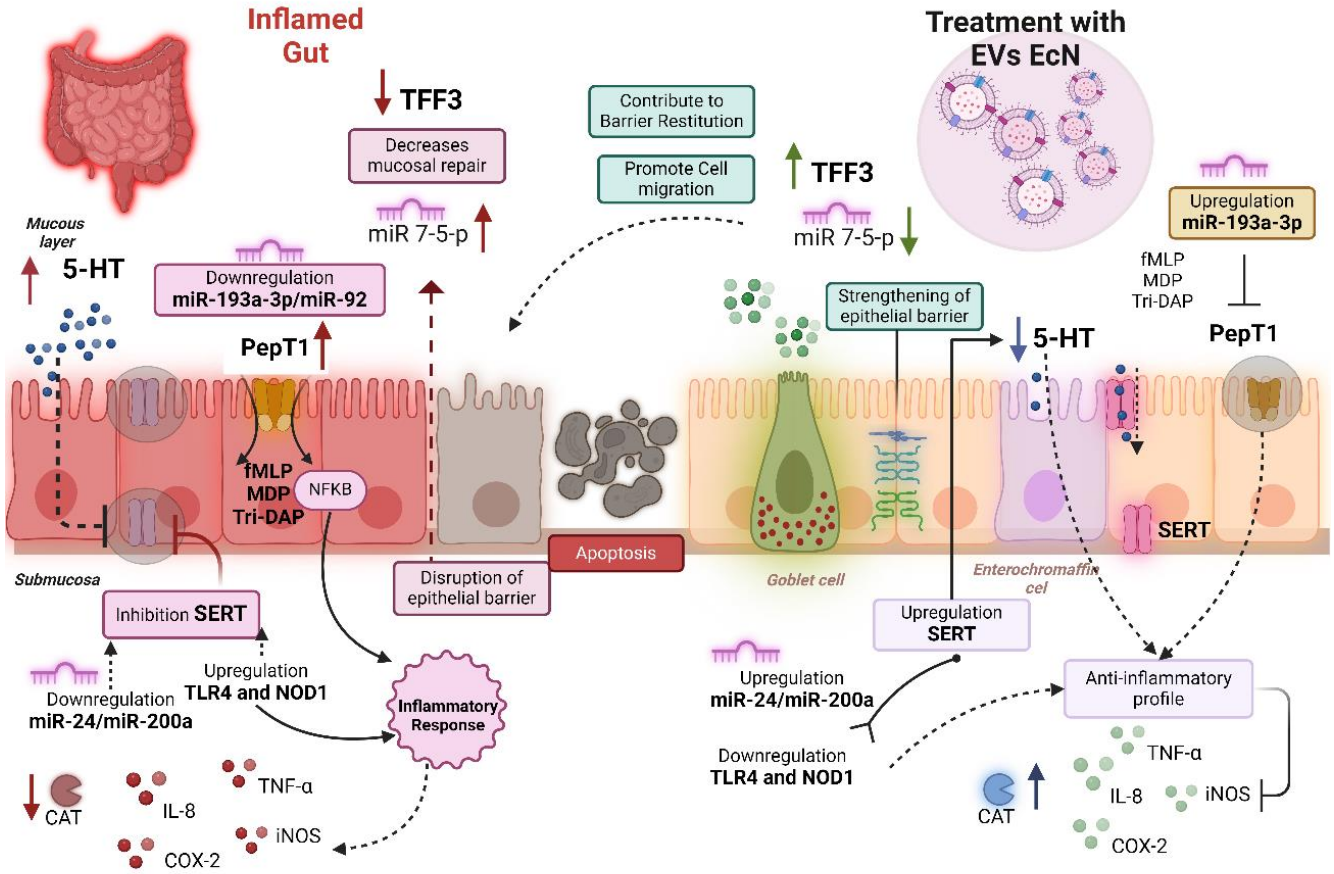
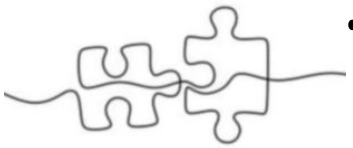


Figura 19. Resumen gráfico de los aportes relevantes de este trabajo de tesis.

El panel izquierdo muestra las alteraciones observadas en el epitelio intestinal inflamado de los genes evaluados (TFF3, 5-HT, SERT, PepT1) y sus miRNAs reguladores (miR 7-5-p, miR-24/miR-200a, miR-193a-3p/miR-92), que desencadenan una respuesta inflamatoria exacerbada y contribuye a la patología de la EII. El panel derecho demuestra el efecto modulador de las EVs de EcN sobre los genes evaluados y sus miRNAs reguladores. El aumento en la expresión de TFF3, aumento de la proteína de recaptación SERT y la disminución en la expresión de 5-HT y PepT-1, modulados por EVs de EcN, favorecen un perfil antinflamatorio, fortalecen la barrera epitelial y mantienen la homeostasis intestinal.



7. CONCLUSIONES

7.1. CAPITULO 1. Modulación de la integridad y reparación de la barrera intestinal por EVs de la microbiota mediante la regulación diferencial de TFF3 en células caliciformes LS174T.

1. Las EVs del probiótico EcN estimulan la síntesis del péptido TFF3 en células LS174T a través de la activación de TLR2, e inhiben la expresión de miR-7-5p a través de la vía de PI3K. Contrariamente, las EVs de EcoR12 no regulan los niveles de TFF3 y activan la expresión de miR-7-5p mediante un mecanismo que no involucra la vía de señalización PI3K.
2. Las EVs de EcN refuerzan la barrera epitelial intestinal a través de la activación de TFF3 en células calciformes, el cual, una vez secretado, activa la expresión de proteínas de unión estrecha en los enterocitos.
3. A través de la activación de TFF3 en células caliciformes, las EVs de EcN favorecen de manera indirecta la curación de heridas (restitución de la barrera epitelial) promoviendo la proliferación y migración celular en un modelo de células Caco-2
4. Los efectos indirectos sobre células de epitelio intestinal, a través de la secreción aumentada de TFF3 no son mediados por las EVs del comensal EcoR12.

7.2. CAPÍTULO 2. Modulación de genes relacionados con la serotonina mediante EVs del probiótico *Escherichia coli* Nissle 1917 en un modelo de inflamación inducida por IL-1β en células epiteliales intestinales.

1. En condiciones fisiológicas, las EVs de ambas cepas regulan la biodisponibilidad de serotonina intestinal mediante el aumento de la expresión de la proteína de recaptación SERT.
2. En condiciones de inflamación, las EVs del probiótico EcN y del comensal EcoR12 regulan de manera diferencial la biodisponibilidad de serotonina. Solo las EVs de EcN contrarrestan los altos niveles de serotonina liberados en estas condiciones a través de varios mecanismos reguladores, que implican la regulación negativa de la expresión de los micro-RNAs miR-24 y miR-200a, así como de los receptores TLR4 y NOD1.

3. Respecto al estrés oxidativo y disrupción de la barrera epitelial causados por la citocina IL-1β, solo las EVs de EcN presentan efectos antioxidantes y de refuerzo de barrera. En concreto, el tratamiento con EVs de este probiótico previene el incremento en la expresión de las enzimas proinflamatorias iNOS y COX2, e incrementa la expresión de proteínas de unión estrecha.

7.3. CAPÍTULO 3. Extracellular vesicles of the probiotic Escherichia coli Nissle 1917 reduce PepT1 levels in IL-1β-treated Caco-2 cells via upregulation of miR-193a-3p.

1. Las EVs de EcN inhiben la expresión de PepT1 en un modelo de inflamación intestinal a través de un mecanismo que implica la regulación positiva de miR-193a-3p. Este mecanismo es específico de cepa y no es activado en condiciones basales.

CONCLUSIÓN GLOBAL

Los resultados de esta tesis proporcionan evidencias sobre los mecanismos activados por las EVs del probiótico EcN en células de epitelio intestinal que dan soporte a su potencial uso como postbiótico en la EII, actuando a varios niveles para restaurar la homeostasis intestinal:

1. Refuerzo y reparación de la barrera epitelial a través de la regulación de TFF3/miR-7-5p,
2. Disminución de los niveles de serotonina a través de la regulación de SERT a nivel transcripcional (NOD1 y TLR4) y postranscripcional (miR-24 and miR-200a).
3. Atenuación del estrés oxidativo a través de la regulación génica de enzimas proinflamatorios (COX2 e iNOS) y antioxidantes (SOD y CAT).
4. Captación reducida de péptidos bacterianos proinflamatorios responsables de la respuesta exacerbada a la microbiota intestinal a través de la inhibición de PepT1 por activación de miR-193a-3p



8. REFERENCIAS

[1] Ocansey DKW, Zhang L, Wang Y, Yan Y, Qian H, Zhang X, et al. Exosome-mediated effects and applications in inflammatory bowel disease. Biological Reviews 2020;95. https://doi.org/10.1111/brv.12608.

[2] Cai Z, Wang S, Li J. Treatment of Inflammatory Bowel Disease: A Comprehensive Review. Front Med (Lausanne) 2021;8:1–24. https://doi.org/10.3389/fmed.2021.765474.

[3] Weimers P, Munkholm P. The Natural History of IBD: Lessons Learned. Curr Treat Options Gastroenterol 2018;16. https://doi.org/10.1007/s11938-018-0173-3.

[4] Alatab S, Sepanlou SG, Ikuta K, Vahedi H, Bisignano C, Safiri S, et al. The global, regional, and national burden of inflammatory bowel disease in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. Lancet Gastroenterol Hepatol 2020;5. https://doi.org/10.1016/S2468-1253(19)30333-4.

[5] Mak WY, Zhao M, Ng SC, Burisch J. The epidemiology of inflammatory bowel disease: East meets west. Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia) 2020;35. https://doi.org/10.1111/jgh.14872.

[6] Cosnes J, Gowerrousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. Gastroenterology 2011;140. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.01.055.

[7] El Hadad J, Schreiner P, Vavricka SR, Greuter T. The Genetics of Inflammatory Bowel Disease. Mol Diagn Ther 2024;28. https://doi.org/10.1007/s40291-023-00678-7.

[8] Cooney R, Baker J, Brain O, Danis B, Pichulik T, Allan P, et al. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. Nat Med 2010;16. https://doi.org/10.1038/nm.2069.

[9] 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. https://doi.org/10.1038/nature11582.

[10] Travassos LH, Carneiro LAM, Ramjeet M, Hussey S, Kim YG, Magalhes JG, et al. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. Nat Immunol 2010;11. https://doi.org/10.1038/ni.1823.

[11] McCarroll SA, Huett A, Kuballa P, Chilewski SD, Landry A, Goyette P, et al. Deletion polymorphism upstream of IRGM associated with altered IRGM expression and Crohn's disease. Nat Genet 2008;40. https://doi.org/10.1038/ng.215.

[12] Song L, Zhou R, Huang S, Zhou F, Xu S, Wang W, et al. High intestinal and systemic levels of interleukin-23/T-helper 17 pathway in Chinese patients with inflammatory bowel disease. Mediators Inflamm 2013;2013. https://doi.org/10.1155/2013/425915.

[13] Lee SH, Kwon J eun, Cho M La. Immunological pathogenesis of inflammatory bowel disease. Intest Res 2018;16. https://doi.org/10.5217/ir.2018.16.1.26.

[14] Lees CW, Barrett JC, Parkes M, Satsangi J. New IBD genetics: Common pathways with other diseases. Gut 2011;60. https://doi.org/10.1136/gut.2009.199679.

[15] Piovani D, Pansieri C, Kotha SRR, Piazza AC, Comberg CL, Peyrin-Biroulet L, et al. Ethnic Differences in the Smoking-related Risk of Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. J Crohns Colitis 2021;15. https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjab047.

[16] Leslie WD, Miller N, Rogala L, Bernstein CN. Vitamin D status and bone density in recently diagnosed inflammatory bowel disease: The Manitoba IBD Cohort Study. American Journal of Gastroenterology 2008;103. https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2007.01753.x.

[17] Cantorna MT, Munsick C, Bemiss C, Mahon BD. 1,25-Dihydroxycholecalciferol prevents and ameliorates symptoms of experimental murine inflammatory bowel disease. Journal of Nutrition 2000;130. https://doi.org/10.1093/jn/130.11.2648.

[18] Ananthakrishnan AN, Higuchi LM, Huang ES, Khalili H, Richter JM, Fuchs CS, et al. Aspirin, nonsteroidal anti-inflammatory drug use, and risk for crohn disease and ulcerative colitis. Ann Intern Med 2012;156. https://doi.org/10.7326/0003-4819-156-5-201203060-00007.

[19] Shaw SY, Blanchard JF, Bernstein CN. Association between the use of antibiotics in the first year of life and pediatric inflammatory bowel disease. American Journal of Gastroenterology 2010;105. https://doi.org/10.1038/ajg.2010.398.

[20] Black J, Sweeney L, Yuan Y, Singh H, Norton C, Czuber-Dochan W. Systematic review: the role of psychological stress in inflammatory bowel disease. Aliment Pharmacol Ther 2022;56. https://doi.org/10.1111/apt.17202.

[21] Faria AMC, Mucida D, McCafferty DM, Tsuji NM, Verhasselt V. Tolerance and inflammation at the gut mucosa. Clin Dev Immunol 2012;2012. https://doi.org/10.1155/2012/738475.

[22] Silva FAR, Rodrigues BL, Ayrizono MDLS, Leal RF. The Immunological Basis of Inflammatory Bowel Disease. Gastroenterol Res Pract 2016;2016. https://doi.org/10.1155/2016/2097274.

[23] De Mattos BRR, Garcia MPG, Nogueira JB, Paiatto LN, Albuquerque CG, Souza CL, et al. Inflammatory bowel disease: An overview of immune mechanisms and biological treatments. Mediators Inflamm 2015;2015. https://doi.org/10.1155/2015/493012.

[24] Hisamatsu T, Kanai T, Mikami Y, Yoneno K, Matsuoka K, Hibi T. Immune aspects of the pathogenesis of inflammatory bowel disease. Pharmacol Ther 2013;137. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.10.008.

[25] Lu Q, Yang MF, Liang YJ, Xu J, Xu HM, Nie YQ, et al. Immunology of Inflammatory Bowel Disease: Molecular Mechanisms and Therapeutics. J Inflamm Res 2022;15. https://doi.org/10.2147/JIR.S353038.

[26] Saez A, Herrero-Fernandez B, Gomez-Bris R, Sánchez-Martinez H, Gonzalez-Granado JM. Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease: Innate Immune System. Int J Mol Sci 2023;24. https://doi.org/10.3390/ijms24021526.

[27] Layunta E, Buey B, Mesonero JE, Latorre E. Crosstalk Between Intestinal Serotonergic System and Pattern Recognition Receptors on the Microbiota–Gut–Brain Axis. Front Endocrinol (Lausanne) 2021;12. https://doi.org/10.3389/fendo.2021.748254.

[28] Cario E. Toll-like receptors in inflammatory bowel diseases: A decade later. Inflamm Bowel Dis 2010;16. https://doi.org/10.1002/ibd.21282.

[29] Lauro ML, Burch JM, Grimes CL. The effect of NOD2 on the microbiota in Crohn's disease. Curr Opin Biotechnol 2016;40. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.02.028.

[30] Abraham C, Cho JH. Functional consequences of NOD2 (CARD15) mutations. Inflamm Bowel Dis 2006;12. https://doi.org/10.1097/01.MIB.0000225332.83861.5f.

[31] Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. Front Immunol 2014;5. https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00461.

[32] Shmuel-Galia L, Aychek T, Fink A, Porat Z, Zarmi B, Bernshtein B, et al. Neutralization of pro-inflammatory monocytes by targeting TLR2 dimerization ameliorates colitis. EMBO J 2016;35. https://doi.org/10.15252/embj.201592649.

[33] Morgan ME, Koelink PJ, Zheng B, Den Brok MHMGM, Van De Kant HJ, Verspaget HW, et al. Toll-like receptor 6 stimulation promotes T-helper 1 and 17 responses in gastrointestinal-associated lymphoid tissue and modulates murine experimental colitis. Mucosal Immunol 2014;7. https://doi.org/10.1038/mi.2014.16.

[34] McKernan DP, Finn DP. An appealing new therapeutic for ulcerative colitis? Gut 2014;63. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-305929.

[35] Kmieć Z, Cyman M, Ślebioda TJ. Cells of the innate and adaptive immunity and their interactions in inflammatory bowel disease. Adv Med Sci 2017;62. https://doi.org/10.1016/j.advms.2016.09.001.

[36] Dikiy S, Rudensky AY. Principles of regulatory T cell function. Immunity 2023;56. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2023.01.004.

[37] Biancheri P, Di Sabatino A, Ammoscato F, Facciotti F, Caprioli F, Curciarello R, et al. Absence of a role for interleukin-13 in inflammatory bowel disease. Eur J Immunol 2014;44. https://doi.org/10.1002/eji.201343524.

[38] Di Sabatino A, Biancheri P, Rovedatti L, MacDonald TT, Corazza GR. New pathogenic paradigms in inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis 2012;18. https://doi.org/10.1002/ibd.21735.

[39] Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: Regulators of barrier function and immune homeostasis. Nat Rev Immunol 2014;14. https://doi.org/10.1038/nri3608.

[40] Moschen AR, Tilg H, Raine T. IL-12, IL-23 and IL-17 in IBD: immunobiology and therapeutic targeting. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2019;16. https://doi.org/10.1038/s41575-018-0084-8.

[41] Sugihara T, Kobori A, Imaeda H, Tsujikawa T, Amagase K, Takeuchi K, et al. The increased mucosal mRNA expressions of complement C3 and interleukin-17 in inflammatory bowel disease. Clin Exp Immunol 2010;160. https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04093.x.

[42] Geremia A, Jewell DP. The IL-23/IL-17 pathway in inflammatory bowel disease. Expert Rev Gastroenterol Hepatol 2012;6. https://doi.org/10.1586/egh.11.107.

[43] Greenwood-Van Meerveld B, Johnson AC, Grundy D. Gastrointestinal physiology and function. Handb Exp Pharmacol 2017;239. https://doi.org/10.1007/164_2016_118.

[44] Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature 2010;464. https://doi.org/10.1038/nature08821.

[45] Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. PLoS Biol 2016;14. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533.

[46] Hou K, Wu ZX, Chen XY, Wang JQ, Zhang D, Xiao C, et al. Microbiota in health and diseases. Signal Transduct Target Ther 2022;7. https://doi.org/10.1038/s41392-022-00974-4.

[47] Caballero S, Pamer EG. Microbiota-mediated inflammation and antimicrobial defense in the intestine. Annu Rev Immunol 2015;33. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120238.

[48] Guinane CM, Cotter PD. Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: Understanding a hidden metabolic organ. Therap Adv Gastroenterol 2013;6. https://doi.org/10.1177/1756283X13482996.

[49] Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. Gut biogeography of the bacterial microbiota. Nat Rev Microbiol 2016;14:20–32. https://doi.org/10.1038/nrmicro3552.

[50] Horrocks V, King OG, Yip AYG, Marques IM, McDonald JAK. Role of the gut microbiota in nutrient competition and protection against intestinal pathogen colonization. Microbiology (United Kingdom) 2023;169. https://doi.org/10.1099/mic.0.001377.

[51] Zhao M, Chu J, Feng S, Guo C, Xue B, He K, et al. Immunological mechanisms of inflammatory diseases caused by gut microbiota dysbiosis: A review. Biomedicine and Pharmacotherapy 2023;164. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114985.

[52] Pickard JM, Zeng MY, Caruso R, Núñez G. Gut microbiota: Role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. Immunol Rev 2017;279. https://doi.org/10.1111/imr.12567.

[53] Tang H, Huang W, Yao YF. The metabolites of lactic acid bacteria: classification, biosynthesis and modulation of gut microbiota. Microbial Cell 2023;10. https://doi.org/10.15698/mic2023.03.792.

[54] Ariyoshi T, Hagihara M, Takahashi M, Mikamo H. Effect of Clostridium butyricum on Gastrointestinal Infections. Biomedicines 2022;10. https://doi.org/10.3390/biomedicines10020483.

[55] Benítez-Chao DF, León-Buitimea A, Lerma-Escalera JA, Morones-Ramírez JR. Bacteriocins: An Overview of Antimicrobial, Toxicity, and Biosafety Assessment by in vivo Models. Front Microbiol 2021;12. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.630695.

[56] Darbandi A, Asadi A, Mahdizade Ari M, Ohadi E, Talebi M, Halaj Zadeh M, et al. Bacteriocins: Properties and potential use as antimicrobials. J Clin Lab Anal 2022;36. https://doi.org/10.1002/jcla.24093.

[57] Lin L, Zhang J. Role of intestinal microbiota and metabolites on gut homeostasis and human diseases. BMC Immunol 2017;18. https://doi.org/10.1186/s12865-016-0187-3.

[58] Chairatana P, Nolan EM. Defensins, lectins, mucins, and secretory immunoglobulin A: microbe-binding biomolecules that contribute to mucosal immunity in the human gut. Crit Rev Biochem Mol Biol 2017;52. https://doi.org/10.1080/10409238.2016.1243654.

[59] Gieryńska M, Szulc-Dąbrowska L, Struzik J, Mielcarska MB, Gregorczyk-Zboroch KP. Integrity of the Intestinal Barrier: The Involvement of Epithelial Cells and Microbiota—A Mutual Relationship. Animals 2022;12. https://doi.org/10.3390/ani12020145.

[60] Reading NC, Kasper DL. The starting lineup: Key microbial players in intestinal immunity and homeostasis. Front Microbiol 2011;2. https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00148.

[61] Zafar H, Saier MH. Gut Bacteroides species in health and disease. Gut Microbes 2021;13. https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1848158.

[62] Pabst O, Slack E. IgA and the intestinal microbiota: the importance of being specific. Mucosal Immunol 2020;13. https://doi.org/10.1038/s41385-019-0227-4.

[63] Brandtzaeg P. Secretory IgA: Designed for anti-microbial defense. Front Immunol 2013;4. https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00222.

[64] Song C, Chai Z, Chen S, Zhang H, Zhang X, Zhou Y. Intestinal mucus components and secretion mechanisms: what we do and do not know. Exp Mol Med 2023;55. https://doi.org/10.1038/s12276-023-00960-y.

[65] Tezuka H, Ohteki T. Regulation of IgA production by intestinal dendritic cells and related cells. Front Immunol 2019;10. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01891.

[66] Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, Burcelin R, Gibson G, Jia W, et al. Host-gut microbiota metabolic interactions. Science (1979) 2012;336. https://doi.org/10.1126/science.1223813.

[67] Sonnenburg JL, Bäckhed F. Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism. Nature 2016;535. https://doi.org/10.1038/nature18846.

[68] Rooks MG, Garrett WS. Gut microbiota, metabolites and host immunity. Nat Rev Immunol 2016;16:341–52. https://doi.org/10.1038/nri.2016.42.

[69] Zhang D, Jian YP, Zhang YN, Li Y, Gu LT, Sun HH, et al. Short-chain fatty acids in diseases. Cell Communication and Signaling 2023;21. https://doi.org/10.1186/s12964-023-01219-9.

[70] Yue X, Wen S, Long-kun D, Man Y, Chang S, Min Z, et al. Three important short-chain fatty acids (SCFAs) attenuate the inflammatory response induced by 5-FU and maintain the integrity of intestinal mucosal tight junction. BMC Immunol 2022;23. https://doi.org/10.1186/s12865-022-00495-3.

[71] Schulthess J, Pandey S, Capitani M, Rue-Albrecht KC, Arnold I, Franchini F, et al. The Short Chain Fatty Acid Butyrate Imprints an Antimicrobial Program in Macrophages. Immunity 2019;50. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.12.018.

[72] Tan JK, Macia L, Mackay CR. Dietary fiber and SCFAs in the regulation of mucosal immunity. Journal of Allergy and Clinical Immunology 2023;151. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2022.11.007.

[73] Vinolo MAR, Rodrigues HG, Hatanaka E, Sato FT, Sampaio SC, Curi R. Suppressive effect of short-chain fatty acids on production of proinflammatory mediators by neutrophils. Journal of Nutritional Biochemistry 2011;22. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.07.009.

[74] Yan Q, Jia S, Li D, Yang J. The role and mechanism of action of microbiota-derived short-chain fatty acids in neutrophils: From the activation to becoming potential biomarkers. Biomedicine and Pharmacotherapy 2023;169:115821. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115821.

[75] Venegas DP, De La Fuente MK, Landskron G, González MJ, Quera R, Dijkstra G, et al. Short chain fatty acids (SCFAs)mediated gut epithelial and immune regulation and its relevance for inflammatory bowel diseases. Front Immunol 2019;10. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00277.

[76] Bauché D, Marie JC. Transforming growth factor β: A master regulator of the gut microbiota and immune cell interactions. Clin Transl Immunology 2017;6. https://doi.org/10.1038/cti.2017.9.

[77] Corrêa-Oliveira R, Fachi JL, Vieira A, Sato FT, Vinolo MAR. Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. Clin Transl Immunology 2016;5. https://doi.org/10.1038/cti.2016.17.

[78] Chen F, Wu W, Cong Y. Short chain fatty acids regulation of neutrophil production of IL-10. The Journal of Immunology 2016;196. https://doi.org/10.4049/jimmunol.196.supp.207.6.

[79] Sun M, Wu W, Liu Z, Cong Y. Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases. J Gastroenterol 2017;52. https://doi.org/10.1007/s00535-016-1242-9.

[80] Seljeset S, Siehler S. Receptor-specific regulation of ERK1/2 activation by members of the “free fatty acid receptor” family. Journal of Receptors and Signal Transduction 2012;32. https://doi.org/10.3109/10799893.2012.692118.

[81] Dai Z, Wu Z, Hang S, Zhu W, Wu G. Amino acid metabolism in intestinal bacteria and its potential implications for mammalian reproduction. Mol Hum Reprod 2014;21. https://doi.org/10.1093/molehr/gav003.

[82] Blachier F. Amino Acid-Derived Bacterial Metabolites in the Colorectal Luminal Fluid: Effects on Microbial Communication, Metabolism, Physiology, and Growth. Microorganisms 2023;11. https://doi.org/10.3390/microorganisms11051317.

[83] Rowland I, Gibson G, Heinken A, Scott K, Swann J, Thiele I, et al. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. Eur J Nutr 2018;57. https://doi.org/10.1007/s00394-017-1445-8.

[84] Yan H, Chen Y, Zhu H, Huang WH, Cai XH, Li D, et al. The Relationship Among Intestinal Bacteria, Vitamin K and Response of Vitamin K Antagonist: A Review of Evidence and Potential Mechanism. Front Med (Lausanne) 2022;9. https://doi.org/10.3389/fmed.2022.829304.

[85] D'Aimmo MR, Modesto M, Mattarelli P, Biavati B, Andlid T. Biosynthesis and cellular content of folate in bifidobacteria across host species with different diets. Anaerobe 2014;30. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.09.018.

[86] Juarez del Valle M, Laiño JE, Savoy de Giori G, LeBlanc JG. Riboflavin producing lactic acid bacteria as a biotechnological strategy to obtain bio-enriched soymilk. Food Research International 2014;62. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.029.

[87] LeBlanc JG, Milani C, de Giori GS, Sesma F, van Sinderen D, Ventura M. Bacteria as vitamin suppliers to their host: A gut microbiota perspective. Curr Opin Biotechnol 2013;24. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.08.005.

[88] Brown EM, Clardy J, Xavier RJ. Gut microbiome lipid metabolism and its impact on host physiology. Cell Host Microbe 2023;31. https://doi.org/10.1016/j.chom.2023.01.009.

[89] Cheng Y, Ling Z, Li L. The Intestinal Microbiota and Colorectal Cancer. Front Immunol 2020;11. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.615056.

[90] Arboleya S, Watkins C, Stanton C, Ross RP. Gut bifidobacteria populations in human health and aging. Front Microbiol 2016;7. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01204.

[91] Markowiak-Kopeć P, Śliżewska K. The effect of probiotics on the production of short-chain fatty acids by human intestinal microbiome. Nutrients 2020;12. https://doi.org/10.3390/nu12041107.

[92] Xiao S, Jiang S, Qian D, Duan J. Modulation of microbially derived short-chain fatty acids on intestinal homeostasis, metabolism, and neuropsychiatric disorder. Appl Microbiol Biotechnol 2020;104. https://doi.org/10.1007/s00253-019-10312-4.

[93] Koh A, De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Bäckhed F. From dietary fiber to host physiology: Short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. Cell 2016;165. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.041.

[94] Xiong RG, Zhou DD, Wu SX, Huang SY, Saimaiti A, Yang ZJ, et al. Health Benefits and Side Effects of Short-Chain Fatty Acids. Foods 2022;11. https://doi.org/10.3390/foods11182863.

[95] Guzior D V., Quinn RA. Review: microbial transformations of human bile acids. Microbiome 2021;9. https://doi.org/10.1186/s40168-021-01101-1.

[96] Ramírez-Pérez O, Cruz-Ramón V, Chinchilla-López P, Méndez-Sánchez N. The role of the gut microbiota in bile acid metabolism. Ann Hepatol 2017;16. https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.5494.

[97] Majait S, Nieuwdorp M, Kemper M, Soeters M. The Black Box Orchestra of Gut Bacteria and Bile Acids: Who Is the Conductor? Int J Mol Sci 2023;24. https://doi.org/10.3390/ijms24031816.

[98] Urdaneta V, Casadesús J. Interactions between bacteria and bile salts in the gastrointestinal and hepatobiliary tracts. Front Med (Lausanne) 2017;4. https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00163.

[99] Kurihara S. Polyamine metabolism and transport in gut microbes. Biosci Biotechnol Biochem 2022;86. https://doi.org/10.1093/bbb/zbac080.

[100] Barone M, D'Amico F, Brigidi P, Turroni S. Gut microbiome–micronutrient interaction: The key to controlling the bioavailability of minerals and vitamins? BioFactors 2022;48. https://doi.org/10.1002/biof.1835.

[101] Hering NA, Richter JF, Fromm A, Wieser A, Hartmann S, Günzel D, et al. TcpC protein from E. coli Nissle improves epithelial barrier function involving PKCζ and ERK1/2 signaling in HT-29/B6 cells. Mucosal Immunol 2014;7. https://doi.org/10.1038/mi.2013.55.

[102] Jandhyala SM. Role of the normal gut microbiota. World J Gastroenterol 2015;21:8787–803. https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i29.8787.

[103] Stappenbeck TS, Hooper L V., Gordon JI. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99. https://doi.org/10.1073/pnas.202604299.

[104] Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB, et al. Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. Proc Natl Acad Sci U S A 2013;110. https://doi.org/10.1073/pnas.1219451110.

[105] Cobo ER, Kissoon-Singh V, Moreau F, Chadee K. Colonic MUC2 mucin regulates the expression and antimicrobial activity of β-defensin 2. Mucosal Immunol 2015;8. https://doi.org/10.1038/mi.2015.27.

[106] Díaz-Garrido N, Badia J, Baldomà L. Microbiota-derived extracellular vesicles in interkingdom communication in the gut. J Extracell Vesicles 2021;10:1–29. https://doi.org/10.1002/jev2.12161.

[107] Cheng H, Guan X, Chen D, Ma W. The th17/treg cell balance: A gut microbiota-modulated story. Microorganisms 2019;7. https://doi.org/10.3390/microorganisms7120583.

[108] Mayorgas A, Dotti I, Salas A. Microbial Metabolites, Postbiotics, and Intestinal Epithelial Function. Mol Nutr Food Res 2021;65:1–17. https://doi.org/10.1002/mnfr.202000188.

[109] Postler TS, Ghosh S. Understanding the Holobiont: How Microbial Metabolites Affect Human Health and Shape the Immune System. Cell Metab 2017;26. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.05.008.

[110] Bunker JJ, Bendelac A. IgA Responses to Microbiota. Immunity 2018;49. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.08.011.

[111] Bosco N, Noti M. The aging gut microbiome and its impact on host immunity. Genes Immun 2021;22. https://doi.org/10.1038/s41435-021-00126-8.

[112] Luo Y, Zeng B, Zeng L, Du X, Li B, Huo R, et al. Gut microbiota regulates mouse behaviors through glucocorticoid receptor pathway genes in the hippocampus. Transl Psychiatry 2018;8. https://doi.org/10.1038/s41398-018-0240-5.

[113] Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. Nature 2011;474:307–17. https://doi.org/10.1038/nature10209.

[114] Caruso R, Lo BC, Núñez G. Host–microbiota interactions in inflammatory bowel disease. Nat Rev Immunol 2020;20. https://doi.org/10.1038/s41577-019-0268-7.

[115] 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. https://doi.org/10.1136/gut.2010.223263.

[116] Andoh A, Imaeda H, Aomatsu T, Inatomi O, Bamba S, Sasaki M, et al. Comparison of the fecal microbiota profiles between ulcerative colitis and Crohn's disease using terminal restriction fragment length polymorphism analysis. J Gastroenterol 2011;46. https://doi.org/10.1007/s00535-010-0368-4.

[117] Martinez C, Antolin M, Santos J, Torrejon A, Casellas F, Borruel N, et al. Unstable composition of the fecal microbiota in ulcerative colitis during clinical remission. American Journal of Gastroenterology 2008;103. https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2007.01592.x.

[118] Lopez-Siles M, Martinez-Medina M, Busquets D, Sabat-Mir M, Duncan SH, Flint HJ, et al. Mucosa-associated Faecalibacterium prausnitzii and Escherichia coli co-abundance can distinguish Irritable Bowel Syndrome and Inflammatory Bowel Disease phenotypes. International Journal of Medical Microbiology 2014;304. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.02.009.

[119] Frank DN, St. Amand AL, Feldman RA, 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. https://doi.org/10.1073/pnas.0706625104.

[120] Patten DA, Hussein E, Davies SP, Humphreys PN, Collett A. Commensal-derived OMVs elicit a mild proinflammatory response in intestinal epithelial cells. Microbiology (United Kingdom) 2017;163. https://doi.org/10.1099/mic.0.000468.

[121] Cañas M-A, Giménez R, Fábrega M-J, Toloza L, Baldomà L, Badia J. Outer Membrane Vesicles from the Probiotic Escherichia coli Nissle 1917 and the Commensal ECOR12 Enter Intestinal Epithelial Cells via Clathrin-Dependent Endocytosis and Elicit Differential Effects on DNA Damage. PLoS One 2016;11:1–22. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160374.

[122] Bielaszewska M, Marejková M, Bauwens A, Kunsmann-Prokscha L, Mellmann A, Karch H. Enterohemorrhagic Escherichia coli O157 outer membrane vesicles induce interleukin 8 production in human intestinal epithelial cells by signaling via Toll-like receptors TLR4 and TLR5 and activation of the nuclear factor NF-κB. International Journal of Medical Microbiology 2018;308. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.06.004.

[123] R.M. R, L.G. B-H, F. C, J. L, P. B, J.J. G, et al. Protective and curative effect of faecalibacterium prausnitzii in a chronic DNBS-induced murine colitis. Gastroenterology 2012;142.

[124] Morgan XC, Tickle TL, Sokol H, Gevers D, Devaney KL, Ward D V., et al. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. Genome Biol 2012;13. https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-9-r79.

[125] Lane ER, Zisman TL, Suskind DL. The microbiota in inflammatory bowel disease: Current and therapeutic insights. J Inflamm Res 2017;10. https://doi.org/10.2147/JIR.S116088.

[126] Colonic T, Homeostasis C, Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, et al. The Microbial Metabolites, Short-Chain Fatty Acids, Regulate Colonic Treg Cell Homeostasis. Science (1979) 2013;341.

[127] Mazmanian SK, Round JL, Kasper DL. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. Nature 2008;453. https://doi.org/10.1038/nature07008.

[128] Franzosa EA, Sirota-Madi A, Avila-Pacheco J, Fornelos N, Haiser HJ, Reinker S, et al. Gut microbiome structure and metabolic activity in inflammatory bowel disease. Nat Microbiol 2019;4. https://doi.org/10.1038/s41564-018-0306-4.

[129] Ng SC, Ananthakrishnan AN. New approaches along the IBD course: diet, tight control and stem cells. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2019;16. https://doi.org/10.1038/s41575-018-0088-4.

[130] Lewis JD, Chen EZ, Baldassano RN, Otley AR, Griffiths AM, Lee D, et al. Inflammation, Antibiotics, and Diet as Environmental Stressors of the Gut Microbiome in Pediatric Crohn's Disease. Cell Host Microbe 2015;18. https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.09.008.

[131] Tsilingiri K, Barbosa T, Penna G, Caprioli F, Sonzogni A, Viale G, et al. Probiotic and postbiotic activity in health and disease: Comparison on a novel polarised ex-vivo organ culture model. Gut 2012;61. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-300971.

[132] Paramsothy S, Paramsothy R, Rubin DT, Kamm MA, Kaakoush NO, Mitchell HM, et al. Faecal microbiota transplantation for inflammatory bowel disease: A systematic review and meta-analysis. J Crohns Colitis 2017;11. https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjx063.

[133] Gomollón F, Dignass A, Annese V, Tilg H, Van Assche G, Lindsay JO, et al. 3rd European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease 2016: Part 1: Diagnosis and medical management. J Crohns Colitis 2017;11. https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjw168.

[134] Sandefur K, Kahleova H, Desmond AN, Elfrink E, Barnard ND. Crohn's disease remission with a plant-based diet: A case report. Nutrients 2019;11. https://doi.org/10.3390/nu11061385.

[135] Malham M, Hess S, Nielsen RG, Husby S, Høilund-Carlsen PF. PET/CT in the diagnosis of inflammatory bowel disease in pediatric patients: a review. Am J Nucl Med Mol Imaging 2014;4.

[136] Panes J, Bouhnik Y, Reinisch W, Stoker J, Taylor SA, Baumgart DC, et al. Imaging techniques for assessment of inflammatory bowel disease: Joint ECCO and ESGAR evidence-based consensus guidelines. J Crohns Colitis 2013;7. https://doi.org/10.1016/j.crohns.2013.02.020.

[137] Iwasa R, Yamada A, Sono K, Furukawa R, Takeuchi K, Suzuki Y. C-reactive protein level at 2 weeks following initiation of infliximab induction therapy predicts outcomes in patients with ulcerative colitis: A 3 year follow-up study. BMC Gastroenterol 2015;15. https://doi.org/10.1186/s12876-015-0333-z.

[138] Mokhtarifar A, Ganji A, Sadrneshin M, Bahari A, Esmaeilzadeh A, Ghafarzadegan K, et al. Diagnostic Value of ASCA and Atypical p-ANCA in Differential Diagnosis of Inflammatory Bowel Disease. Middle East J Dig Dis 2013;5.

[139] Avdagić N, Babić N, Šeremet M, Delić-Šarac M, Drače Z, Denjalić A, et al. Tumor necrosis factor-alpha serum level in assessment of disease activity in inflammatory bowel diseases. Med Glas (Zenica) 2013;10.

[140] Horiuchi T, Mitoma H, Harashima SI, Tsukamoto H, Shimoda T. Transmembrane TNF-α: Structure, function and interaction with anti-TNF agents. Rheumatology 2010;49. https://doi.org/10.1093/rheumatology/keq031.

[141] Wei HX, Wang B, Li B. IL-10 and IL-22 in Mucosal Immunity: Driving Protection and Pathology. Front Immunol 2020;11. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01315.

[142] Baranipour S, Kadijani AA, Qujeq D, Shahrokh S, Haghazali M, Mirzaei A, et al. Inducible nitric oxide synthase as a potential blood-based biomarker in inflammatory bowel diseases. Gastroenterol Hepatol Bed Bench 2018;11.

[143] Penna FGC, Rosa RM, Pereira FH, Cunha PFS, Sousa SCS, Ferrari TCA, et al. Combined evaluation of fecal calprotectin and C-reactive protein as a therapeutic target in the management of patients with Crohn's disease. Gastroenterol Hepatol 2021;44. https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2020.04.015.

[144] Stankovic B, Dragasevic S, Popovic D, Zukic B, Kotur N, Sokic-Milutinovic A, et al. Variations in inflammatory genes as molecular markers for prediction of inflammatory bowel disease occurrence. J Dig Dis 2015;16. https://doi.org/10.1111/1751-2980.12281.

[145] Neurath MF. New targets for mucosal healing and therapy in inflammatory bowel diseases. Mucosal Immunol 2014;7. https://doi.org/10.1038/mi.2013.73.

[146] Oh-oka K, Kojima Y, Uchida K, Yoda K, Ishimaru K, Nakajima S, et al. Induction of Colonic Regulatory T Cells by Mesalamine by Activating the Aryl Hydrocarbon Receptor. CMGH 2017;4. https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2017.03.010.

[147] Murray A, Nguyen TM, Parker CE, Feagan BG, MacDonald JK. Oral 5-aminosalicylic acid for induction of remission in ulcerative colitis. Cochrane Database of Systematic Reviews 2020;2020. https://doi.org/10.1002/14651858.CD000543.pub5.

[148] Ou G, Bressler B, Galorport C, Lam E, Ko HH, Enns R, et al. Rate of Corticosteroid-Induced Mood Changes in Patients with Inflammatory Bowel Disease: A Prospective Study. J Can Assoc Gastroenterol 2018;1. https://doi.org/10.1093/jcag/gwy023.

[149] Coward S, Kuenzig ME, Hazlewood G, Clement F, McBrien K, Holmes R, et al. Comparative Effectiveness of Mesalamine, Sulfasalazine, Corticosteroids, and Budesonide for the Induction of Remission in Crohn's Disease: A Bayesian Network Meta-Analysis. Inflamm Bowel Dis 2017;23. https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000001023.

[150] Shin JY, Wey M, Umutesi HG, Sun X, Simecka J, Heo J. Thiopurine prodrugs mediate immunosuppressive effects by interfering with Rac1 protein function. Journal of Biological Chemistry 2016;291. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.694422.

[151] Jharap B, Seinen ML, De Boer NKH, Van Ginkel JR, Linskens RK, Kneppelhout JC, et al. Thiopurine therapy in inflammatory bowel disease patients: Analyses of two 8-year intercept cohorts. Inflamm Bowel Dis 2010;16. https://doi.org/10.1002/ibd.21221.

[152] Dubinsky MC, Vasiliauskas EA, Singh H, Abreu MT, Papadakis KA, Tran T, et al. 6-Thioguanine can cause serious liver injury in inflammatory bowel disease patients. Gastroenterology 2003;125. https://doi.org/10.1016/S0016-5085(03)00938-7.

[153] Van Dieren JM, Kuipers EJ, Samsom JN, Nieuwenhuis EE, Van Der Woude CJ. Revisiting the immunomodulators tacrolimus, methotrexate, and mycophenolate mofetil: Their mechanisms of action and role in the treatment of IBD. Inflamm Bowel Dis 2006;12. https://doi.org/10.1097/01.MIB.0000209787.19952.53.

[154] Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. Blood 2012;119. https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-325225.

[155] Yarur AJ, Rubin DT. Therapeutic drug monitoring of anti-tumor necrosis factor agents in patients with inflammatory bowel diseases. Inflamm Bowel Dis 2015;21. https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000380.

[156] Adegbola SO, Sahnan K, Warusavitarne J, Hart A, Tozer P. Anti-TNF therapy in Crohn's disease. Int J Mol Sci 2018;19. https://doi.org/10.3390/ijms19082244.

[157] Martineau C, Flourié B, Wils P, Vaysse T, Altwegg R, Buisson A, et al. Efficacy and safety of golimumab in Crohn's disease: a French national retrospective study. Aliment Pharmacol Ther 2017;46. https://doi.org/10.1111/apt.14371.

[158] Wyant T, Fedyk E, Abhyankar B. An overview of the mechanism of action of the monoclonal antibody vedolizumab. J Crohns Colitis 2016;10. https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjw092.

[159] Tang MT, Keir ME, Erickson R, Stefanich EG, Fuh FK, Ramirez-Montagut T, et al. Review article: nonclinical and clinical pharmacology, pharmacokinetics and pharmacodynamics of etrolizumab, an anti-β7 integrin therapy for inflammatory bowel disease. Aliment Pharmacol Ther 2018;47. https://doi.org/10.1111/apt.14631.

[160] Sandborn WJ, Ghosh S, Panes J, Schreiber S, D'Haens G, Tanida S, et al. Efficacy of Upadacitinib in a Randomized Trial of Patients With Active Ulcerative Colitis. Gastroenterology 2020;158. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.02.030.

[161] Wegh CAM, Geerlings SY, Knol J, Roeselers G, Belzer C. Postbiotics and Their Potential Applications in Early Life Nutrition and Beyond. International Journal of Molecular Sciences 2019, Vol 20, Page 4673 2019;20:4673. https://doi.org/10.3390/IJMS20194673.

[162] Thorakkattu P, Khanashyam AC, Shah K, Babu KS, Mundanat AS, Deliephan A, et al. Postbiotics: Current Trends in Food and Pharmaceutical Industry. Foods 2022, Vol 11, Page 3094 2022;11:3094. https://doi.org/10.3390/FOODS11193094.

[163] De Filippis F, Esposito A, Ercolini D. Outlook on next-generation probiotics from the human gut. Cellular and Molecular Life Sciences 2022;79:14–8. https://doi.org/10.1007/s00018-021-04080-6.

[164] Ma L, Tu H, Chen T. Postbiotics in Human Health: A Narrative Review. Nutrients 2023;15:1–17. https://doi.org/10.3390/nu15020291.

[165] Okumura R, Takeda K. Roles of intestinal epithelial cells in the maintenance of gut homeostasis. Exp Mol Med 2017;49:e338–45. https://doi.org/10.1038/emm.2017.20.

[166] Olivares-Villagómez D, Van Kaer L. Intestinal Intraepithelial Lymphocytes: Sentinels of the Mucosal Barrier. Trends Immunol 2018;39. https://doi.org/10.1016/j.it.2017.11.003.

[167] Kalló G, Kumar A, Tőzsér J, Csősz É. Chemical Barrier Proteins in Human Body Fluids. Biomedicines 2022;10. https://doi.org/10.3390/biomedicines10071472.

[168] Jarczak J, Kościuczuk EM, Lisowski P, Strzałkowska N, Jóźwik A, Horbańczuk J, et al. Defensins: Natural component of human innate immunity. Hum Immunol 2013;74. https://doi.org/10.1016/j.humimm.2013.05.008.

[169] Mantis NJ, Rol N, Corthésy B. Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. Mucosal Immunol 2011;4. https://doi.org/10.1038/mi.2011.41.

[170] Tropini C, Earle KA, Huang KC, Sonnenburg JL. The Gut Microbiome: Connecting Spatial Organization to Function. Cell Host Microbe 2017;21. https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.03.010.

[171] Albert TK, Laubinger W, Müller S, Hanisch FG, Kalinski T, Meyer F, et al. Human intestinal TFF3 forms disulfide-linked heteromers with the mucus-associated FCGBP protein and is released by hydrogen sulfide. J Proteome Res 2010;9. https://doi.org/10.1021/pr100020c.

[172] Burgueño JF, Abreu MT. Epithelial Toll-like receptors and their role in gut homeostasis and disease. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2020;17. https://doi.org/10.1038/s41575-019-0261-4.

[173] Alvarez C-S, Badia J, Bosch M, Giménez R, Baldomà L. Outer Membrane Vesicles and Soluble Factors Released by Probiotic Escherichia coli Nissle 1917 and Commensal ECOR63 Enhance Barrier Function by Regulating Expression of Tight Junction Proteins in Intestinal Epithelial Cells. Front Microbiol 2016;7:1–14. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01981.

[174] Raleigh DR, Marchiando AM, Zhang Y, Shen L, Sasaki H, Wang Y, et al. Tight junction-associated MARVEL proteins marvelD3, tricellulin, and occludin have distinct but overlapping functions. Mol Biol Cell 2010;21. https://doi.org/10.1091/mbc.E09-08-0734.

[175] Bauer H, Zweimueller-Mayer J, Steinbacher P, Lametschwandtner A, Bauer HC. The dual role of zonula occludens (ZO) proteins. J Biomed Biotechnol 2010;2010. https://doi.org/10.1155/2010/402593.

[176] Neunlist M, Van Landeghem L, Mahé MM, Derkinderen P, Des Varannes SB, Rolli-Derkinderen M. The digestive neuronal-glial-epithelial unit: A new actor in gut health and disease. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2013;10. https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.221.

[177] Bhat AA, Uppada S, Achkar IW, Hashem S, Yadav SK, Shanmugakonar M, et al. Tight junction proteins and signaling pathways in cancer and inflammation: A functional crosstalk. Front Physiol 2019;10. https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01942.

[178] Quigley EMM. Leaky gut-concept or clinical entity? Curr Opin Gastroenterol 2016;32. https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000243.

[179] Salim SY, Söderholm JD. Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. Inflamm Bowel Dis 2011;17. https://doi.org/10.1002/ibd.21403.

[180] Antoni L, Nuding S, Wehkamp J, Stange EF. Intestinal barrier in inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol 2014;20. https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i5.1165.

[181] Lee JY, Wasinger VC, Yau YY, Chuang E, Yajnik V, Leong RWL. Molecular pathophysiology of epithelial barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. Proteomes 2018;6. https://doi.org/10.3390/PROTEOMES6020017.

[182] Hirota SA, Ng J, Lueng A, Khajah M, Parhar K, Li Y, et al. NLRP3 inflammasome plays a key role in the regulation of intestinal homeostasis. Inflamm Bowel Dis 2011;17. https://doi.org/10.1002/ibd.21478.

[183] Camilleri M, Madsen K, Spiller R, Van Meerveld BG, Verne GN. Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. Neurogastroenterology and Motility 2012;24. https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2012.01921.x.

[184] Larsson JMH, Karlsson H, Crespo JG, Johansson MEV, Eklund L, Sjövall H, et al. Altered O-glycosylation profile of MUC2 mucin occurs in active ulcerative colitis and

is associated with increased inflammation. Inflamm Bowel Dis 2011;17. https://doi.org/10.1002/ibd.21625.

[185] Dunleavy KA, Raffals LE, Camilleri M. Intestinal Barrier Dysfunction in Inflammatory Bowel Disease: Underpinning Pathogenesis and Therapeutics. Dig Dis Sci 2023;68. https://doi.org/10.1007/s10620-023-08122-w.

[186] Sheedy FJ, Palsson-Mcdermott E, Hennessy EJ, Martin C, O'Leary JJ, Ruan Q, et al. Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. Nat Immunol 2010;11. https://doi.org/10.1038/ni.1828.

[187] 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. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.07.040.

[188] Ye D, Guo S, Alsadi R, Ma TY. MicroRNA regulation of intestinal epithelial tight junction permeability. Gastroenterology 2011;141. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.07.005.

[189] Fasseu M, Tréton X, Guichard C, Pedruzzi E, Cazals-Hatem D, Richard C, et al. Identification of restricted subsets of mature microRNA abnormally expressed in inactive colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. PLoS One 2010;5. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013160.

[190] Wang S, Huang Y, Zhou C, Wu H, Zhao J, Wu L, et al. The role of autophagy and related microRNAs in inflammatory bowel disease. Gastroenterol Res Pract 2018;2018. https://doi.org/10.1155/2018/7565076.

[191] 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. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.09.006.

[192] 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. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.035.

[193] Chuang AY, Chuang JC, Zhai Z, Wu F, Kwon JH. NOD2 expression is regulated by microRNAs in colonic epithelial HCT116 cells. Inflamm Bowel Dis 2014;20. https://doi.org/10.1097/01.MIB.0000436954.70596.9b.

[194] Chen J, Chen ZJ. Regulation of NF-kappaB by ubiquitination. Curr Opin Immunol 2013;25.

[195] Koukos G, Polytarchou C, Kaplan JL, Morley-Fletcher A, Gras-Miralles B, Kokkotou E, et al. MicroRNA-124 regulates STAT3 expression and is down-regulated in colon

tissues of pediatric patients with ulcerative colitis. Gastroenterology 2013;145. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.07.001.

[196] Chen Y, Xiao Y, Ge W, Zhou K, Wen J, Yan W, et al. MiR-200b inhibits TGF-β1-induced epithelial-mesenchymal transition and promotes growth of intestinal epithelial cells. Cell Death Dis 2013;4. https://doi.org/10.1038/cddis.2013.22.

[197] Zhang L, Shen J, Cheng J, Fan X. MicroRNA-21 regulates intestinal epithelial tight junction permeability. Cell Biochem Funct 2015;33. https://doi.org/10.1002/cbf.3109.

[198] O'Carroll D, Schaefer A. General principals of miRNA biogenesis and regulation in the brain. Neuropsychopharmacology 2013;38. https://doi.org/10.1038/npp.2012.87.

[199] Braga Emidio N, Brierley SM, Schroeder CI, Muttenthaler M. Structure, Function, and Therapeutic Potential of the Trefoil Factor Family in the Gastrointestinal Tract. ACS Pharmacol Transl Sci 2020;3. https://doi.org/10.1021/acsptsci.0c00023.

[200] Aihara E, Engevik KA, Montrose MH. Trefoil Factor Peptides and Gastrointestinal Function. Annu Rev Physiol 2017;79. https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105447.

[201] Martini E, Krug SM, Siegmund B, Neurath MF, Becker C. Mend Your Fences: The Epithelial Barrier and its Relationship With Mucosal Immunity in Inflammatory Bowel Disease. CMGH 2017;4. https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2017.03.007.

[202] Sturm A, Dignass AU. Epithelial restitution and wound healing in inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol 2008;14. https://doi.org/10.3748/wjg.14.348.

[203] Carrasco R, Pera M, May FEB, Westley BR, Martinez A, Morales L. Trefoil factor family peptide 3 prevents the development and promotes healing of ischemia-reperfusion injury in weanling rats. J Pediatr Surg 2004;39. https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2004.07.017.

[204] Gloushankova NA, Rubtsova SN, Zhitnyak IY. Cadherin-mediated cell-cell interactions in normal and cancer cells. Tissue Barriers 2017;5. https://doi.org/10.1080/21688370.2017.1356900.

[205] Buda A, Jepson MA, Pignatelli M. Regulatory function of trefoil peptides (TFF) on intestinal cell junctional complexes. Cell Commun Adhes 2012;19. https://doi.org/10.3109/15419061.2012.748326.

[206] Lau WH, Pandey V, Kong X, Wang XN, Wu Z, Zhu T, et al. Trefoil factor-3 (TFF3) stimulates de novo angiogenesis in mammary carcinoma both directly and indirectly via IL-8/CXCR2. PLoS One 2015;10. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141947.

[207] Xu LF, Teng X, Guo J, Sun M. Protective effect of intestinal trefoil factor on injury of intestinal epithelial tight junction induced by platelet activating factor. Inflammation 2012;35. https://doi.org/10.1007/s10753-011-9320-x.

[208] Wu X, Conlin VS, Morampudi V, Ryz NR, Nasser Y, Bhinder G, et al. Vasoactive intestinal polypeptide promotes intestinal barrier homeostasis and protection against colitis in mice. PLoS One 2015;10. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125225.

[209] Dieckow J, Brandt W, Hattermann K, Schob S, Schulze U, Mentlein R, et al. CXCR4 and CXCR7 mediate TFF3-induced cell migration independently from the ERK1/2 signaling pathway. Invest Ophthalmol Vis Sci 2016;57. https://doi.org/10.1167/iovs.15-18129.

[210] Sun Z, Liu H, Yang Z, Shao D, Zhang W, Ren Y, et al. Intestinal trefoil factor activates the PI3K/Akt signaling pathway to protect gastric mucosal epithelium from damage. Int J Oncol 2014;45:1123–32. https://doi.org/10.3892/IJO.2014.2527/HTML.

[211] Yang Y, Lin Z, Lin Q, Bei W, Guo J. Pathological and therapeutic roles of bioactive peptide trefoil factor 3 in diverse diseases: recent progress and perspective. Cell Death Dis 2022;13. https://doi.org/10.1038/s41419-022-04504-6.

[212] Taupin D, Podolsky DK. Trefoil factors: Initiators of mucosal healing. Nat Rev Mol Cell Biol 2003;4. https://doi.org/10.1038/nrm1203.

[213] Hoffmann W. Trefoil Factor Family (TFF) Peptides and their Different Roles in the Mucosal Innate Immune Defense and More: An Update. Curr Med Chem 2021;28. https://doi.org/10.2174/0929867328666210215114140.

[214] Hoffmann W. Trefoil factor family (Tff) peptides and their links to inflammation: A re-evaluation and new medical perspectives. Int J Mol Sci 2021;22. https://doi.org/10.3390/ijms22094909.

[215] Vilchez-Vargas R, Salm F, Znalesniak EB, Haupenthal K, Schanze D, Zenker M, et al. Profiling of the Bacterial Microbiota along the Murine Alimentary Tract. Int J Mol Sci 2022;23. https://doi.org/10.3390/ijms23031783.

[216] Bergstrom KSB, Guttman JA, Rumi M, Ma C, Bouzari S, Khan MA, et al. Modulation of intestinal goblet cell function during infection by an attaching and effacing bacterial pathogen. Infect Immun 2008;76. https://doi.org/10.1128/IAI.00093-07.

[217] Heitkemper MM, Cain KC, Shulman RJ, Burr RL, Ko C, Hollister EB, et al. Stool and urine trefoil factor 3 levels: Associations with symptoms, intestinal permeability, and microbial diversity in irritable bowel syndrome. Benef Microbes 2018;9. https://doi.org/10.3920/bm2017.0059.

[218] Podolsky DK, Gerken G, Eyking A, Cario E. Colitis-Associated Variant of TLR2 Causes Impaired Mucosal Repair Because of TFF3 Deficiency. Gastroenterology 2009;137:209–20. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.03.007.

[219] Lozano-Pérez AA, Rodriguez-Nogales A, Ortiz-Cullera V, Algieri F, Garrido-Mesa J, Zorrilla P, et al. Silk fibroin nanoparticles constitute a vector for controlled release of resveratrol in an experimental model of inflammatory bowel disease in rats. Int J Nanomedicine 2014;9. https://doi.org/10.2147/IJN.S68526.

[220] Guo J, Sun M, Teng X, Xu L. MicroRNA-7-5p regulates the expression of TFF3 in inflammatory bowel disease. Mol Med Rep 2017;16:1200–6. https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6730.

[221] Baydi Z, Limami Y, Khalki L, Zaid N, Naya A, Mtairag EM, et al. An Update of Research Animal Models of Inflammatory Bowel Disease. Scientific World Journal 2021;2021. https://doi.org/10.1155/2021/7479540.

[222] Hoffmann W. Trefoil Factor Family (TFF) Peptides and Chemokine Receptors: A Promising Relationship. J Med Chem 2009;52:6505–10. https://doi.org/10.1021/jm9008136.

[223] Shi L, Zhou PH, Xi JL, Yu HG, Zhang BH. Recombinant human trefoil factor 3 ameliorates bowel injury: Its anti-inflammatory effect on experimental necrotizing enterocolitis. Int J Pept 2014;2014. https://doi.org/10.1155/2014/634135.

[224] Teng X, Xu LF, Zhou P, Sun HW, Sun M. Effects of trefoil peptide 3 on expression of TNF-α, TLR4, and NF-κB in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis mice. Inflammation 2009;32. https://doi.org/10.1007/s10753-009-9110-x.

[225] Podolsky DK, Gerken G, Eyking A, Cario E. Colitis-Associated Variant of TLR2 Causes Impaired Mucosal Repair Because of TFF3 Deficiency. Gastroenterology 2009;137. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.03.007.

[226] Fábrega M-J, Rodríguez-Nogales A, Garrido-Mesa J, Algieri F, Badía J, Giménez R, et al. Intestinal Anti-inflammatory Effects of Outer Membrane Vesicles from Escherichia coli Nissle 1917 in DSS-Experimental Colitis in Mice. Front Microbiol 2017;8:1–13. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01274.

[227] Barrera GJ, Sanchez G, Gonzalez JE. Trefoil factor 3 isolated from human breast milk downregulates cytokines (IL8 and IL6) and promotes human beta defensin (hBD2 and hBD4) expression in intestinal epithelial cells HT-29. Bosn J Basic Med Sci 2012;12. https://doi.org/10.17305/bjbms.2012.2448.

[228] Lin N, Xu L fen, Sun M. The protective effect of trefoil factor 3 on the intestinal tight junction barrier is mediated by toll-like receptor 2 via a PI3K/Akt dependent mechanism. Biochem Biophys Res Commun 2013;440. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.09.049.

[229] Meyer zum Büschenfelde D, Tauber R, Huber O. TFF3-peptide increases transepithelial resistance in epithelial cells by modulating claudin-1 and -2 expression. Peptides (NY) 2006;27. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.08.020.

[230] Mawe GM, Hoffman JM. Serotonin Signaling in the Gastrointestinal Tract:: Functions, dysfunctions, and therapeutic targets. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2013 2013;10.

[231] Koopman N, Katsavelis D, Ten Hove A, Brul S, de Jonge W, Seppen J. The Multifaceted Role of Serotonin in Intestinal Homeostasis. Int J Mol Sci 2021;22:9487. https://doi.org/10.3390/ijms22179487.

[232] Tidemand KD, Peters GH, Harris P, Stensgaard E, Christensen HEM. Isoform-Specific Substrate Inhibition Mechanism of Human Tryptophan Hydroxylase. Biochemistry 2017;56. https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00763.

[233] Yabut JM, Crane JD, Green AE, Keating DJ, Khan WI, Steinberg GR. Emerging Roles for Serotonin in Regulating Metabolism: New Implications for an Ancient Molecule. Endocr Rev 2019;40. https://doi.org/10.1210/er.2018-00283.

[234] Gershon MD. 5-Hydroxytryptamine (serotonin) in the gastrointestinal tract. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes 2013;20. https://doi.org/10.1097/MED.0b013e32835bc703.

[235] González Delgado S, Garza-Veloz I, Trejo-Vazquez F, Martinez-Fierro ML. Interplay between Serotonin, Immune Response, and Intestinal Dysbiosis in Inflammatory Bowel Disease. Int J Mol Sci 2022;23:1–24. https://doi.org/10.3390/ijms232415632.

[236] Cortes-Altamirano JL, Olmos-Hernandez A, Jaime HB, Carrillo-Mora P, Bandala C, Reyes-Long S, et al. Review: 5-HT1, 5-HT2, 5-HT3 and 5-HT7 Receptors and their Role in the Modulation of Pain Response in the Central Nervous System. Curr Neuropharmacol 2018;16. https://doi.org/10.2174/1570159x15666170911121027.

[237] Hoffman JM, Tyler K, MacEachern SJ, Balemba OB, Johnson AC, Brooks EM, et al. Activation of colonic mucosal 5-HT4 receptors accelerates propulsive motility and inhibits visceral hypersensitivity. Gastroenterology 2012;142. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.12.041.

[238] Gao K, Mu CL, Farzi A, Zhu WY. Tryptophan Metabolism: A Link between the Gut Microbiota and Brain. Advances in Nutrition 2020;11. https://doi.org/10.1093/advances/nmz127.

[239] Lamas B, Natividad JM, Sokol H. Aryl hydrocarbon receptor and intestinal immunity. Mucosal Immunol 2018;11:1024–38. https://doi.org/10.1038/s41385-018-0019-2.

[240] Reigstad CS, Salmonson CE, Rainey JF, Szurszewski JH, Linden DR, Sonnenburg JL, et al. Gut microbes promote colonic serotonin production through an effect of short-chain fatty acids on enterochromaffin cells. FASEB Journal 2015;29. https://doi.org/10.1096/fj.14-259598.

[241] Waclawiková B, El Aidy S. Role of microbiota and tryptophan metabolites in the remote effect of intestinal inflammation on brain and depression. Pharmaceuticals 2018;11. https://doi.org/10.3390/ph11030063.

[242] Kwon YH, Wang H, Denou E, Ghia JE, Rossi L, Fontes ME, et al. Modulation of Gut Microbiota Composition by Serotonin Signaling Influences Intestinal Immune Response and Susceptibility to Colitis. CMGH 2019;7:709–28. https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2019.01.004.

[243] Esmaili A, Nazir SF, Borthakur A, Yu D, Turner JR, Saksena S, et al. Enteropathogenic Escherichia coli Infection Inhibits Intestinal Serotonin Transporter Function and Expression. Gastroenterology 2009;137. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.09.002.

[244] Wang YM, Cao YN, Feng LJ, Liu YY, Jiang K, Zhang MJ, et al. Effect of Lactobacillus rhamnosus GG supernatant on serotonin transporter expression in rats with post-infectious irritable bowel syndrome. World J Gastroenterol 2018;24. https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i3.338.

[245] Singhal M, Turturice BA, Manzella CR, Ranjan R, Metwally AA, Theorell J, et al. Serotonin Transporter Deficiency is Associated with Dysbiosis and Changes in Metabolic Function of the Mouse Intestinal Microbiome. Sci Rep 2019;9. https://doi.org/10.1038/s41598-019-38489-8.

[246] Mendoza C, Matheus N, Iceta R, Mesonero JE, Alcalde AI. Lipopolysaccharide induces alteration of serotonin transporter in human intestinal epithelial cells. Innate Immun 2009;15. https://doi.org/10.1177/1753425909104781.

[247] Lyu D, Kou G, Li S, Li L, Li B, Zhou R, et al. Digital Spatial Profiling Reveals Functional Shift of Enterochromaffin Cell in Patients With Ulcerative Colitis. Front Cell Dev Biol 2022;10. https://doi.org/10.3389/fcell.2022.841090.

[248] Manzella CR, Jayawardena D, Pagani W, Li Y, Alrefai WA, Bauer J, et al. Serum serotonin differentiates between disease activity states in crohns patients. Inflamm Bowel Dis 2020;26. https://doi.org/10.1093/ibd/izaa208.

[249] Li N, Ghia JE, Wang H, McClemens J, Cote F, Suehiro Y, et al. Serotonin activates dendritic cell function in the context of gut inflammation. American Journal of Pathology 2011;178. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.10.028.

[250] Bischoff SC, Mailer R, Pabst O, Weier G, Sedlik W, Li Z, et al. Role of serotonin in intestinal inflammation: Knockout of serotonin reuptake transporter exacerbates 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid colitis in mice. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2009;296. https://doi.org/10.1152/ajpgi.90685.2008.

[251] Jørandli JW, Thorsvik S, Skovdahl HK, Kornfeld B, Sæterstad S, Gustafsson BI, et al. The serotonin reuptake transporter is reduced in the epithelium of active Crohn's disease and ulcerative colitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2020;319:761–8. https://doi.org/10.1152/AJPGI.00244.2020.

[252] Coates MD, Tekin I, Vrana KE, Mawe GM. Review Article: The Many Potential Roles of Intestinal Serotonin (5-Hydroxytryptamine, 5-HT) Signalling in Inflammatory Bowel Disease. Aliment Pharmacol Ther 2017;46:569–80. https://doi.org/10.1111/apt.14226.

[253] Terry N, Margolis KG. Serotonergic mechanisms regulating the GI tract: Experimental evidence and therapeutic relevance. Handb Exp Pharmacol 2017;239. https://doi.org/10.1007/164_2016_103.

[254] Spohn SN, Bianco F, Scott RB, Keenan CM, Linton AA, O'Neill CH, et al. Protective Actions of Epithelial 5-Hydroxytryptamine 4 Receptors in Normal and Inflamed Colon. Gastroenterology 2016;151. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.07.032.

[255] Guseva D, Holst K, Kaune B, Meier M, Keubler L, Glage S, et al. Serotonin 5-HT7 receptor is critically involved in acute and chronic inflammation of the gastrointestinal tract. Inflamm Bowel Dis 2014;20. https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000150.

[256] Shajib MS, Khan WI. The role of serotonin and its receptors in activation of immune responses and inflammation. Acta Physiologica 2015;213. https://doi.org/10.1111/apha.12430.

[257] Huang Y, Chen Z. Inflammatory bowel disease related innate immunity and adaptive immunity. Am J Transl Res 2016;8.

[258] Qasem A, Naser AE, Naser SA. Enteropathogenic infections modulate intestinal serotonin transporter (SERT) function by activating Toll-like receptor 2 (TLR-2) in Crohn's disease. Sci Rep 2021;11:1–14. https://doi.org/10.1038/s41598-021-02050-3.

[259] Layunta E, Latorre E, Forcén R, Grasa L, Castro M, Arias MA, et al. NOD2 modulates serotonin transporter and interacts with TLR2 and TLR4 in intestinal epithelial cells.

Cellular Physiology and Biochemistry 2018;47. https://doi.org/10.1159/000490218.

[260] Zahm AM, Hand NJ, Tsoucas DM, Le Guen CL, Baldassano RN, Friedman JR. Rectal microRNAs are perturbed in pediatric inflammatory bowel disease of the colon. J Crohns Colitis 2014;8. https://doi.org/10.1016/j.crohns.2014.02.012.

[261] Manzella C, Singhal M, Ackerman M, Alrefai WA, Saksena S, Dudeja PK, et al. Serotonin transporter untranslated regions influence mRNA abundance and protein expression. Gene Rep 2020;18. https://doi.org/10.1016/j.genrep.2019.100513.

[262] Liao XJ, Mao WM, Wang Q, Yang GG, Wu WJ, Shao SX. MicroRNA-24 inhibits serotonin reuptake transporter expression and aggravates irritable bowel syndrome. Biochem Biophys Res Commun 2016;469:288–93. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.11.102.

[263] Hou Q, Huang Y, Zhang C, Zhu S, Li P, Chen X, et al. MicroRNA-200a targets cannabinoid receptor 1 and serotonin transporter to increase visceral hyperalgesia in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome rats. J Neurogastroenterol Motil 2018;24:656–68. https://doi.org/10.5056/jnm18037.

[264] Bröer S, Fairweather SJ. Amino acid transport across the mammalian intestine. Compr Physiol 2019;9. https://doi.org/10.1002/cphy.c170041.

[265] Wang CY, Liu S, Xie XN, Tan ZR. Regulation profile of the intestinal peptide transporter 1 (PepT1). Drug Des Devel Ther 2017;11. https://doi.org/10.2147/DDDT.S151725.

[266] Beale JH, Parker JL, Samsudin F, Barrett AL, Senan A, Bird LE, et al. Crystal structures of the extracellular domain from PepT1 and PepT2 provide novel insights into mammalian peptide transport. Structure 2015;23. https://doi.org/10.1016/j.str.2015.07.016.

[267] Stauffer M, Jeckelmann JM, Ilgü H, Ucurum Z, Boggavarapu R, Fotiadis D. Peptide transporter structure reveals binding and action mechanism of a potent PEPT1 and PEPT2 inhibitor. Commun Chem 2022;5. https://doi.org/10.1038/s42004-022-00636-0.

[268] Viennois E, Pujada A, Zen J, Merlin D. Function, regulation, and pathophysiological relevance of the POT superfamily, specifically PepT1 in inflammatory bowel disease. Compr Physiol 2018;8. https://doi.org/10.1002/cphy.c170032.

[269] Wiśniewski JR, Friedrich A, Keller T, Mann M, Koepsell H. The impact of high-fat diet on metabolism and immune defense in small intestine mucosa. J Proteome Res 2015;14. https://doi.org/10.1021/pr500833v.

[270] Geillinger KE, Kipp AP, Schink K, Röder P V., Spanier B, Daniel H. Nrf2 regulates the expression of the peptide transporter PEPT1 in the human colon carcinoma cell line Caco-2. Biochim Biophys Acta Gen Subj 2014;1840. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.12.026.

[271] Inoue M, Terada T, Okuda M, Inui KI. Regulation of human peptide transporter 1 (PEPT1) in gastric cancer cells by anticancer drugs. Cancer Lett 2005;230. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.12.023.

[272] Pavlova I, Milanova A, Danova S, Fink-Gremmels J. Enrofloxacin and Probiotic Lactobacilli Influence PepT1 and LEAP-2 mRNA Expression in Poultry. Probiotics Antimicrob Proteins 2016;8. https://doi.org/10.1007/s12602-016-9225-y.

[273] Ingersoll SA, Ayyadurai S, Charania MA, Laroui H, Yan Y, Merlin D. The role and pathophysiological relevance of membrane transporter pept1 in intestinal inflammation and inflammatory bowel disease. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2012;302. https://doi.org/10.1152/ajpgi.00477.2011.

[274] Luo Y, Gao J, Jiang X, Zhu L, Zhou QT, Murray M, et al. Molecular Insights to the Structure-Interaction Relationships of Human Proton-Coupled Oligopeptide Transporters (PepTs). Pharmaceutics 2023;15. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15102517.

[275] Dalmasso G, Nguyen HTT, Charrier-Hisamuddin L, Yan Y, Laroui H, Demoulin B, et al. PepT1 mediates transport of the proinflammatory bacterial tripeptide L-Ala-γ-D-Glu-meso-DAP in intestinal epithelial cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2010;299. https://doi.org/10.1152/ajpgi.00527.2009.

[276] Dalmasso G, Nguyen HTT, Yan Y, Charrier-Hisamuddin L, Sitaraman S V., Merlin D. Butyrate transcriptionally enhances peptide transporter PepT1 expression and activity. PLoS One 2008;3. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002476.

[277] Viennois E, Pujada A, Sung J, Yang C, Gewirtz AT, Chassaing B, et al. Impact of PepT1 deletion on microbiota composition and colitis requires multiple generations. NPJ Biofilms Microbiomes 2020;6:27. https://doi.org/10.1038/s41522-020-0137-y.

[278] Viennois E, Ingersoll SA, Ayyadurai S, Zhao Y, Wang L, Zhang M, et al. Critical Role of PepT1 in Promoting Colitis-Associated Cancer and Therapeutic Benefits of the Anti-inflammatory PepT1-Mediated Tripeptide KPV in a Murine Model. CMGH 2016;2. https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2016.01.006.

[279] Sung J, Wang L, Long D, Yang C, Merlin D. PepT1-knockout mice harbor a protective metabolome beneficial for intestinal wound healing. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2021;320. https://doi.org/10.1152/AJPGI.00299.2020.

[280] Laroui H, Yan Y, Narui Y, Ingersoll SA, Ayyadurai S, Charania MA, et al. L-Ala-γ-D-Glu-meso-diaminopimelic acid (DAP) interacts directly with leucine-rich region domain

of nucleotide-binding oligomerization domain 1, increasing phosphorylation activity of receptor-interacting serine/threonine- protein kinase 2 and its interaction with nucleotide-binding oligomerization domain 1. Journal of Biological Chemistry 2011;286. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.257501.

[281] Caruso R, Warner N, Inohara N, Núñez G. NOD1 and NOD2: Signaling, host defense, and inflammatory disease. Immunity 2014;41. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.12.010.

[282] Dalmasso G, Nguyen HTT, Ingersoll SA, Ayyadurai S, Laroui H, Charania MA, et al. The PepT1-NOD2 signaling pathway aggravates induced colitis in mice. Gastroenterology 2011;141. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.06.080.

[283] Charrier L, Merlin D. The oligopeptide transporter hPepT1: Gateway to the innate immune response. Laboratory Investigation 2006;86. https://doi.org/10.1038/labinvest.3700423.

[284] Dalmasso G, Nguyen HTT, Yan Y, Laroui H, Charania MA, Obertone TS, et al. MicroRNA-92b regulates expression of the oligopeptide transporter PepT1 in intestinal epithelial cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2011;300. https://doi.org/10.1152/ajpgi.00394.2010.

[285] Dai X, Chen X, Chen Q, Shi L, Liang H, Zhou Z, et al. MicroRNA-193a-3p reduces intestinal inflammation in response to microbiota via down-regulation of colonic PepT1. Journal of Biological Chemistry 2015;290. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.659318.

[286] Jia K, Tong X, Wang R, Song X. The clinical effects of probiotics for inflammatory bowel disease. Medicine 2018;97:1–9. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000013792.

[287] Jacobi CA, Malfertheiner P. Escherichia coli nissle 1917 (Mutaflor): New insights into an old probiotic bacterium. Digestive Diseases 2011;29. https://doi.org/10.1159/000333307.

[288] Reister M, Hoffmeier K, Krezdorn N, Rotter B, Liang C, Rund S, et al. Complete genome sequence of the gram-negative probiotic escherichia coli strain Nissle 1917. J Biotechnol 2014;187. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.07.442.

[289] Garcia EC, Brumbaugh AR, Mobley HLT. Redundancy and specificity of Escherichia coli iron acquisition systems during urinary tract infection. Infect Immun 2011;79. https://doi.org/10.1128/IAI.01222-10.

[290] Scaldaferri F, Gerardi V, Mangiola F, Lopetuso LR, Pizzoferrato M, Petito V, et al. Role and mechanisms of action of Escherichia coli Nissle 1917 in the maintenance of remission in ulcerative colitis patients: An update. World J Gastroenterol 2016;22:5505–11. https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i24.5505.

[291] Troge A, Scheppach W, Schroeder BO, Rund SA, Heuner K, Wehkamp J, et al. More than a marine propeller- the flagellum of the probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917 is the major adhesin mediating binding to human mucus. International Journal of Medical Microbiology 2012;302. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2012.09.004.

[292] Behrouzi A, Mazaheri H, Falsafi S, Tavassol ZH, Moshiri A, Siadat SD. Intestinal effect of the probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917 and its OMV. J Diabetes Metab Disord 2020;19:597–604. https://doi.org/10.1007/s40200-020-00511-6.

[293] Lammers KM, Helwig U, Swennen E, Rizzello F, Venturi A, Caramelli E, et al. Effect of probiotic strains on interleukin 8 production by HT29/19A cells. American Journal of Gastroenterology 2002;97. https://doi.org/10.1016/S0002-9270(02)04049-2.

[294] Wehkamp J, Harder J, Wehkamp K, Wehkamp-Von Meissner B, Schlee M, Enders C, et al. NF-κB- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by Escherichia coli Nissle 1917: A novel effect of a probiotic bacterium. Infect Immun 2004;72. https://doi.org/10.1128/IAI.72.10.5750-5758.2004.

[295] Hafez M, Hayes K, Goldrick M, Grencis RK, Roberts IS. The K5 capsule of Escherichia coli strain nissle 1917 is important in stimulating expression of toll-like receptor 5, CD14, MyD88, and TRIF together with the induction of interleukin-8 expression via the mitogen-activated protein kinase pathway in epithelial cells. Infect Immun 2010;78. https://doi.org/10.1128/IAI.01406-09.

[296] Güttsches AK, Löseke S, Zähringer U, Sonnenborn U, Enders C, Gatermann S, et al. Anti-inflammatory modulation of immune response by probiotic Escherichia coli Nissle 1917 in human blood mononuclear cells. Innate Immun 2012;18. https://doi.org/10.1177/1753425910396251.

[297] Sonnenborn U, Schulze J. The non-pathogenic Escherichia coli strain Nissle 1917-features of a versatile probiotic. Microb Ecol Health Dis 2009;21. https://doi.org/10.3109/08910600903444267.

[298] Behnsen J, Deriu E, Sassone-Corsi M, Raffatellu M. Probiotics: Properties, examples, and specific applications. Cold Spring Harb Perspect Biol 2013;5. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010074.

[299] Souza ÉL, Elian SD, Paula LM, Garcia CC, Vieira AT, Teixeira MM, et al. Escherichia coli strain Nissle 1917 ameliorates experimental colitis by modulating intestinal permeability, the inflammatory response and clinical signs in a faecal transplantation model. J Med Microbiol 2016;65. https://doi.org/10.1099/jmm.0.000222.

[300] Rodríguez-Nogales A, Algieri F, Garrido-Mesa J, Vezza T, Utrilla MP, Chueca N, et al. The administration of Escherichia coli Nissle 1917 ameliorates development of DSS-induced colitis in mice. Front Pharmacol 2018;9. https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00468.

[301] Chen H, Lei P, Ji H, Yang Q, Peng B, Ma J, et al. Advances in Escherichia coli Nissle 1917 as a customizable drug delivery system for disease treatment and diagnosis strategies. Mater Today Bio 2023;18. https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2023.100543.

[302] Salminen S, Collado MC, Endo A, Hill C, Lebeer S, Quigley EMM, et al. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2021;18:649–67. https://doi.org/10.1038/s41575-021-00440-6.

[303] Żółkiewicz J, Marzec A, Ruszczyński M, Feleszko W. Postbiotics—a step beyond pre- and probiotics. Nutrients 2020;12. https://doi.org/10.3390/nu12082189.

[304] Nakamura F, Ishida Y, Sawada D, Ashida N, Sugawara T, Sakai M, et al. Fragmented Lactic Acid Bacterial Cells Activate Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Ameliorate Dyslipidemia in Obese Mice. J Agric Food Chem 2016;64. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05827.

[305] Shin HS, Park SY, Lee DK, Kim SA, An HM, Kim JR, et al. Hypocholesterolemic effect of sonication-killed Bifidobacterium longum isolated from healthy adult Koreans in high cholesterol fed rats. Arch Pharm Res 2010;33. https://doi.org/10.1007/s12272-010-0917-7.

[306] Compare D, Rocco A, Coccoli P, Angrisani D, Sgamato C, Iovine B, et al. Lactobacillus casei DG and its postbiotic reduce the inflammatory mucosal response: An ex-vivo organ culture model of post-infectious irritable bowel syndrome. BMC Gastroenterol 2017;17. https://doi.org/10.1186/s12876-017-0605-x.

[307] Zagato E, Mileti E, Massimiliano L, Fasano F, Budelli A, Penna G, et al. Lactobacillus paracasei CBA l74 metabolic products and fermented milk for infant formula have anti-inflammatory activity on dendritic cells in Vitro and protective effects against colitis and an enteric pathogen in Vivo. PLoS One 2014;9. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087615.

[308] Imperial ICVJ, Ibana JA. Addressing the antibiotic resistance problem with probiotics: Reducing the risk of its double-edged sword effect. Front Microbiol 2016;7. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01983.

[309] Zmora N, Zilberman-Schapira G, Suez J, Mor U, Dori-Bachash M, Bashiardes S, et al. Personalized Gut Mucosal Colonization Resistance to Empiric Probiotics Is Associated with Unique Host and Microbiome Features. Cell 2018;174. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.041.

[310] Aguilar-Toalá JE, Garcia-Varela R, Garcia HS, Mata-Haro V, González-Córdova AF, Vallejo-Cordoba B, et al. Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. Trends Food Sci Technol 2018;75. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.009.

[311] Lavelle A, Sokol H. Gut microbiota-derived metabolites as key actors in inflammatory bowel disease. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2020;17:223–37. https://doi.org/10.1038/s41575-019-0258-z.

[312] González-Lozano E, García-García J, Gálvez J, Hidalgo-García L, Rodríguez-Nogales A, Rodríguez-Cabezas ME, et al. Novel Horizons in Postbiotics: Lactobacillaceae Extracellular Vesicles and Their Applications in Health and Disease. Nutrients 2022;14:1–19. https://doi.org/10.3390/nu14245296.

[313] Chang C-J, Lin T-L, Tsai Y-L, Wu T-R, Lai W-F, Lu C-C, et al. Next generation probiotics in disease amelioration. J Food Drug Anal 2019;27:615–22. https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.12.011.

[314] Kim JH, Lee J, Park J, Gho YS. Gram-negative and Gram-positive bacterial extracellular vesicles. Semin Cell Dev Biol 2015;40. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.02.006.

[315] Kulp A, Kuehn MJ. Biological Functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. Annu Rev Microbiol 2010;64. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073413.

[316] Johansson MEV, Holmén Larsson JM, Hansson GC. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. Proc Natl Acad Sci U S A 2011;108. https://doi.org/10.1073/pnas.1006451107.

[317] Gill S, Catchpole R, Forterre P. Extracellular membrane vesicles in the three domains of life and beyond. FEMS Microbiol Rev 2019;43. https://doi.org/10.1093/femsre/fuy042.

[318] Stentz R, Carvalho AL, Jones EJ, Carding SR. Fantastic voyage: the journey of intestinal microbiota-derived microvesicles through the body. Biochem Soc Trans 2018;46:1021–7. https://doi.org/10.1042/BST20180114.

[319] Kaparakis-Liaskos M, Ferrero RL. Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles. Nat Rev Immunol 2015;15:375–87. https://doi.org/10.1038/nri3837.

[320] Olovo CV, Wiredu Ocansey DK, Ji Y, Huang X, Xu M. Bacterial membrane vesicles in the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel disease. Gut Microbes 2024;16:2341670. https://doi.org/10.1080/19490976.2024.2341670.

[321] Jan AT. Outer Membrane Vesicles (OMVs) of gram-negative bacteria: A perspective update. Front Microbiol 2017;8. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01053.

[322] Schwechheimer C, Kuehn MJ. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: Biogenesis and functions. Nat Rev Microbiol 2015;13. https://doi.org/10.1038/nrmicro3525.

[323] Kulkarni HM, Jagannadham M V. Biogenesis and multifaceted roles of outer membrane vesicles from Gram-negative bacteria. Microbiology (United Kingdom) 2014;160. https://doi.org/10.1099/mic.0.079400-0.

[324] Volgers C, Savelkoul PHM, Stassen FRM. Gram-negative bacterial membrane vesicle release in response to the host-environment: different threats, same trick? Crit Rev Microbiol 2018;44. https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1353949.

[325] Toyofuku M, Nomura N, Eberl L. Types and origins of bacterial membrane vesicles. Nat Rev Microbiol 2019;17. https://doi.org/10.1038/s41579-018-0112-2.

[326] Brown L, Wolf JM, Prados-Rosales R, Casadevall A. Through the wall: Extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. Nat Rev Microbiol 2015;13. https://doi.org/10.1038/nrmicro3480.

[327] Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. J Extracell Vesicles 2018;7. https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750.

[328] Olivo-Martínez Y, Bosch M, Badia J, Baldomà L. Modulation of the Intestinal Barrier Integrity and Repair by Microbiota Extracellular Vesicles through the Differential Regulation of Trefoil Factor 3 in LS174T Goblet Cells. Nutrients 2023;15:1–20. https://doi.org/10.3390/nu15112437.

[329] Fábrega MJ, Aguilera L, Giménez R, Varela E, Alexandra Cañas M, Antolín M, et al. Activation of Immune and Defense Responses in the Intestinal Mucosa by Outer Membrane Vesicles of Commensal and Probiotic Escherichia coli Strains. Front Microbiol 2016;7:1–14. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00705.

[330] Diaz-Garrido N, Badia J, Baldomà L. Modulation of Dendritic Cells by Microbiota Extracellular Vesicles Influences the Cytokine Profile and Exosome Cargo. Nutrients 2022;14:1–20. https://doi.org/10.3390/nu14020344.

[331] Martínez-Ruiz S, Olivo-Martínez Y, Cordero C, Rodríguez-Lagunas MJ, Pérez-Cano FJ, Badia J, et al. Microbiota-Derived Extracellular Vesicles as a Postbiotic Strategy to Alleviate Diarrhea and Enhance Immunity in Rotavirus-Infected Neonatal Rats. Int J Mol Sci 2024;25:1184. https://doi.org/10.3390/ijms25021184.

[332] Alvarez CS, Giménez R, Cañas MA, Vera R, Díaz-Garrido N, Badia J, et al. Extracellular vesicles and soluble factors secreted by Escherichia coli Nissle 1917 and ECOR63 protect against enteropathogenic E. coli-induced intestinal epithelial

barrier dysfunction. BMC Microbiol 2019;19:1–12. https://doi.org/10.1186/S12866-019-1534-3/TABLES/1.

[333] Ma L, Shen Q, Lyu W, lv L, Wang W, Yu M, et al. Clostridium butyricum and Its Derived Extracellular Vesicles Modulate Gut Homeostasis and Ameliorate Acute Experimental Colitis. Microbiol Spectr 2022;10. https://doi.org/10.1128/spectrum.01368-22.

[334] Shen Y, Torchia MLG, Lawson GW, Karp CL, Ashwell JD, Mazmanian SK. Outer membrane vesicles of a human commensal mediate immune regulation and disease protection. Cell Host Microbe 2012;12:509–20. https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2012.08.004.

[335] Kang C sung, Ban M, Choi EJ, Moon HG, Jeon JS, Kim DK, et al. Extracellular Vesicles Derived from Gut Microbiota, Especially Akkermansia muciniphila, Protect the Progression of Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis. PLoS One 2013;8:e76520. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0076520.

[336] Chelakkot C, Choi Y, Kim DK, Park HT, Ghim J, Kwon Y, et al. Akkermansia muciniphila-derived extracellular vesicles influence gut permeability through the regulation of tight junctions. Exp Mol Med 2018;50. https://doi.org/10.1038/EMM.2017.282.

[337] de Vos WM, Tilg H, Van Hul M, Cani PD. Gut microbiome and health: mechanistic insights. Gut 2022;71:1020–32. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2021-326789.

[338] Saeid Seyedian S, Nokhostin F, Dargahi Malamir M. A review of the diagnosis, prevention, and treatment methods of inflammatory bowel disease. J Med Life 2019;12:113–22. https://doi.org/10.25122/jml-2018-0075.

[339] Martyniak A, Medyńska-Przęczek A, Wędrychowicz A, Skoczeń S, Tomasik PJ. Prebiotics, Probiotics, Synbiotics, Paraprobiotics and Postbiotic Compounds in IBD. Biomolecules 2021;11:1–24. https://doi.org/10.3390/biom11121903.

[340] Pesce M, Seguella L, Del Re A, Lu J, Palenca I, Corpetti C, et al. Next-Generation Probiotics for Inflammatory Bowel Disease. Int J Mol Sci 2022;23:1–15. https://doi.org/10.3390/ijms23105466.

[341] Nataraj BH, Ali SA, Behare P V., Yadav H. Postbiotics-parabiotics: The new horizons in microbial biotherapy and functional foods. Microb Cell Fact 2020;19:1–22. https://doi.org/10.1186/S12934-020-01426-W/TABLES/2.

[342] Scott E, De Paepe K, Van de Wiele T. Postbiotics and Their Health Modulatory Biomolecules. Biomolecules 2022, Vol 12, Page 1640 2022;12:1640. https://doi.org/10.3390/BIOM12111640.

[343] Xie J, Li Q, Nie S. Bacterial extracellular vesicles: An emerging postbiotic. Trends Food Sci Technol 2024;143:1–14. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.104275.

[344] Yang J, Shin T-S, Kim JS, Jee Y-K, Kim Y-K. A new horizon of precision medicine: combination of the microbiome and extracellular vesicles. Exp Mol Med 2022;54:466–82. https://doi.org/10.1038/s12276-022-00748-6.

[345] Krzyżek P, Marinacci B, Vitale I, Grande R. Extracellular Vesicles of Probiotics: Shedding Light on the Biological Activity and Future Applications. Pharmaceutics 2023;15:1–31. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020522.

[346] Cañas MA, Fábrega MJ, Giménez R, Badia J, Baldomà L. Outer membrane vesicles from probiotic and commensal escherichia coli activate NOD1-mediated immune responses in intestinal epithelial cells. Front Microbiol 2018;9. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00498.

[347] Díaz-Garrido N, Bonnin S, Riera M, Gíménez R, Badia J, Baldomà L. Transcriptomic microRNA Profiling of Dendritic Cells in Response to Gut Microbiota-Secreted Vesicles. Cells 2020;9:1–27. https://doi.org/10.3390/cells9061534.

[348] Diaz-Garrido N, Cordero C, Olivo-Martinez Y, Badia J, Baldomà L. Cell-to-Cell Communication by Host-Released Extracellular Vesicles in the Gut: Implications in Health and Disease. Int J Mol Sci 2021;22:2213. https://doi.org/10.3390/ijms22042213.

[349] Diaz-Garrido N, Fábrega M-J, Vera R, Giménez R, Badia J, Baldomà L. Membrane vesicles from the probiotic Nissle 1917 and gut resident Escherichia coli strains distinctly modulate human dendritic cells and subsequent T cell responses. J Funct Foods 2019;61:103495. https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103495.

[350] Grabowski M, Murgueitio MS, Bermudez M, Wolber G, Weindl G. The novel small-molecule antagonist MMG-11 preferentially inhibits TLR2/1 signaling. Biochem Pharmacol 2020;171. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.113687.

[351] Guo J, Xu L, Teng X, Sun M. MicroRNA-7-5p regulates the proliferation and migration of intestinal epithelial cells by targeting trefoil factor 3 via inhibiting the phosphoinositide 3-kinase/Akt signalling pathway. Int J Mol Med 2017;40. https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3120.

[352] Hoffmann W. TFF (trefoil factor family) peptide-triggered signals promoting mucosal restitution. Cellular and Molecular Life Sciences 2005;62. https://doi.org/10.1007/s00018-005-5481-9.

[353] Dossinger V, Kayademir T, Blin N, Gött P. Down-regulation of TFF Expression in Gastrointestinal Cell Lines by Cytokines and Nuclear Factors. Cellular Physiology and Biochemistry 2002;12:197–206. https://doi.org/10.1159/000066279.

[354] Loncar MB, Al-Azzeh ED, Sommer PSM, Marinovic M, Schmehl K, Kruschewski M, et al. Tumour necrosis factor α and nuclear factor κB inhibit transcription of human

TFF3 encoding a gastrointestinal healing peptide. Gut 2003;52. https://doi.org/10.1136/gut.52.9.1297.

[355] Engevik MA, Luk B, Chang-Graham AL, Hall A, Herrmann B, Ruan W, et al. Bifidobacterium dentium fortifies the intestinal mucus layer via autophagy and calcium signaling pathways. MBio 2019;10. https://doi.org/10.1128/mBio.01087-19.

[356] Hwang D, Jo HA, Hwang S, Kim JK, Kim IH, Lim YH. Conditioned medium from LS 174T goblet cells treated with oxyresveratrol strengthens tight junctions in Caco-2 cells. Biomedicine and Pharmacotherapy 2017;85. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.11.022.

[357] Tawiah A, Moreau F, Kumar M, Tiwari S, Falguera J, Chadee K. High MUC2 Mucin Biosynthesis in Goblet Cells Impedes Restitution and Wound Healing by Elevating Endoplasmic Reticulum Stress and Altered Production of Growth Factors. American Journal of Pathology 2018;188. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.05.013.

[358] Krüger K, Schmid S, Paulsen F, Ignatius A, Klinger P, Hotfiel T, et al. Trefoil factor 3 (TFF3) is involved in cell migration for skeletal repair. Int J Mol Sci 2019;20. https://doi.org/10.3390/ijms20174277.

[359] Dignass A, Lynch-Devaney K, Kindon H, Thim L, Podolsky DK. Trefoil peptides promote epithelial migration through a transforming growth factor β-independent pathway. Journal of Clinical Investigation 1994;94. https://doi.org/10.1172/JCI117332.

[360] Zhang Y, Liu Y, Wang L, Song H. The expression and role of trefoil factors in human tumors. Transl Cancer Res 2019;8. https://doi.org/10.21037/tcr.2019.07.48.

[361] Yano JM, Yu K, Donaldson GP, Shastri GG, Ann P, Ma L, et al. Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. Cell 2015;161:264–76. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.047.

[362] Yaghoubfar R, Behrouzi A, Zare Banadkoki E, Ashrafian F, Lari A, Vaziri F, et al. Effect of Akkermansia muciniphila, Faecalibacterium prausnitzii, and Their Extracellular Vesicles on the Serotonin System in Intestinal Epithelial Cells. Probiotics Antimicrob Proteins 2021;13:1546–56. https://doi.org/10.1007/s12602-021-09786-4.

[363] Dosh RH, Jordan-Mahy N, Sammon C, Le Maitre C. Interleukin 1 is a key driver of inflammatory bowel disease-demonstration in a murine IL-1Ra knockout model. Oncotarget 2019;10:3559–75. https://doi.org/10.18632/oncotarget.26894.

[364] Tsukada Y, Nakamura T, Iimura M, Iizuka B, Hayashi N. Cytokine profile in colonic mucosa of ulcerative colitis correlates with disease activity and response to granulocytapheresis. Am J Gastroenterol 2002;97:2820–8. https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2002.07029.x.

[365] Yaghoubfar R, Behrouzi A, Ashrafian F, Shahryari A, Moradi HR, Choopani S, et al. Modulation of serotonin signaling/metabolism by Akkermansia muciniphila and its extracellular vesicles through the gut-brain axis in mice. Sci Rep 2020;10:1–12. https://doi.org/10.1038/s41598-020-79171-8.

[366] Nzakizwanayo J, Dedi C, Standen G, Macfarlane WM, Patel BA, Jones B V. Escherichia coli Nissle 1917 enhances bioavailability of serotonin in gut tissues through modulation of synthesis and clearance. Sci Rep 2015;5:17324. https://doi.org/10.1038/srep17324.

[367] Shimada Y, Kinoshita M, Harada K, Mizutani M, Masahata K, Kayama H, et al. Commensal Bacteria-Dependent Indole Production Enhances Epithelial Barrier Function in the Colon. PLoS One 2013;8:1–10. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080604.

[368] Gao J, Xu K, Liu H, Liu G, Bai M, Peng C, et al. Impact of the Gut Microbiota on Intestinal Immunity Mediated by Tryptophan Metabolism. Front Cell Infect Microbiol 2018;8:1–22. https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00013.

[369] Latorre E, Layunta E, Grasa L, Castro M, Pardo J, Gomollón F, et al. Intestinal Serotonin Transporter Inhibition by Toll-Like Receptor 2 Activation. A Feedback Modulation. PLoS One 2016;11:1–20. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169303.

[370] Khalil EH, Shaker OG, Hasona NA. lncRNA H-19 and miR-200a implication and frequency of lncRNA H-19 rs2170425 SNP in ulcerative colitis and Crohn's disease. Comp Clin Path 2023;32:565–71. https://doi.org/10.1007/s00580-023-03465-2.

[371] Soroosh A, Rankin CR, Polytarchou C, Lokhandwala ZA, Patel A, Chang L, et al. miR-24 Is Elevated in Ulcerative Colitis Patients and Regulates Intestinal Epithelial Barrier Function. American Journal of Pathology 2019;189:1763–74. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2019.05.018.

[372] Latorre E, Matheus N, Layunta E, Alcalde AI, Mesonero JE. IL-10 Counteracts Proinflammatory Mediator Evoked Oxidative Stress in Caco-2 Cells. Mediators Inflamm 2014;2014:1–6. https://doi.org/10.1155/2014/982639.

[373] Frolova L, Drastich P, Rossmann P, Klimesova K, Tlaskalova-Hogenova H. Expression of Toll-like Receptor 2 (TLR2), TLR4, and CD14 in Biopsy Samples of Patients With Inflammatory Bowel Diseases: Upregulated Expression of TLR2 in Terminal Ileum of Patients With Ulcerative Colitis. Journal of Histochemistry & Cytochemistry 2008;56:267–74. https://doi.org/10.1369/jhc.7A7303.2007.

[374] Tian T, Wang Z, Zhang J. Pathomechanisms of Oxidative Stress in Inflammatory Bowel Disease and Potential Antioxidant Therapies. Oxid Med Cell Longev 2017;2017:1–18. https://doi.org/10.1155/2017/4535194.

[375] Spanier B, Rohm F. Proton coupled oligopeptide transporter 1 (PepT1) function, regulation, and influence on the intestinal homeostasis. Compr Physiol 2018;8. https://doi.org/10.1002/cphy.c170038.

[376] Buyse M, Charrier L, Sitaraman S, Gewirtz A, Merlin D. Interferon-γ Increases hPepT1-Mediated Uptake of Di-Tripeptides Including the Bacterial Tripeptide fMLP in Polarized Intestinal Epithelia. American Journal of Pathology 2003;163. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63555-9.

[377] Vavricka SR, Musch MW, Fujiya M, Kles K, Chang L, Eloranta JJ, et al. Tumor necrosis factor-α and interferon-γ increase PepT1 expression and activity in the human colon carcinoma cell line Caco-2/bbe and in mouse intestine. Pflugers Arch 2006;452. https://doi.org/10.1007/s00424-005-0007-8.

[378] Wang P, Lu Y, Wen Y, Yu D, Ge L, Dong W, et al. IL-16 Induces Intestinal Inflammation via PepT1 Upregulation in a Pufferfish Model: New Insights into the Molecular Mechanism of Inflammatory Bowel Disease. The Journal of Immunology 2013;191. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202598.

[379] Berezin AE, Poplyonkin EI. Diagnostic and therapeutic value of micro-RNAs in inflammatory bowel disease. Biomedical Research and Therapy 2020;7. https://doi.org/10.15419/bmrat.v7i2.589.

[380] Ayyadurai S, Charania MA, Xiao B, Viennois E, Zhang Y, Merlin D. Colonic miRNA expression/secretion, regulated by intestinal epithelial PepT1, plays an important role in cell-to-cell communication during colitis. PLoS One 2014;9. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087614.

[381] Olivo-Martínez Y, Martínez-Ruiz S, Cordero-Alday C, Bosch M, Badia J, Baldoma L. Modulation of Serotonin-Related Genes by Extracellular Vesicles of the Probiotic Escherichia coli Nissle 1917 in the Interleukin-1β-Induced Inflammation Model of Intestinal Epithelial Cells. Int J Mol Sci 2024;25. https://doi.org/10.3390/ijms25105338.

[382] Wei S, Zhang J, Wu X, Chen M, Huang H, Zeng S, et al. Fusobacterium nucleatum Extracellular Vesicles Promote Experimental Colitis by Modulating Autophagy via the miR-574-5p/CARD3 Axis. Inflamm Bowel Dis 2023;29. https://doi.org/10.1093/ibd/izac177.

[383] Ma L, Lyu W, Song Y, Chen K, Lv L, Yang H, et al. Anti-Inflammatory Effect of Clostridium butyricum-Derived Extracellular Vesicles in Ulcerative Colitis: Impact on Host microRNAs Expressions and Gut Microbiome Profiles. Mol Nutr Food Res 2023;67. https://doi.org/10.1002/mnfr.202200884.

[384] Lin M, Zhang Z, Gao M, Yu H, Sheng H, Huang J. MicroRNA-193a-3p suppresses the colorectal cancer cell proliferation and progression through downregulating the

PLAU expression. Cancer Manag Res 2019;11. https://doi.org/10.2147/CMAR.S208233.

[385] Pande S, Yang X, Friesel R. Interleukin-17 receptor D (Sef) is a multi-functional regulator of cell signaling. Cell Communication and Signaling 2021;19:6. https://doi.org/10.1186/s12964-020-00695-7.