



**UNIVERSIDAD
ANDRÉS BELLO**

Universidad Andrés Bello
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela de Ingeniería en Biotecnología

**“EFECTOS ANTI-INFLAMATORIOS DE TERT-BUTIL HIDROQUINONA EN
ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL”**

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar
al grado de **Magister en Biotecnología**.

Director de Tesis: Dr. Manuel Álvarez Lobos.

Facultad de Medicina
Pontificia Universidad Católica de Chile

Profesor Patrocinante: Dr. Daniel Paredes-Sabja.

Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Andrés Bello

Diego Alfonso Sobera Rojas

Santiago, Chile

Julio, 2017

Agradecimientos

Me gustaría agradecer en primer lugar a mi tutor Manuel Álvarez Lobos, por acogerme en el laboratorio de Inmunología Gastrointestinal, por su paciencia, buena disposición en momentos tanto difíciles como importantes y por darme la oportunidad de aprender mucho sobre esta área científica. A la bioquímica del laboratorio del Gigliola Ramírez, por su paciencia, ganas y toda la ayuda brindada. Se sufrió, se rió, pero se logró.

También quiero agradecerle a Hugo Tobar, quien me ayudo en tantas ocasiones con una voluntad de oro y por todos los buenos momentos vividos. A Loni Berkowitz, Nicolás Santander, Francisca Salas, Paz Molina y Katherine Rivera por hacer mi estadía en el laboratorio muy agradable y por estar ahí siempre con la mejor disposición. Gracias a Don Manuel y las señoras del aseo también, por su simpatía y consejos en momentos de estrés.

A la gente del laboratorio del Dr. Paul Harris, Carolina Serrano, Mauricio Sandoval, Caroll Hernández y Miguel León, un gusto haber compartido con todos ustedes. Y también a los que ya no están, Catalina Rosales y María José Parga, por los buenos momentos y risas que pasamos juntos.

Gracias a todos los que trabajan en el laboratorio de la Dra. Susan Bueno y del Dr. Alexis Kalergis, por la ayuda, tiempo y consejos en algunos experimentos que tuve que realizar ahí.

Me gustaría hacer un especial agradecimiento a mi familia, papá y mamá, por el gran apoyo que han significado todos estos años, a mi hermano Juan Pablo Sobera, a mis abuelos Tomás Rojas, Mónica Flores y Elena Vásquez por el apoyo incondicional y especial dedicación a mi tata Manuel Sobera Gutiérrez, que aunque los tiempos actuales ya no sean los mismos, sé que esta alegría no le cabría en el corazón. Sin ti nada de esto hubiese sido posible. También a mis amigos del colegio, de la UNAB, UNAP y de la vida, porque sin ustedes el camino hubiese sido más largo. A todos ustedes de corazón, GRACIAS TOTALES.

“...Si un día amezco muerto, será porque preferí morir soñando antes que vivir despierto”.

II. ÍNDICE

1. Resumen.....	4
2. Abreviaciones.....	5
3. Introducción.....	7
3.1 Marco teórico.....	8
3.2 Hipótesis.....	17
3.3	
Objetivos.....	17
7	
3.3.1 Objetivo general.....	17
3.3.2 Objetivos específicos.....	177
4. Materiales y	
Métodos.....	188
4.1 Materiales.....	18
4.2 Métodos por objetivo.....	18
4.2.1 Métodos para responder el Objetivo N°1.....	18
4.2.2 Métodos para responder el ObjetivoN°2.....	27
4.2.3 Métodos para responder el ObjetivoN°3	32
5. Resultados.....	36
6. Discusión.....	69
7. Conclusión y proyecciones.....	82
8. Referencias.....	86
9. Anexos.....	95

1. RESUMEN

Las Enfermedades inflamatorias intestinales (EII) comprenden principalmente la Enfermedad de Crohn (EC) y la Colitis Ulcerosa (CU), y corresponden a enfermedades intestinales de curso crónico, de etiología desconocida y origen multifactorial. Estas patologías se asocian a una desregulación en la microbiota intestinal, alterando la homeostasis interna y afectando el funcionamiento fisiológico intestinal. Hasta ahora no existen terapias curativas, y los tratamientos son de efectividad limitada, asociados a efectos adversos frecuentes y a un alto costo. Por lo tanto, la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento que sean altamente efectivas, con menos efectos secundarios y de menor costo, es absolutamente necesaria.

Estudios preliminares realizados en los últimos años han descrito compuestos que podrían tener propiedades benéficas para el tratamiento de condiciones inflamatorias. Uno de estos potenciales compuestos es tert-butil hidroquinona (tBHQ), un compuesto fenólico utilizado como preservante en la industria alimentaria. tBHQ ha sido descrito como inhibidor de la citoquina pro-inflamatoria IL-12 y, como un potente inductor del factor de transcripción Nrf2, el cual está involucrado en la expresión de enzimas antioxidantes como la Hemo Oxigenasa-1 (HO-1), entre otras. Actualmente, no existen investigaciones que relacionen los efectos de tBHQ con EII, pero los estudios enfocados en sus efectos, son un gran avance para el desarrollo de posibles alternativas curativas que puedan controlar tanto los síntomas como disminuir la incidencia de EII. En este proyecto, se evaluarán los efectos anti-inflamatorios de tBHQ en EII, específicamente sobre la expresión de HO-1 e IL-12 en líneas celulares intestinales (*in vitro*), en muestras de sangre en pacientes con EII y sujetos sanos y en biopsias de pacientes con EII y de sujetos controles (*ex vivo*). En el proyecto, se cuantificará el mRNA de HO-1 e IL-12, y de las citoquinas pro- y anti- inflamatorias por Q-PCR, y se evaluará el efecto de tBHQ en la expresión de ellas, analizando el efecto sobre la viabilidad celular por reducción de MTT. Se espera observar que las células o los tejidos expuestos a tBHQ muestren mayor expresión de HO-1 y una menor inflamación, es decir, una disminución de citoquinas pro-inflamatorias y un aumento de citoquinas anti-inflamatorias. Este trabajo aportará al estudio de las EII, sobretodo en la dilucidación de un posible rol anti-inflamatorio de tBHQ, ya que no existen estudios previos que relacionen esta molécula con las enfermedades inflamatorias intestinales.

2. ABREVIACIONES

ARE	: Sigla del nombre en inglés “Antioxidant Response Elements” (Elemento de Respuesta Antioxidante).
B2M	: Beta2-microglobulina.
CARD15	: Sigla del nombre en inglés “caspase recruitment domain-containing protein 15”.
CNC	: Cap'n'collar.
CO	: Monóxido de Carbono.
CO ₂	: Dióxido de Carbono.
CoPP	: Sigla del nombre en inglés “Cobalt-protoporphyrin” (Protoporfirina de Cobalto).
C _T	: Sigla del nombre en inglés “Treshold Cycle” (Ciclo Umbral).
CU	: Colitis ulcerosa.
DMEM	: Sigla del nombre en inglés “Dulbecco’s modified Eagle medium”.
EC	: Enfermedad de Crohn.
EII	: Enfermedad inflamatoria intestinal.
ELISA	: Sigla del nombre en inglés “Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay”.
GAPDH	: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.
HO-1	: Hemo Oxigenasa-1.
HSP	: Sigla del nombre en inglés” heat shock protein” (proteína de estrés térmico).
IL-8	: Interleuquina-8.
IL-10	: Interleuquina 10.
IL12	: Interleuquina 12p70, constituída por subunidades p35 y p40.
IL12a	: Interleuquina-12 (sub-unidad alfa), conocida también como IL-12p35.
IFN- γ	: Interferón gamma.
LPS	: Sigla del nombre en inglés “Lipopolysaccharide” (Lipopolisacárido).

- MOI : Sigla de la expresión en inglés “multiplicity of infection”, que se refiere a la relación numérica del agente infeccioso (bacterias o virus) frente a una célula blanco.
- MTT : Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio.
- NFE2L2 : Sigla del nombre en inglés nuclear factor erythroid 2 like 2 NF- κ B: Sigla del nombre en inglés “nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells” (Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas).
- NF- κ B : Sigla del nombre en inglés “nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells” (Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas).
- Nod2 : Abreviación del nombre de origen inglés “nucleotide-binding oligomerization domain containing protein 2”, es una proteína también conocida como dominio reclutador de caspasa 15 (CARD15).
- NQO1 : NADPH dehidrogenase quinone 1.
- Nrf2 : Sigla del nombre en inglés “Nuclear factor-erythroid 2 p45-related factor 2”.
- PBMC : Sigla del nombre en inglés de “Peripheral Blood Mononuclear Cells” (células mononucleares de sangre periférica).
- PBS : Sigla del nombre en inglés de “Phosphate Buffer Saline” (Tampón Fosfato Salino).
- PCR : Sigla del nombre en inglés de Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa).
- PFA : Paraformaldehído.
- Q-PCR : PCR cuantitativa, en tiempo real, con transcripción reversa.
- RPMI : Sigla del nombre en inglés de “Roswell Park Memorial Institute medium”.
- S. typhimurium*: *Salmonella typhimurium* 14028.tBHQ: tert-butil hidroquinona.
- tBHQ : Tert-butil hidroquinona.
- TNF- α : Sigla del nombre en inglés de “Tumor of necrosis Factor alpha” (Factor de Necrosis Tumoral alfa).
- UFC : Unidades formadoras de colonia.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Marco teórico

El tracto gastrointestinal, corresponde a un largo conducto que se extiende desde la cavidad bucal hasta el ano (Yan *et al.* 2012), representando una interface crucial entre el cuerpo y los elementos del medio ambiente (De Santis *et al.* 2015). Es considerado como un dinámico y complejo ecosistema, ya que en su interior existen poblaciones de diverso tipo de microorganismos residentes que constituyen la microbiota intestinal (“flora intestinal”). La simbiosis, entre nuestro organismo y la microbiota que alberga, cumple un importante rol fisiológico en la salud humana y, colectivamente, podría ser considerada como un órgano funcional virtual (Evans *et al.* 2013), lo que permite mantener la tolerancia a los antígenos de origen alimentario y microbianos propios (Frosali *et al.* 2014).

La microbiota posee un papel fundamental en los procesos metabólicos, nutricionales, fisiológicos e inmunológicos del ser humano (Gerritsen *et al.* 2011). Se expresa que el intestino otorga un ambiente/nicho adecuado para la replicación de múltiples organismos comensales que se encuentran fisiológicamente regulados en su cavidad interior. Por lo tanto, es posible que un desbalance en la composición de la microbiota, asociado a una pérdida de la homeostasis intestinal en la función de la barrera epitelial y la función linfocitaria (Belkaid y Hand, 2008), puedan estar relacionadas con algunas condiciones patológicas tales como obesidad, desnutrición, diabetes y enfermedades intestinales crónicas (Guinane *et al.* 2013). La publicación de Brown *et al.* (2012) reporta que alteraciones en la microbiota, fenómeno denominado disbiosis, podrían alterar las funciones inmunes y aumentar el riesgo de enfermedad, interrumpiendo la homeostasis gastrointestinal e incrementando así la susceptibilidad a desarrollar diversas enfermedades intestinales tales como las enfermedades inflamatorias intestinales (Frosali *et al.* 2014).

En condiciones normales, los antígenos derivados del metabolismo de la microbiota y los antígenos alimentarios no inducen respuestas linfocitarias pro-inflamatorias. Se cree que éstos son procesados continuamente por las células dendríticas intestinales y presentados a los linfocitos para inducir una respuesta inmune de tolerancia, que se manifiesta como una reacción inflamatoria fisiológica normal en el intestino (Gerritsen *et al.* 2011). Esta respuesta, le permite al

organismo mantener una constante vigilancia sobre los antígenos lumbinales para reconocer por un lado a los antígenos alimenticios y comensales bacterianos y, por otro lado, a los antígenos patogénicos foráneos para generar una respuesta inmunológica apropiada, altamente regulada y controlada y, de este modo, mantener la homeostasis intestinal (Chaplin, 2010). Este proceso involucra una perfecta regulación entre la carga microbiana y la respuesta inmune que se genera en contra de ella, de acuerdo al antígeno presente (Abraham y Medzhitov, 2011).

Durante la inflamación fisiológica se observa una abundante presencia de leucocitos mononucleares en las zonas intra-epitelial y sub-epitelial como consecuencia de una respuesta inmune hacia los agentes lumbinales comensales (Fiocchi, 2008). El estrés induce la síntesis de mediadores inflamatorios de tipo oxidativo/nitrosativo a través de la activación de NF- κ B y la infiltración leucocitaria en la mucosa de colon así como altera la barrera intestinal favoreciendo un incremento de la permeabilidad, translocación bacteriana y alteración de la inmunidad. Los factores implicados en esta desregulación no se encuentran definidos aún (Ponferrada, 2006).

Entre las condiciones patológicas intestinales, las enfermedades inflamatorias son de las más frecuentes. En ellas se desarrolla una alteración de la función intestinal, donde es posible encontrar patrones de inflamación agudos en algunas y patrones crónicos en otras (Carpenter *et al.* 2000). La enterocolitis infecciosa, ejemplo clásico de inflamación aguda, es producida por agentes patógenos que invaden y colonizan la mucosa intestinal (Mizoguchi, 2006), y generan una reacción inflamatoria aguda que produce diarrea, pudiendo en algunos casos producir ulceración y destrucción de la mucosa (Stier y Bischoff, 2016). En las condiciones crónicas, se observa una inflamación persistente y la más representativa de éstas son las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) crónicas idiopáticas, que incluyen a la Enfermedad de Crohn (EC) y Colitis Ulcerosa (CU), como las dos principales entidades clínico-patológicas de las EII (Matricon *et al.* 2010).

La EC y CU, son las EII más comunes que afectan al tracto digestivo, compartiendo diversas características (Fakhoury *et al.* 2014). En la EC se encuentran afectadas todas las capas de la pared intestinal, siendo una enfermedad segmentada, existiendo zonas sanas (aparentemente) entre áreas inflamadas. En cambio, la CU es una enfermedad que afecta, solamente la mucosa del colon donde se manifiesta una inflamación permanente. Sin embargo, en ambas patologías existe un estado de reactividad inmunológica alterada (Baumgart, 2009) (Ver Tabla 1). Resulta de

especial interés para nosotros la enfermedad de Crohn, la que se caracteriza por tener particularidades que no tiene la CU, como son: ser una enfermedad transmural, tener complicaciones como la estenosis o fístulas, presentar zonas afectadas y zonas sanas, e ir presentando un daño acumulativo a lo largo de su evolución, y en la que la cirugía no es curativa. (Pariente B *et al.* 2015)

Tabla 1. Diferencias clínicas entre Colitis Ulcerosa y Enfermedad de Crohn

Características clínicas	Enfermedad de Crohn	Colitis Ulcerosa
Tipo de afectación	Transmural	Mucosa (preferentemente)
Presencia de Úlceras	Sí (profundas)	En casos graves
Afectación rectal	50%	95%
Distribución de lesiones	Discontinuas	Continuas
Afectación del íleon terminal	Frecuente	Infrecuente
Presencia de pseudopólipos	Infrecuente	Frecuente

Se han observado altas tasas de EII en áreas como el norte de Europa y América del Norte y su frecuencia sigue aumentando en áreas de baja incidencia como en el sur de Europa, Asia y diversas zonas de países en desarrollo (Loftus, 2004), incluso en nuestro país, donde actualmente existe un creciente número de casos con EII (Figuroa *et al.* 2005).

Varios estudios han reconocido la importancia de distintos factores sobre la incidencia de la EII, donde la interacción entre los factores genéticos y ambientales, influyen a la flora comensal intestinal normal para desencadenar una respuesta inmune mucosal inapropiada (Molodecky y Kaplan, 2010).

Con respecto a la predisposición genética, existe una familia de genes involucrados en diversos procesos celulares. A nivel de la autofagia, se han descrito mutaciones en el gen ATG16L1, que codifica para una proteína que es parte de un complejo proteico esencial para la autofagia (Henderson y Stevens, 2012). Por otro lado, variantes en el gen NOD2/CARD-15 (caspase recruitment domain-containing protein 15), están asociadas con la ocurrencia de EII. Las

mutaciones específicas del gen NOD2, Arg702Trp, Gly908Arg y leu1007fsinsC, están relacionadas con un aumento en la susceptibilidad de desarrollar EC ileal debido a que están asociadas con una pérdida de la función de la proteína (Frosali *et al.* 2014). El gen NOD-2/CARD-15 codifica para el sensor microbiano intracelular NOD-2, que reconoce estructuras que contienen el muramil dipéptido, por lo que alteraciones de la funcionalidad de esta proteína se asocian con la promoción de cambios en la respuesta inmune de la lámina propia generando de este modo, una inflamación crónica en el tejido (Frosali *et al.* 2014). Los sujetos que poseen variantes de este gen podrían ser beneficiados con estrategias terapéuticas tempranas y/o preventivas (Alvarez-Lobos *et al.* 2005). Sin embargo, no está completamente claro si otros factores como la dieta, vitamina D, anticonceptivos orales e infecciones perinatales entre otros podrían tener un rol en el desarrollo de EII (Loftus, 2004), por lo que se hacen necesarios nuevos estudios epidemiológicos.

Nrf2 es un factor de transcripción codificado por el gen NFE2L2, miembro de la familia *Cap'n'Collar* (CNC) (McMahon *et al.* 2001). Este factor de transcripción es esencial para la activación de la transcripción de genes codificantes para enzimas detoxificadoras y antioxidantes, (Purdom-Dickinson *et al.* 2007). En condiciones de estrés oxidativo, Nrf2 transloca al núcleo e induce la expresión de genes citoprotectores (Florczyk *et al.* 2010) que codifican para enzimas de respuesta a estrés, como NADPH: quinona oxidoreductasa 1 (NQO1), Glutamato Cisteína Ligasa (GCL) y HO-1, entre otras.

También se ha descrito el papel de las proteínas heat shock protein (HSP) como reguladores importantes en las respuestas fisiológicas de los tejidos frente a estrés o injurias (Zhu *et al.* 2011; Goldhill *et al.* 1999). Hemo oxigenasa (HO) pertenece a las HSP y corresponde a una familia de enzimas de expresión ubicua que regula el metabolismo del grupo hemo, permitiendo la formación de cantidades equimolares de los productos metabólicos monóxido de carbono (CO), ion Hierro (Fe^{2+}) y biliverdina (Pittalà *et al.* 2013). Esta enzima posee dos isoformas catalíticamente activas: Hemo oxigenasa-1 (HO-1) inducible por estrés y Hemo oxigenasa-2 (HO-2) expresada constitutivamente tanto en testículos como en cerebro (Ewing y Maines, 1995). También se ha descrito una tercera isoforma (HO-3), la cual es catalíticamente inactiva y al presentar 2 motivos Cys-Pro a los cuales se les uniría el grupo hemo, se le atribuye una posible función reguladora en los procesos celulares dependientes del grupo hemo. (Hayashi *et al.* 2004). HO-1, también conocida como HSP32, es extraordinariamente sensible no sólo a metales sino

también a todo tipo de estímulos y agentes que provocan estrés oxidativo y condiciones patológicas, de hecho hasta ahora no se ha descrito otra enzima que responda a tantos estímulos y de tan diversa naturaleza (Maines, 1997). Además, Takagi *et al.* (2010) se refiere a la activación de HO-1, evaluada en varios modelos animales de daño intestinal, como un posible mecanismo defensivo endógeno durante el desarrollo de la inflamación intestinal para reducir la inflamación y el daño al tejido. Se sabe que los productos metabólicos generados por HO-1 modulan la respuesta inmune y poseen un rol protector en el desarrollo de inflamación intestinal mediante propiedades citoprotectoras y anti-inflamatorias (Naito *et al.* 2004), por lo cual, esta enzima podría representar un blanco terapéutico potencial en EII (Mackern-Oberti *et al.* 2014).

Las citoquinas que caracterizan las enfermedades inflamatorias intestinales son los principales elementos fisiopatológicos que rigen la iniciación, evolución y, en última instancia, la resolución de estas formas de inflamación (Strober y Fuss, 2011). A nivel fisiopatológico, respecto a los mecanismos involucrados en las EII, se ha reportado que las concentraciones de citoquinas pro-inflamatorias, como TNF- α , IL-8 e IL-12 entre otras, se incrementan en la mucosa intestinal de pacientes con EII (Fujino *et al.* 2003).

La familia de citoquinas de IL-12, que incluye a las citoquinas heterodiméricas IL-12, IL-23 e IL-27, es un componente clave de la respuesta inflamatoria (Gee *et al.* 2009). IL-12p70 es un heterodímero compuesto por las subunidades p35 y p40, codificadas por los genes IL12A e IL12B, respectivamente. La subunidad p40 puede formar un homodímero IL-12p40, pero es menos activo que IL-12p70 (Macocho *et al.* 2015). IL12 es secretada por diferentes tipos celulares incluyendo células B, dendríticas, monocitos/macrófagos y células epiteliales. Esta citoquina, además, induce la diferenciación de linfocitos T *naive* a células de respuesta Th1, debido a una selectiva inducción y estimulación de los niveles de IFN- γ de las células T “helper” (Bettelli y Kuchroo, 2005). Se ha observado, que la administración de IL-12 en ratones genera una marcada esplenomegalia, atrofia del timo, infiltración de macrófagos en tejidos e inducción de síntesis de citoquinas inflamatorias claves como IFN- γ y TNF- α (Fantuzzi *et al.* 1999). En efecto, IL-12 es un potente inductor de la producción de IFN- γ (Hodge-Dufour *et al.* 1998), el cual es un regulador positivo para la producción de TNF- α (Matsuura *et al.* 1998), molécula de señalización clave en inflamación y que se encuentra en altos niveles en sangre, tejido epitelial y heces en pacientes con EII activa (Ngo *et al.* 2010).

Entre las citoquinas anti-inflamatorias las 2 más relevantes para estas condiciones son IL-10 y TGF- β . IL-10 inhibe la secreción de citoquinas pro-inflamatorias así como las concentraciones de sus ARN mensajero (Nikolaus *et al.* 1998). Además, se ha descrito que TGF- β (Transforming Growth Factor Beta), es una citoquina que en ausencia de mediadores inflamatorios promueve el desarrollo de linfocitos T reguladores Fox p3⁺, asociados con la supresión de la respuesta inflamatoria (Xavier y Podolsky, 2007).

Para las EII no existen tratamientos curativos (Flores, 2015), pero sí existen terapias que permiten controlar la inflamación, usualmente con fármacos y en ocasiones con cirugías, que pretenden mejorar la calidad de vida de los pacientes (Gerson y Triadafilopoulos, 2000). El tratamiento para EII puede abordarse con al menos dos estrategias terapéuticas conocidas como “step-up” y “top-down”. La primera se refiere al método clásico en el cual la intensidad del tratamiento se aumenta de acuerdo a la severidad de la enfermedad. La segunda, “top-down”, implica un inicio de tratamiento intensivo (ejemplo: terapias biológicas, cirugía) cuya racionalidad es evitar la aparición de complicaciones futuras. Sin embargo, tratamientos que controlen satisfactoria y definitivamente la inflamación gastrointestinal sin la presencia de efectos secundarios no deseados no están disponibles en la práctica clínica. Además, la mayoría de los tratamientos actuales son de un costo elevado (Sales-Campos, 2015). Dentro de las terapias actuales para EII existen los abordajes farmacológicos clásicos, que incluyen drogas bien establecidas, reconocidas como terapias convencionales, que comprenden varias clases de fármacos, que contribuyen a regular la respuesta inmune exacerbada tanto en EC como CU (Sales-Campos, 2015). Resulta de especial interés por las características previamente mencionadas estudiar lo que sucede en la enfermedad de Crohn.

Los principales objetivos de los tratamientos contra EII son la inducción y mantención de la remisión, la reducción del uso a largo plazo de corticoesteroides y poder mejorar la calidad de vida del paciente (Olendzki *et al.* 2014). El resultado dependerá del balance entre eficacia y efectos secundarios de la droga utilizada, con especial énfasis en la respuesta del paciente a la terapia empleada (Sales-Campos *et al.* 2015). También el tratamiento médico para EII es dependiente directamente del uso de drogas inmunosupresoras y de compuestos anti-inflamatorios, por lo que se hace necesario el desarrollo de nuevas formulaciones de tratamiento

contra las EII, con un número menor de efectos secundarios para obtener así mejores resultados clínicos (Fakhoury *et al.* 2014).

En los últimos años se han desarrollado tratamientos biológicos enfocados en bloquear la actividad del sistema inmune y, de este modo, inhibir a las citoquinas pro-inflamatorias, quimioquinas e integrinas (ej.: anticuerpos anti-TNF- α o anti IL-12), pudiendo contribuir en la prevención de la activación, proliferación o reclutamiento de linfocitos T (Sales-Campos *et al.* 2015). Si bien la utilización de agentes biológicos ha mostrado resultados favorables, su enfoque terapéutico incrementa el costo del tratamiento contra EII (Sales-Campos *et al.* 2015). En particular, TNF- α es una citoquina pro-inflamatoria que ejerce un rol clave en la inmunidad mediada por células y sus niveles elevados en el suero se relacionan directamente con EII, por lo tanto, las estrategias terapéuticas anti TNF- α representan un gran avance en el tratamiento de las enfermedades inflamatorias, incluyendo las EII (Bonyadi *et al.* 2014). Aunque los anticuerpos anti TNF- α , han demostrado gran eficacia, su uso puede favorecer la aparición de efectos no deseados como infecciones o reacciones de hipersensibilidad (Sales-Campos *et al.* 2015). También los anticuerpos anti-IL-12 han demostrado utilidad clínica en las EII (Harrison, 2014).

Por otro lado, estudios utilizando modelos murino Nrf2^{-/-}, han demostrado que la invalidación de la expresión genética de Nrf2, promueve el desarrollo de las principales enfermedades relacionadas con inflamación (Kobayashi *et al.*, 2016), alterando el fenotipo de las células dendríticas murinas, mostrando reducidos sus niveles de glutatión, sus funciones fagocíticas deterioradas y, además, secretan altos niveles de citoquinas como TNF- α , IFN- γ e IL-12, sugiriendo que los niveles constitutivos o inducidos de Nrf2, podrían limitar su expresión (Macocho *et al.* 2015).

Debido a la falta de identificación de los agentes causales de las EII, el desarrollo de nuevos tratamientos farmacológicos no ha sido del todo eficiente. Se han realizado grandes esfuerzos farmacéuticos en desarrollar preparaciones farmacológicas para mejorar la biodisponibilidad de los fármacos anti-inflamatorios en las áreas afectadas del tracto gastrointestinal (Fakhoury *et al.* 2014). Este punto es de gran importancia, ya que lograr comprender mejor la patogénesis de EII y desarrollar nuevas terapias que sean más efectivas, idealmente sin efectos secundarios y de menor costo es altamente necesario.

Uno de estos potenciales compuestos es *tert*-butil hidroquinona (tBHQ), que corresponde a un antioxidante fenólico usado comúnmente como preservante (Li *et al.* 2014). Su uso en alimentos que contienen grasas, aceite vegetal, snacks y cereales en nuestro país está aprobado por el Ministerio de Salud (200 mg/kg en base a materia grasa pura, como límite máximo), y también se encuentra aprobado tanto por la Food and Drug Administration (FDA), en dosis de hasta un 0,02% (200ppm,) (Shahidi & Zhong, 2005) como por la European Food Safety Authority (EFSA) en dosis de hasta 200 mg/g de grasa o aceite (Anton *et al.* 2004). A este compuesto también se le reportan propiedades anti-oxidantes debido a la inhibición de la generación de radicales de oxígeno en células PC12 estimuladas con LPS y, anti-inflamatorias por la inhibición de la expresión de ciclo-oxigenasa2 (COX-2), TNF- α , NF κ B y caspasa-3 de manera dosis dependiente. Además, por la supresión de la fosforilación de MAP kinases (p38, ERK1/2, and JNK) en este tipo celular (Khodagholi y Tusi, 2011). Se ha determinado que esta molécula, puede inducir diversas enzimas antioxidantes y detoxificadoras, mediante la activación del factor de transcripción Nrf2 e inducir genes blanco como el que codifica para HO-1 (Cheung *et al.* 2011). Por otro lado, se ha descrito que produce efectos protectores sobre la lipotoxicidad en hepatocitos induciendo autofagia, independientemente de la activación de Nrf2 (Li *et al.* 2014).

Jin *et al.* (2010) demostró que en ratones, después de una lesión cerebral traumática, se puede inducir una respuesta inflamatoria intestinal y daño mucosal mediados por un incremento de NF- κ B y de citoquinas pro-inflamatorias y, que la administración del compuesto tBHQ podría suprimir la inflamación intestinal y reducir el daño mucosal intestinal agudo inducidos post-trauma cerebral. En este mismo artículo se menciona que tBHQ protege líneas celulares y animales contra la toxicidad y el daño oxidativo agudos, posiblemente debido a la inducción de múltiples enzimas citoprotectoras y detoxificadoras tales como la epóxido hidrolasa, glutathion-S-transferasa y glucoroniltransferasa, Además, tBHQ tendría un rol inductor de HO-1, el que sería dependiente de calcio según se reporta en Cheung *et al.* (2011). También se ha descrito que en células dendríticas estimuladas con LPS, tBHQ inhibe potencialmente la expresión de IL-12. (Macocho *et al.* 2015).

Entonces, para evaluar si tBHQ ejerce un rol en la modulación de la respuesta inflamatoria crónica a nivel intestinal, disminuyendo la inflamación mucosal en EII, en este proyecto de tesis se propone evaluar los efectos anti-inflamatorios de esta molécula sobre HO-1 e

IL-12 en modelos de cultivo tanto *in vitro*, en líneas celulares Caco-2 y HT-29, como *ex vivo* en cultivos de PBMCs y de biopsias de zonas sanas y afectadas de tejido mucosal intestinal de pacientes afectados con EC, los cuales serán comparados con sujetos controles. Se cuantificará la expresión de HO-1 e IL-12. Se analizarán las citoquinas (TNF- α , IFN- γ e IL-10) por medio de las técnicas Q-PCR y ELISA múltiple en biopsias de tejido intestinal (tratadas como explantes) y en sobrenadantes de PBMC obtenidas de muestras de sangre (si es que se observan cambios a nivel de Q-PCR).

Cabe destacar, que no existen estudios previos que relacionen a tBHQ con enfermedad inflamatoria intestinal, específicamente, con enfermedad de Crohn, por lo cual se abre un extenso campo para evaluar las propiedades de este compuesto para el desarrollo de nuevas terapias, con menos efectos secundarios no deseados y de menor costo. De esta forma, tBHQ podría ser un prometedor compuesto terapéutico contra EII y también para numerosos procesos fisiopatológicos que involucran a HO-1 como aterosclerosis, asma y disfunciones miocárdicas, entre otros (Sánchez *et al.* 2005).

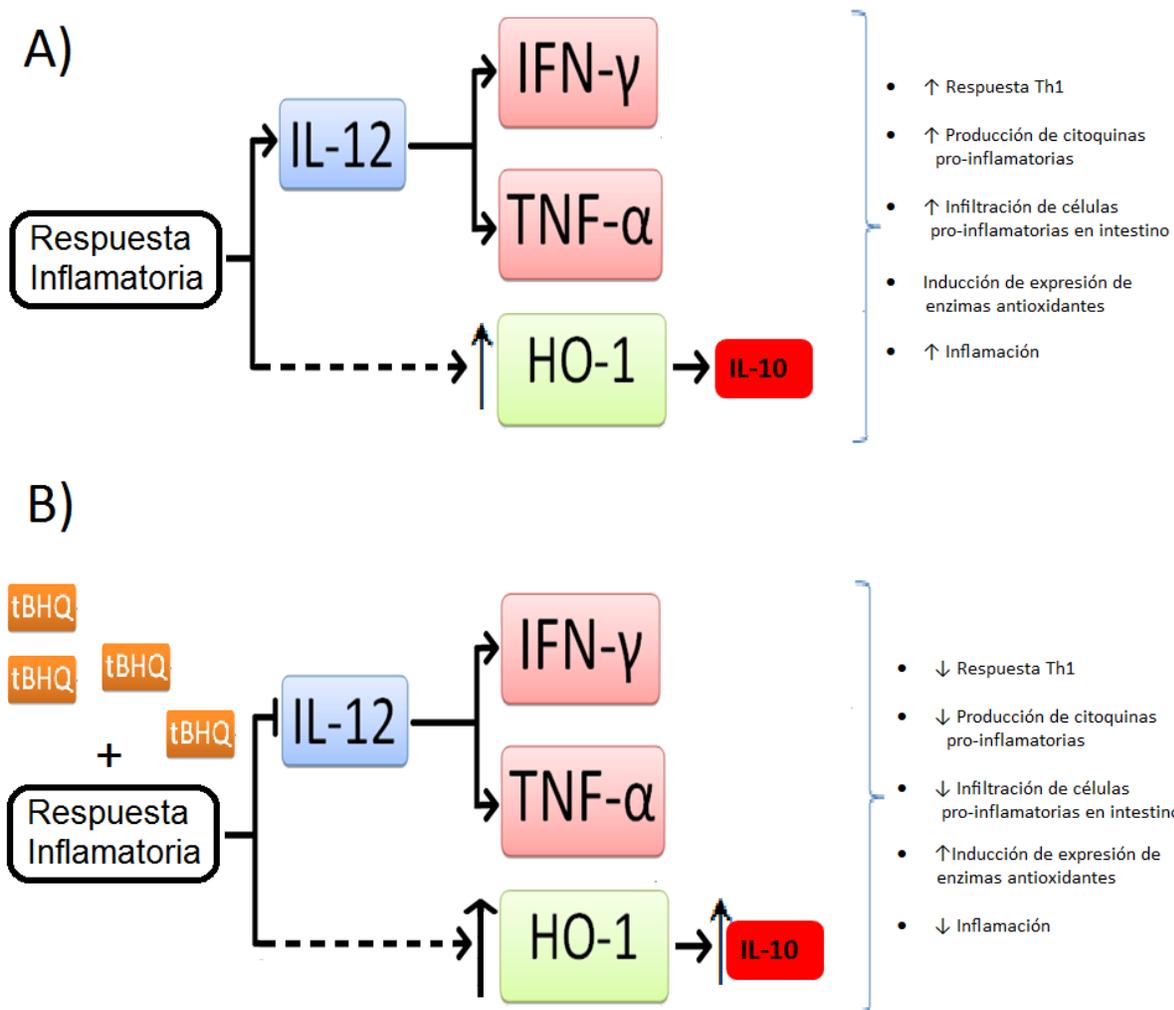


Figura 1. A Esquema de los efectos pro-inflamatorios generados durante la respuesta inflamatoria. B Esquema de efectos pro-inflamatorios y efectos anti-inflamatorios de tBHQ a evaluar en este proyecto.

3.2 Hipótesis

Sobre lo expuesto previamente nuestra hipótesis es:

“Tert-butil hidroquinona mediante su efecto sobre HO-1 e IL-12 disminuye la respuesta inflamatoria en la enfermedad inflamatoria intestinal Enfermedad de Crohn”.

3.3 Objetivos

3.3.1 **Objetivo General**

Evaluar el efecto anti-inflamatorio de tBHQ sobre la respuesta inflamatoria intestinal y sistémica en EII, en modelos *in vitro* y *ex vivo*.

3.3.2 **Objetivos Específicos**

1.- Evaluar el efecto anti-inflamatorio, *in vitro*, de la exposición a tBHQ en las líneas celulares de intestino, Caco-2 y HT-29.

Este objetivo se llevará a cabo realizando las siguientes actividades:

- Evaluación de la viabilidad celular en respuesta al tratamiento con tBHQ.
- Definir el agente inductor de inflamación evaluando los niveles de expresión de IL-8.
- Determinación del perfil de transcripción de HO-1, citoquinas pro-inflamatorias (IL-12, IL-8 y TNF- α)
- Estudiar la expresión proteica de HO-1 a través de ensayos de Inmunofluorescencia indirecta .

2.- Determinar el efecto anti-inflamatorio de tBHQ, *ex vivo*, en PBMCs de muestras de sangre obtenidas de pacientes con EC y de sujetos controles.

Este objetivo considera las siguientes actividades:

- Obtener y cultivar PBMCs de muestras de sangre de los sujetos incluidos en el estudio.

- Cuantificar la expresión de HO-1 como de las citoquinas IL-12, IL-8, IFN- γ y TNF- α e IL-10 en PBMCs post- tratamiento a tBHQ.

3.- Estudiar el efecto anti-inflamatorio de tBHQ, *ex vivo*, en cultivos de microexplantes de tejido colónico intestinal de pacientes afectados con EC y de sujetos control.

Este objetivo incluye las siguientes actividades:

- Cuantificar el nivel de expresión de HO-1 junto con el perfil de citoquinas pro-inflamatorias (IL-12, IL-8, IFN- γ y TNF- α) y anti-inflamatoria (IL-10).

- Cuantificar el nivel de secreción de citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatoria antes mencionadas, en respuesta al tratamiento con tBHQ.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

Los medios de cultivo (DMEM y RPMI 1640), solución de tripsina, solución de antibióticos –antimicótico y el medio separador de linfocitos eran Corning/Cellgro. El suero fetal bovino (SFB) era Biological Industries. Gentamicina era Gibco. tBHQ, LPS de *Salmonella typhimurium* 14028, NaHCO₃, KCl, KH₂PO₄, NaCl, Na₂HPO₄, PFA eran Sigma. CoPP era Enzo Life Sciences. MTT era Tocris. Las sales EDTA-di-sodio, NH₄Cl, KHCO₃ y el agua libre de nucleasas eran Winkler. El anticuerpo rabbit anti HO-1 era de Abcam y el anticuerpo anti rabbit Alexa Fluor 488 era Molecular Probes. Las sondas Taqman para las citoquinas evaluadas, para los “housekeeping” y para HO-1, el kit RNA-to-C_T Step One eran Applied Biosystems. El agua Ultra pura era Invitrogen. El TRIzol y RNA Later eran Ambion. El cloroformo, etanol absoluto e isopropanol, eran Merck. Kit de ELISA Múltiple era R&D.

4.2 Métodos según objetivo.

4.2.1 Métodos para responder el Objetivo N°1.

Evaluar el efecto anti-inflamatorio, in vitro, de la exposición a tBHQ en las líneas celulares de intestino, Caco-2 y HT-29.

Cultivo de líneas celulares.

Se cultivaron líneas celulares de epitelio intestinal humanas Caco-2 y HT-29, derivadas de adenocarcinoma de colon, según el protocolo descrito por Hilgendorf *et al.* (2000). En breve, las células fueron crecidas en frascos de cultivo celular T-25 (TPP, con filtro), con medio de cultivo DMEM (Ranaldi, Consalvo, Sambuy, & Scarino) y RPMI 1640 (Hekmati *et al.* 1990), respectivamente, suplementados con 10% SFB y 1% de solución de antibióticos-antimicóticos 100X (10.000µg/mL estreptomina, 25µg/mL anfotericina B, y 10.000UI/mL penicilina, Corning Cellgro), incubadas a 37°C y 5% CO₂ (Sierro *et al.* 2001), con un cambio de medio cada 2 días o según la necesidad debido a la rapidez de su proliferación. Una vez alcanzada la confluencia de alrededor del 70-80%, se descartó el medio de cultivo, se lavó con PBS y a la monocapa de células se le descartó el medio de cultivo, se lavó con PBS 1X (10mM Na₂HPO₄, 137mM NaCl, 1,8mM KH₂PO₄, 2,7mM KCl, pH 7,2 estéril) y fueron tratadas con tripsina 1X durante 10 minutos, en incubación a 37°C y 5% CO₂; cada tripsinización fue considerada un pasaje celular (Ferraretto *et al.* 2007). Luego, las células fueron sembradas y crecidas en pocillos de placas de 24 pocillos (TPP) a distintas densidades según el ensayo a realizar: se sembraron 250.000 células/mL por pocillo para el ensayo de MTT, 250.000 células/mL por pocillo para la obtención de RNA total ó 40.000 células/pocillo/mL (en baja densidad celular) sobre cubre-objetos redondos para inmunofluorescencia (anti HO-1). Luego de un día de crecimiento in vitro, las células fueron expuestas a las distintas condiciones, luego de haber definido las concentraciones a emplear de cada estímulo.

Evaluación de inducción de respuesta inmune en la línea celular intestinal Caco-2: LPS de Salmonella typhimurium versus infección con Salmonella typhimurium.

Para evaluar qué inductor de respuesta inmune usar, LPS de *Salmonella typhimurium* 14028 (*S. typhimurium*, Sigma) o hacer infección con *S. typhimurium* 14028, se cultivaron células de la línea Caco-2 en placas de 24 pocillos a una densidad de 250.000 células/mL por pocillo y se dejaron en incubación overnight a 37°C, 5% CO₂. Posteriormente, las células fueron

expuestas a distintas dosis de LPS de *S. typhimurium* (100 ng/ml, 1µg/ml y 10µg/ml) durante 3 y 24 horas en incubadora (2 cursos temporales) a 37°C y 5% CO₂.

Para realizar la infección con *S. typhimurium*, después de un día *in vitro*, se dejó un pocillo para hacer el recuento celular con azul de tripán en hemocitómetro: se tomó una alícuota de la suspensión de células de 10µL y se mezcló con 10µL de azul de tripán (Corning Cellgro), se homogeneizó y se pusieron 10µL en hemocitómetro. Con la cuantificación de células iniciales se pudo determinar la cantidad de *S. typhimurium* a agregar para tener los MOI (“multiplicity of infection”) a evaluar. Un vial de *S. typhimurium* se dejó creciendo en agitación a 150rpm, 37°C, “overnight” o hasta llegar a una densidad óptica (OD) igual a 0,65 (equivalente a 6,5X10⁸ UFC). A partir de este stock de *S. typhimurium* se prepararon sub-diluciones de la suspensión de bacteria con PBS, luego se centrifugaron a 8.000 rpm, 6 minutos, a 4°C y el pellet se resuspendió en DMEM suplementado con SFB (sin antibióticos), de modo de infectar agregando sólo 10µl de las sub-diluciones de *S. typhimurium* por pocillo para llegar a las distintas dosis de infección (MOI 10, MOI 50 Y MOI 100) (Elewaut *et al.* 1999). Luego se centrifugó a 2.000rpm, 5 minutos, 4°C, para favorecer el encuentro de la bacteria con las células, y se incubó a 37°C durante 2 y 24 horas (2 cursos temporales), 37°C. También se dejó un pocillo de cada MOI a evaluar para hacer el “ensayo de protección con gentamicina”. Para este ensayo se incubaron las células Caco-2 con la bacteria durante 1 hora, se recuperó el medio con la bacteria, se hicieron 3 lavados con PBS, se agregó 1ml con 100µg/mL gentamicina, se incubaron las células durante 1 hora, y luego se cambió la 100µg/mL gentamicina por 25µg/mL gentamicina hasta completar las 24h de incubación. Para el tiempo de 2h de incubación luego de la exposición con 100µg/mL gentamicina se acaba el ensayo.

Luego de los distintos tiempos de incubación con las distintas dosis de los tratamientos empleados (LPS de *S. typhimurium* e infección con *S. typhimurium*), se descartaron los sobrenadantes, se hicieron 3 lavados con PBS, se agregaron 300µL de TRIzol y se realizó “up and down” para soltar las células y obtener posteriormente su RNA total según protocolo de Ambion (ver más adelante Extracción de RNA total), para evaluar mediante Q-PCR con sondas Taqman la inducción del mRNA de IL-8 como marcador de inducción de respuesta inmune, para lo cual se siguieron las instrucciones de Applied Biosystems (ver más adelante Q-PCR con sondas Taqman.).

Para el caso de las células del ensayo de protección con gentamicina, se les retiró el medio, se lavaron con PBS y se agregó 1mL de PBS/pocillo para soltar las células. Se realizó el recuento celular con azul de tripan en hemocitómetro para conocer el número de células vivas que quedaron en los pocillos. Luego del recuento se calculó el volumen de 1% TRITÓN X-100 (en PBS) a agregar para lisar 100.000 células con 0,5% TRITÓN X-100. Se lisaron las células incubándolas 15 minutos a temperatura ambiente. La solución con TRITÓN-X100 que contenía las células lisadas expuestas a los distintos MOI se usaron para preparar diluciones seriadas 1:10, por triplicado, y fueron cultivadas en microgota (10 μ L), junto a la solución con las células lisadas sin diluir, en una placa con agar Luria Bertani (LB), durante 24h a 37°C. Los sobrenadantes de los pocillos de los distintos MOI evaluados se usaron para preparar diluciones seriadas 1:10, por duplicado, y cultivados en microgota (10 μ L), junto al sobrenadante sin diluir, en una placa con agar LB, durante 24h a 37°C. Posterior a las 24h de incubación se realizó el recuento de colonias obteniendo el conteo de UFC de *S. typhimurium* a nivel intracelular y extracelular.

Ensayo colorimétrico MTT (viabilidad celular)

El ensayo del MTT se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa produciéndose formazán, un compuesto de color púrpura, el cual se puede cuantificar, permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial y, por ende, el estado oxidoreductor de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir viabilidad celular (van de Loosdrecht *et al.* 1994) y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido (Lowe et al. 1999). Se utilizó este método para determinar el posible efecto de los estímulos a evaluar sobre viabilidad celular. El propósito de utilizar este ensayo fue definir dosis de tBHQ y, dosis de un inductor de inflamación sin afectar mayormente la viabilidad de las células, por lo cual, los datos de este ensayo fueron complementados con el análisis de los cambios de expresión en los niveles de mRNA de HO-1 e IL-8 antes de trabajar con ensayos que incluyeran la condición del co-estímulo tBHQ+LPS.

Para determinar la concentración de tBHQ y LPS de *S. typhimurium* se hicieron curvas dosis-respuesta considerando la información obtenida de la literatura y evaluando la viabilidad

celular mediante el ensayo colorimétrico de reducción de MTT, en ambas líneas celulares, Caco-2 y HT29. En células Caco-2, se probaron dosis de tBHQ entre 2 μ M-200 μ M durante 24h de exposición. En células HT-29, se probaron dosis de tBHQ entre 2 μ M-300 μ M durante 24h de exposición. Para LPS de *S. typhimurium* sólo se evaluó la viabilidad en curva dosis-respuesta en las células HT-29, la curva incluyó 3 concentraciones 10ng/ml, 100ng/ml y 1 μ g/mL y el tiempo de incubación fue de 3h.

En breve, luego de sembrar las 250.000 células/pocillo con 1mL de medio e incubar por un día *in vitro*, las células Caco2/HT-29 fueron expuestas a las distintas condiciones, por duplicado, siempre se incluyó un control sin estímulo. Las condiciones evaluadas fueron: tBHQ (24h), LPS (3h) (como inductor de inflamación) y el co-estímulo tBHQ (24h) + LPS (3h) (para evaluar el efecto protector de tBHQ como agente anti-inflamatorio). Como se usó CoPP como control positivo de expresión de HO-1 también se incluyó en este grupo de condiciones como tratamiento a 100 μ M (24h). Luego del tiempo de incubación, se recuperó el medio, los pocillos se lavaron con PBS pH 7,2 estéril, se agregó 1mL de 0,25mg/mL MTT en DMEM suplementado/RPMI1640 suplementado, según la línea celular usada. Se incubó con MTT durante 2h a 37°C y 5% CO₂, se descartó el medio con MTT y se agregó 1mL de metanol para, posteriormente, dejar en incubación toda la noche a 4°C para disolver los cristales de formazán. Finalmente, se traspasaron 200 μ L de cada pocillo a un pocillo de una placa de 96 pocillos (fondo plano, TPP) y se leyó la absorbancia a 570nm en el multilector Synergy HT, Biotek.

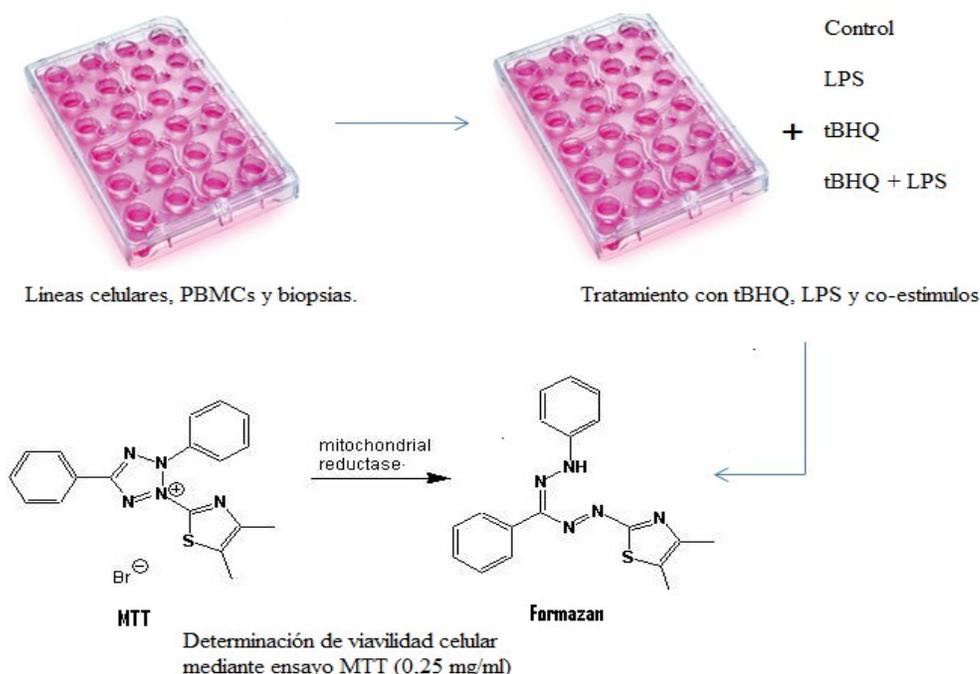


Figura 2: Esquema general de trabajo con líneas celulares y tratamientos a realizar (para los 3 objetivos específicos propuestos) para su posterior análisis de la viabilidad celular mediante el ensayo de reducción del MTT.

Extracción de RNA total.

A partir de las células sembradas en la placa de 24 pocillos y tratadas con las distintas condiciones y distintos tiempos determinados previamente, se recuperaron los sobrenadantes para su posterior uso en la determinación de citoquinas secretadas, y las células fueron empleadas para la obtención del RNA total, el cual se usó para la determinación de los posibles cambios en los niveles de expresión de los mRNA de las proteínas de interés evaluadas (HO-1, citoquinas) usando la técnica PCR cuantitativa en tiempo real, con transcripción reversa (explicada más adelante).

En resumen, luego de recuperar los sobrenadantes y guardarlos a -80°C hasta su uso, se agregaron $500\mu\text{L}$ de TRIzol a cada pocillo, se realizó “up and down” con la micropipeta hasta soltar las células, el contenido se traspasó a un tubo eppendorf de $1,5\text{mL}$. Si no eran usados de inmediato, las células eran guardadas en TRIzol a -80°C hasta su uso. En el momento de su uso (luego del descongelamiento en frío), se hace “up and down” con la micropipeta para lisar las

células, luego se dejaron 5 minutos a temperatura ambiente para favorecer la disociación de los complejos nucleoproteicos. Posteriormente, se agregaron 100 μ L de Cloroformo a cada microtubo y se agitaron vigorosamente con la mano durante 15 segundos, luego se incubaron 3 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12.000g, durante 15 minutos, a 4°C (Centrífuga Eppendorf refrigerada, modelo 5417R), se recuperó la fase acuosa (fase superior, incolora) y se traspasó a un nuevo microtubo para agregar iso-propanol en la proporción 1:1, y se incubó “overnight” a -20°C. Posteriormente, se mezclaron las fases por inversión suave de los tubos, luego se centrifugó a 12.000g, durante 10 minutos, a 4°C, se descartó el sobrenadante, el pellet se lavó con 500 μ L de etanol 75% (etanol absoluto preparado con agua libre de nucleasas), se centrifugó a 7.500g, durante 5 minutos, a 4°C. Se descartó cuidadosamente el sobrenadante, se secó sobre mesón el RNA (pellet) durante 20 minutos a temperatura ambiente., se resuspendió el RNA en 30 μ L agua ultra pura, se hizo un pequeño “spin down” y se congeló a -80°C hasta su uso. Finalmente, al momento de usar, se descongeló en frío y se cuantificó en NanoDrop (Thermo Scientific, modelo ND-1000).

Q-PCR usando sondas Taqman.

Luego de la obtención de RNA total se cuantificaron los niveles de expresión de mRNA de HO-1, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- γ y TNF- α mediante Q-PCR según las instrucciones de la empresa Applied Biosystems.

En resumen, las muestras de RNA total (100ng/tubo) fueron analizadas por duplicado y se normalizaron con el “housekeeping” B2M de manera de obtener como resultado final la cuantificación relativa normalizada por el método de análisis $\Delta\Delta C_T$, desarrollado para este tipo de estudio por Applied Biosystems (Perkin Elmer, Forster City, CA). Los reactivos para el ensayo fueron: Kit Taqman RNA-to- C_T One-Step, que incluye el RT_PCR mix y la enzima transcriptasa reversa (RT) de Applied BioSystems, sondas Taqman específicas Applied Biosystems (ver tabla 2), agua ultra pura libre de DNAsa/RNAsa, estéril (Ambion) (ver tabla 3). El programa “step-one v2.2.2” fue utilizado para obtener los C_T de las muestras. El perfil termal empleado fue el sugerido por la empresa manufacturera del Kit antes mencionado (ver tabla 4) y el equipo utilizado fue Step-One RT PCR, de Applied BioSystems. Los análisis fueron

realizados considerando el control sin estímulo de cada experimento independiente para comparar los otros datos del experimento.

Tabla 2: Sondas TaqMan® para Q-PCR.

Gen	Sonda	Tamaño Amplicon	Localización
HO-1	Hs01110250_m1	82 pb	Cromosoma 22 NC_000022.11 (35381067..35394214)
TNF- α	Hs00174128_m1	80 pb	Cromosoma 6 NC_000006.12 (31575567..31578336)
IFN- γ	Hs00989291_m1	73 pb	Cromosoma 12 NC_000012.12 (68154770..68159741)
IL-8	Hs00174103_m1	101 pb	Cromosoma 4 NC_000004.12 (73740506..73743716)
IL-10	Hs00961622_m1	74 pb	Cromosoma 1 NC_000001.11 (206767603.206772494)
IL-12a	Hs01073447_m1	55 pb	Cromosoma 3 NC_000003.12 (159988836.159996019)
B2M	Hs00187842_m1	64 pb	Cromosoma 15 NC_000015.10 (44711487..44718159)

Tabla 3: Mezcla de reacción para la cuantificación de mRNA por Q-PCR.

Componentes	Volumen/Muestra
Taqman RT-PCR mix (Kit)	5 μ L
Sonda Taqman	0,5 μ L
Taqman Enzima RT mix (kit)	0,2 μ L
Agua libre de Nucleasas ultra pura	3,3 μ L
Total Volumen/muestra	9 μ L

Tabla 4: Perfil termal para Q-PCR. Se hicieron 40 ciclos de denaturación-alineamiento/extensión.

Programa Q-PCR	Temperatura (°C)	Tiempo
RT Step	48	15 min
Activación Taq	95	10 min
Denaturación	95	15 seg
Alineamiento/Extensión	60	1 min

Inmunofluorescencia indirecta para HO-1 en células HT-29.

Una vez evaluada la expresión proteica de las citoquinas por ELISA múltiple, faltaba evaluar la expresión proteica de HO-1 bajo los distintos estímulos, para lo cual cumplido el tiempo de incubación con las condiciones, a las células sembradas en baja densidad sobre cubre-objetos redondos, se les realizó una inmunofluorescencia indirecta, en breve: se les eliminó el sobrenadante, se lavaron con PBS pH7,2 2 veces, se fijaron con 4% PFA (PBS pH 7,2) durante 15 minutos a temperatura ambiente, se lavaron 2 veces con PBS pH7,2, se permeabilizaron con 300µL/pocillo de PBS-1% SFB-0,06%TRITON X-100 durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego a los cubre-objetos se les bloquearon los sitios inespecíficos con 50µL PBS-1% SFB (en gota sobre parafilm), durante 30 minutos, a temperatura ambiente, en una cámara húmeda. Posteriormente, se incubaron en gota con el anticuerpo primario rabbit anti HO-1 1:500 (en buffer de bloqueo) por 2h a temperatura ambiente, en cámara húmeda, se lavaron 3 veces con PBS pH7,2 con inmersión y escurrimiento sobre papel absorbente. Se incubaron en gota con el anticuerpo anti rabbit Alexa Fluor-488 durante 1h, a temperatura ambiente, en cámara húmeda y oscura. Luego, se lavaron 3 veces con PBS pH7,2 con inmersión y escurrimiento sobre papel absorbente y una vez con agua destilada antes de montar los cubreobjetos con medio de montaje VectaShield con DAPI (Vector), acuoso (8µL /cubre-objeto) y , finalmente, se sellaron los cubre-objetos con brillo de uñas. Se consideró para esta técnica pocillos estimulados con 100µM CoPP, como control positivo de inducción de expresión de HO-1. También se consideró el uso de un

cubre-objetos para hacer el control negativo, sin anticuerpo primario. Se dejaron a temperatura ambiente hasta que se secaran y luego se guardaron a 4°C hasta su observación. Se tomaron microfotografías con un objetivo 40X en microscopio Nikon Eclipse acoplado a cámara Nikon modelo DS-Fi1 con lente Zeiss. Se tomaron 4-5 microfotografías por cubre-objeto para DAPI y para HO-1 por campo en cada condición. Se realizaron 3 experimentos independientes, dos de ellos con todas las condiciones en duplicado y el tercero fue sólo con un cubre-objeto por condición. Con el software “Image J Fiji” se realizó la cuantificación de núcleos DAPI para la cuantificación total de células por cover, se cuantificaron las células con marca positiva para HO-1 totales, se cuantificaron las células que presentaron marca microsomal (retículo endoplasmico) de HO-1, marca punteada de HO-1 y doble marca (microsomal y punteada) de HO-1. Los resultados se expresaron como % respecto a las células DAPI (+). Se realizó el análisis de los datos obtenidos con software Graph Pad Prisma 6. Se analizaron los datos con el test no pareado, no paramétrico, Kruskal Wallis, y un post-test de Dunn’s, con $\alpha=0,05$.

4.2.2 Métodos para responder el *Objetivo N°2*.

Determinar el efecto anti-inflamatorio de tBHQ, ex vivo, en PBMCs de muestras de sangre obtenidas de pacientes con EC y de sujetos controles.

Reclutamiento de individuos para el estudio.

Se reclutaron sujetos control y pacientes con EC que consultaron en la Unidad de EII del Departamento de Gastroenterología, de la Escuela de Medicina, de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

Los sujetos controles elegidos para este estudio fueron pacientes mayores de 18 años sin reconocimiento de enfermedad intestinal, enfermedad infecciosa o auto-inmunitaria, que asistieron al Hospital Clínico de la Red de Salud UC-CHRISTUS para examen endoscópico debido al síndrome del intestino irritable, control de salud e historia familiar de cáncer digestivo.

Los sujetos controles ingresados al estudio firmaron el consentimiento informado- 3 (Anexo 1) del Proyecto FONDECYT 1131012 aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile (Anexo 3), accediendo a un examen de colon normal que incluye la extracción de micro-explantos y la toma de muestras de sangre .

Con respecto a los pacientes con EC reclutados, se consideraron los siguientes criterios de inclusión: EC diagnosticada según criterios clínicos, radiológicos, endoscópicos e histológicos; sujetos mayores de 18 años de edad; firma del consentimiento informado-2 (Anexo 2) del Proyecto FONDECYT 1131012, aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile (Anexo 3). El consentimiento detalla, entre otros, la obtención de biopsias mediante procedimiento endoscópico y obtención de muestras de sangre. Los pacientes con EC eran excluidos si presentaban alguno de los siguientes criterios: anemia con hematocrito menor a 20%, embarazadas o mujeres en período de lactancia, difícil acceso venoso o complicaciones en la extracción de sangre mayor a 6mL/Kg, sujetos con diagnóstico actual de Colitis Ulcerosa, Colitis Isquémica, Enfermedad de Behcet o colitis debido al uso de fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINES).

Obtención de muestras de los sujetos incluidos en el estudio.

A cada sujeto reclutado para este estudio se le realizó una completa evaluación clínica. Se obtuvo una muestra de sangre periférica de los pacientes recibida en dos tubos estériles con heparina sódica (BD Vacutainer® de 10mL).

Extracción de células polimorfonucleares de sangre periférica (PBMC).

De las muestras de sangre se extrajeron PBMCs, en esterilidad, en un gabinete de seguridad clase II (NUARE, modelo Labgard), mediante el método de separación en gradiente de densidad con Ficoll. El propósito era cultivarlas y exponerlas a los distintos estímulos y recuperar las PBMCs para evaluar la expresión de HO-1 y de las citoquinas mediante Q-PCR (ver más adelante). En breve, para la obtención de PBMC, se traspasaron 20 mL de sangre a un tubo de centrifuga cónico de 50mL (Labcon®), se agregaron 15mL de PBS 1X estéril y se homogeneizó

su contenido suavemente. La sangre diluida se agregó lentamente en otro tubo cónico que contenía 12,5mL de “medio de separación de linfocitos” (Corning). Luego se centrifugó a 990g sin freno durante 30 minutos a temperatura ambiente (centrífuga Hermle labortechnik GmbH, modelo Z326K). Se traspasó la fase de la “nube” de PBMC (varió de 5-12mL) a un nuevo tubo cónico de 50mL y se diluyó con PBS 1X hasta 40mL. Se centrifugó a 990g con freno, a temperatura ambiente durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó con 5mL de ACK 1X (150mM NH₄Cl, 0,37mM K₂CO₃, 0,1mM EDTA) por 5 min, posteriormente se traspasó el volumen completo a un tubo cónico de 15mL y se agregó PBS 1X para completar un volumen de 15mL. Se tomó una alícuota de la suspensión de células de 10μL y se mezcló con 10μL de azul de tripán (Corning Cellgro), se homogeneizó y se pusieron 10μL en hemocitómetro. Finalmente, se centrifugó a 990g por 10 min, el pellet fue resuspendido en SFB con 10% dimetil sulfóxido (DMSO, Calbiochem®) y se guardaron 6x10⁶ células/mL en crioviales estériles (SSI) a -80°C. Las muestras destinadas a experimentos a largo plazo fueron guardadas en nitrógeno líquido.

Descongelamiento, cultivo y tratamiento de PBMC.

Los crioviales con PBMCs fueron descongelados incubándolos en una estufa de cultivo celular (NUARE, modelo UN-5500E) por 2 minutos a 37°C y 5% CO₂. A continuación se trabajó en un gabinete de bioseguridad clase II (NUARE, modelo Labgard). Se diluyó el DMSO de la suspensión celular agregando 5mL de medio RPMI 1640 sin suplementar (sin suero, sin antibióticos) a 37°C, se tomó una alícuota de 10μL para hacer el recuento celular con azul de tripán como se ha descrito anteriormente mientras las células eran centrifugadas a 990g por 10 minutos a temperatura ambiente. Las células fueron resuspendidas en RPMI 1640 suplementado con 10% SFB, 100U/mL penicilina, 100μg/mL estreptomycin y 25μg/mL anfotericina (solución de antibióticos-antimicótico 1X, Corning). Las células se sembraron a una densidad de 5x10⁵ células/mL por pocillo en placa de 24 pocillos (TPP) y se incubaron toda la noche en estufa de cultivo celular 37°C y 5% CO₂ (Chang *et al.* 1999). Posteriormente, las células fueron tratadas con las distintas condiciones a evaluar en este modelo definidas de acuerdo a la literatura (tiempos y dosis), en células de sujetos controles: Control sin estímulo (medio RPMI 1640 suplementado con 10% SFB y mezcla de antibióticos 1X), 5μM tBHQ (24h) (Turley *et al.* 2015),

25µg/mL LPS de *S. typhimurium* 14028s (24h), el co-estímulo 5µM tBHQ (24h)+25µg/mL LPS de *S. typhimurium* 14028s (24h) y 25µM CoPP.

Para la definición de condiciones, como en el objetivo N° 1, se complementaron los resultados de los ensayos de MTT de las curvas dosis-respuesta para tBHQ y LPS de *S. typhimurium* 14028s con los resultados de Q-PCR para la expresión de HO-1 frente al tratamiento de tBHQ e IL-8 frente al tratamiento de LPS de *S. typhimurium* 14028s. Para ello, se debieron hacer leves modificaciones en el ensayo colorimétrico del MTT y en la extracción de RNA total para este modelo. A continuación se describe el detalle de ambos protocolos.

Ensayo colorimétrico MTT (viabilidad celular).

Una vez descongeladas las células PBMCs, como se describió anteriormente, se sembraron 500.000 células/ml/pocillo en placa de 24 pocillos en medio (RPMI suplementado con 1%SFB, y solución de antibióticos-antimicótico 1X), en duplicado para cada tratamiento. Luego de un día en cultivo, las células fueron tratadas con las distintas dosis a probar en las curvas dosis-respuesta. Después del tiempo de tratamiento, se descartó el medio, se agregó 1mL por pocillo de 0,25mg/mL MTT (en medio RPMI 1640 a partir de una solución stock de 5mg/mL, preparada en PBS estéril 1X), y se incubó durante 2h en estufa de cultivo a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente, se retiró lentamente la solución de MTT de los pocillos debido a que son células no adherentes, y se agregó 1mL de metanol absoluto y se dejó incubando durante toda la noche a 4°C. Finalmente, se tomaron 200µL de cada pocillo, se agregaron a los pocillos de una placa de 96 pocillos (de fondo plano) y se leyó la absorbancia a 570nm.

Extracción de RNA total de PBMC.

A partir de las PBMCs tratadas con las distintas condiciones determinados previamente para este modelo, se recuperaron los sobrenadantes para su posterior uso en la determinación de citoquinas secretadas, y las células fueron empleadas para la obtención del RNA total, el cual se usó para la determinación de los posibles cambios en los niveles de expresión de los mRNA de

las proteínas de interés evaluadas (HO-1, citoquinas) usando la técnica PCR cuantitativa en tiempo real, con transcripción reversa (explicada más adelante).

Por ser células no adherentes, cumplido el tiempo de incubación con las condiciones se procedió a recuperar los medios con las células en un microtubo y fueron centrifugados a 990g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se guardó a -80°C para su posterior uso en la evaluación de citoquinas secretadas y el pellet de células fue usado para la extracción de RNA total. Al pellet obtenido se le agregaron inicialmente $100\mu\text{L}$ TRIzol, y para obtener todas las células de los pocillos de la placa, éstos se lavaron con $400\mu\text{L}$ adicionales de TRIzol y se agregaron a los $100\mu\text{L}$ de TRIzol anteriores; se realizó suavemente “up and down” con la micropipeta 5 veces para lisar las células, la suspensión se congeló a -80°C y luego se descongeló en frío para debilitar las membranas. Se centrifugó a 12.000g durante 10 minutos a 4°C . Posteriormente, se agregaron $100\mu\text{L}$ de cloroformo a cada microtubo, se agitaron los tubos vigorosamente con la mano durante 15 segundos, se dejaron incubando sobre el mesón durante 3 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12.000g , 15 minutos a 4°C (Centrífuga Eppendorf refrigerada, modelo 5417R), se recuperó la fase acuosa (fase superior, incolora) y se traspasó a un nuevo microtubo, al cual se agregó iso-propanol en la proporción 1:1, y se incubó “overnight” a -20°C . Posteriormente, se mezclaron las fases por inversión suave de los tubos, luego se centrifugó a 12.000g , 10 minutos a 4°C , se descartó el sobrenadante, el pellet se lavó con $500\mu\text{L}$ de etanol 75% (etanol absoluto preparado con agua libre de nucleasas), se centrifugó a 7.500g , durante 5 minutos, a 4°C . Se descartó cuidadosamente el sobrenadante, se secó el RNA (pellet) sobre el mesón durante 20 minutos a temperatura ambiente, se resuspendió el RNA en $20\mu\text{L}$ agua ultra pura, se hizo un pequeño “spin down” y se congeló a -80°C hasta su uso. Finalmente, al momento de usar, se descongeló en frío y se cuantificó en NanoDrop (Thermo Scientific, modelo ND-1000).

Q-PCR usando sondas Taqman.

Luego de la obtención de RNA total se cuantificaron los niveles de expresión de mRNA de HO-1, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- γ y TNF- α mediante Q-PCR según las instrucciones de la empresa Applied Biosystems. El esquema seguido fue el mismo que para el Q-PCR de células

de línea celular, con la diferencia que para este modelo se utilizó el “housekeeping” GAPDH (Sonda Hs99999905-m1, amplicón 122pb, localización cromosoma 12).

4.2.3 Métodos para responder el *Objetivo N°3*.

Estudiar el efecto anti-inflamatorio de tBHQ, ex vivo, en cultivos de microexplantes de tejido colónico intestinal de pacientes afectados con EC y de sujetos control.

Reclutamiento de Sujetos para el Estudio.

Se reclutaron sujetos control y pacientes con EC que consultaron en la Unidad de EII del Departamento de Gastroenterología, de la Escuela de Medicina, de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

Los sujetos controles y pacientes reclutados en este estudio cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión mencionados en la metodología del objetivo N°2 (Anexo 1 y 2), accediendo a un examen de colonoscopia que incluye la extracción de micro-explantes y la toma de muestras de sangre. Para este objetivo sólo se usaron los micro explantes.

Obtención de muestras de los sujetos incluidos en el estudio.

A los sujetos enrolados en el estudio que fueron sometidos a una evaluación endoscópica, se les tomaron micro muestras de tejido de colon (micro explantes), las cuales fueron recibidas en medio RPMI 1640 1X con L-glutamina y 25mM de HEPES (Corning) suplementado con 10%SFB inactivado.

Cultivo de micro explantes.

Los explantes fueron cultivados modificando el protocolo descrito por Borrueal *et al.* (2002). Los micro explantes de colon (2/pocillo, en placa de 24 pocillos) fueron pre-incubadas en

1,5mL/pocillo con RPMI 1640 suplementado con 10%SFB, 1X solución de antibióticos-antimicótico y 50µg/mL de gentamicina (Gibco) (medio 1) por una hora a 37°C y 5% CO₂, para erradicar la flora autóctona y equilibrar el tejido con las condiciones de cultivo. La incubación con los distintos tratamientos se hizo en 1,5mL de RPMI 1640 suplementado con 10%SFB, 1X solución de antibióticos y 24mmol/L NaHCO₃ (medio 2). Se añadió bicarbonato de sodio para evitar la acidificación del medio por el metabolismo bacteriano y la penicilina para prevenir el sobre-crecimiento bacteriano.

Los tratamientos fueron definidos considerando la información obtenida de la literatura, la cual fue replicada en este modelo *ex vivo* y fue complementada con el ensayo de viabilidad MTT y determinación de niveles de mRNA de IL-8 por Q-PCR para definir las condiciones (concentraciones y tiempo). Una vez definidos los tratamientos, los explantes fueron cultivados como se explicó anteriormente, y fueron expuestos durante 24 horas a: Control sin estímulo, 500µM tBHQ, 1µg/mL LPS de *S. tiphymurium*, co-estímulo de 500µM tBHQ +1 µg/mL LPS de *S. tiphymurium* y 100µM CoPP e incubados por 24h, a 37°C y 5% de CO₂.

Los cultivos de los micro explantes se emplearon para el ensayo de viabilidad MTT modificado levemente para este modelo (ver más adelante); una vez definidos los tratamientos, se recuperaron los tejidos en RNA later (Ambion) y fueron almacenados a -80°C hasta su uso para la extracción de RNA total también levemente modificada para este modelo (ver más adelante), para la cuantificación del mRNA de HO-1 y citoquinas mediante Q-PCR como se realizó en los objetivos N° 1 y 2; y, para la evaluación de las citoquinas secretadas por los explantes de los sujetos controles y pacientes con EC, evaluadas por ELISA múltiple.

Ensayo colorimétrico MTT (viabilidad celular).

Los micro explantes de colon se colocaron en los pocillos de placa de 24 pocillos en 1,5 mL de RPMI 1640 suplementado con 10%SFB, 1X solución de antibióticos-antimicótico y 50µg/mL gentamicina, en duplicado para cada tratamiento, y se incubaron durante 1h en estufa de cultivo a 37°C y 5%CO₂. Luego se cambió el medio 1 por 1,5mL del RPMI 1640 suplementado con 10%SFB, 1X mezcla de antibióticos y 24mmol/L NaHCO₃ con los tratamientos. Los micro explantes fueron tratados con las distintas dosis a probar en las curvas

dosis-respuesta. Después del tiempo de tratamiento, se descartó el medio, se lavaron 5 veces los pocillos con 1mL de 1X PBS pH 7,2 estéril, se agregó 1mL por pocillo de 0,25mg/mL MTT (en medio RPMI1640 a partir de una solución stock de 5mg/mL, preparada en PBS estéril 1X), y se incubó durante 3h en estufa de cultivo, a 37°C con 5% CO₂. Posteriormente, se retiró la solución de MTT de los pocillos, se agregó 1mL de metanol absoluto y se dejó incubando durante toda la noche a 4°C. Finalmente, se tomaron 200µL de cada pocillo, se agregaron a los pocillos de una placa de 96 pocillos (de fondo plano) y se leyó la absorbancia a 570nm. Las muestras intestinales de los pocillos fueron secadas a temperatura ambiente y pesadas en la balanza analítica para ajustar el valor de absorbancia/por peso seco.

Extracción de RNA total de explante intestinal de colon.

Se descongelaron los explantes guardados en RNA later en frío. Luego se traspasaron a 500 µL de TRIzol en un homogenizador de vidrio y se realizaron 3 ciclos de 10 segundos de disrupción tisular mecánica con un vástago rugoso. Una vez obtenido el homogeneizado, este era traspasado a un microtubo que se dejaba en hielo mientras se procesaban las otras muestras. Posteriormente, se dejaron todos los homogeneizados obtenidos durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregaron 100µL de cloroformo a cada microtubo, se agitaron vigorosamente con la mano 15 segundos y se incubaron durante 3 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugaron a 12.000g por 15 minutos a 4°C, se recolectó la fase acuosa (clara, superior) en otro microtubo, se agregó iso-propanol en relación 1:1, se hizo inversión suave del microtubo y se dejaron 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12.000g durante 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante, se lavó el pellet con 500µL de Etanol 75% (en H₂O libre de nucleasa.). Se centrifugó a 7.500g por 5 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante, se secó el pellet de RNA a temperatura ambiente por 20 minutos, se resuspendió en 30µL de agua ultra pura libre de nucleasas, se hizo un spin y se congeló a -80°C hasta su uso. . Finalmente, al momento de usar, se descongeló en frío y se cuantificó en NanoDrop (Thermo Scientific, ND-1000).

Q-PCR usando sondas Taqman para la cuantificación de los niveles de mRNA de explantes.

Luego de la obtención de RNA total se cuantificaron los niveles de expresión de mRNA de HO-1, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- γ y TNF- α mediante Q-PCR según las instrucciones de la empresa Applied Biosystems como se describió en el objetivo N° 1, utilizando el “housekeeping” B2M, con la misma preparación de la mezcla de reacción y el mismo perfil termal (ver tablas 3y 4). Pero a diferencia del objetivo N°1, los análisis fueron realizados de 2 formas: **A.**-considerando el control sin estímulo de cada experimento independiente para normalizar los otros datos del mismo experimento y evaluar la capacidad de respuesta de las biopsias dentro de un mismo grupo de individuos; **B.**- considerando el promedio del grupo de sujetos controles expuestos al medio sin estímulo para normalizar los otros datos del mismo grupo de los sujetos controles expuestos a los distintos estímulos y para normalizar los datos obtenidos en los pacientes con EC (zona sana o zona afectada) y, de este modo, comparar las diferencias entre poblaciones de datos de los individuos estando sus muestras expuestas a distintos tratamientos.

ELISA múltiple.

Los sobrenadantes obtenidos de los cultivos de los micro explantes que fueron expuestos a las distintas condiciones fueron descongelados en frío para realizar el análisis del perfil de citoquinas secretadas, IL-8, IL-10, IL-12 , IFN- γ y TNF- α , utilizando el kit Magnetic Luminex Assay de R&D Systems de acuerdo a las instrucciones del fabricante del kit, armado a pedido según las citoquinas de interés, con perlas magnéticas, cuya lectura se realizó en el equipo LUMINEX 200, a través del servicio del Laboratorio de Virología del ICBM de la Universidad de Chile (servicio contratado). El ensayo se realizó con las muestras de sobrenadantes de cultivo celular de los micro explantes tratadas con distintas condiciones: control (no tratadas), 1 μ g/mL LPS(3h), 500 μ M tBHQ(24h) y el co-estímulo LPS+tBHQ durante 24 horas. Las muestras fueron diluidas 1:2 utilizando Calibrator diluent RD6-52, a 60 μ L de muestras se agregó 60 μ L de buffer. El ensayo se hizo en duplicado con 50 μ L de la muestra diluida. El panel incluyó las siguientes citoquinas: IL8, IL-10, IFN- γ , IL12p70 y TNF- α . La curva estándar de 7 puntos se hizo con una

dilución seriada 1:3 (ver más abajo). El análisis de datos de la cantidad de citoquinas secretadas, se realizó utilizando el software Xponent del equipo LUMINEX 200.

Tabla 5: Curva estándar del ELISA Múltiple para las distintas citoquinas analizadas.

pg/mL	TNF- α	IL-8	IL-10	IFN- γ	IL12p70
SD7	2.170	1.060	790	11.220	32.210
SD6	723	353	263	3.740	10.737
SD5	241	118	87,8	1.247	3.579
SD4	80,4	39,3	29,3	416	1.193
SD3	26,8	13,1	9,75	139	398
SD2	8,93	4,36	3,25	46,2	133
SD1	2,98	1,45	1,08	15,4	44,2

5 RESULTADOS

5.1 1.- Evaluar el efecto anti-inflamatorio, *in vitro*, de la exposición a tBHQ en las líneas celulares de intestino, Caco-2 y HT-29.

Evaluación del inductor de respuesta inflamatoria empleando ensayo de viabilidad celular (MTT) en curvas dosis-respuesta de LPS de *S.typhimurium* en la línea celular intestinal Caco-2 y HT-29 y, expresión de mRNA de IL-8 por Q-PCR.

Para poder determinar el posible efecto inductor pro-inflamatorio de LPS/*S. typhimurium*, se utilizaron distintas dosis de los posibles agentes inductores evaluando los niveles de expresión de mRNA de IL-8 (como marcador pro-inflamatorio de célula epitelial) y la viabilidad celular en las líneas celulares Caco-2 y HT-29. Debido a antecedentes que señalan que las células Caco-2

son poco responsivas frente a LPS, se realizaron tratamientos con las dosis de LPS de 10 y 100 ng/ml y 1 µg/ml (descritas por literatura), junto con ensayos de infección con *S.typhimurium* a distintas multiplicidades de infección (MOI), utilizando MOI de 10, 50 y 100, realizando tratamientos de 2 y 24 horas (Fig. 3). Se puede observar que ninguna de las dosis probadas de LPS y de MOI de infección, modifican significativamente la expresión de mRNA de IL-8 en las células Caco-2, tanto a tiempos cortos (Fig. 3a) como a tiempos prolongados (Fig. 3b).

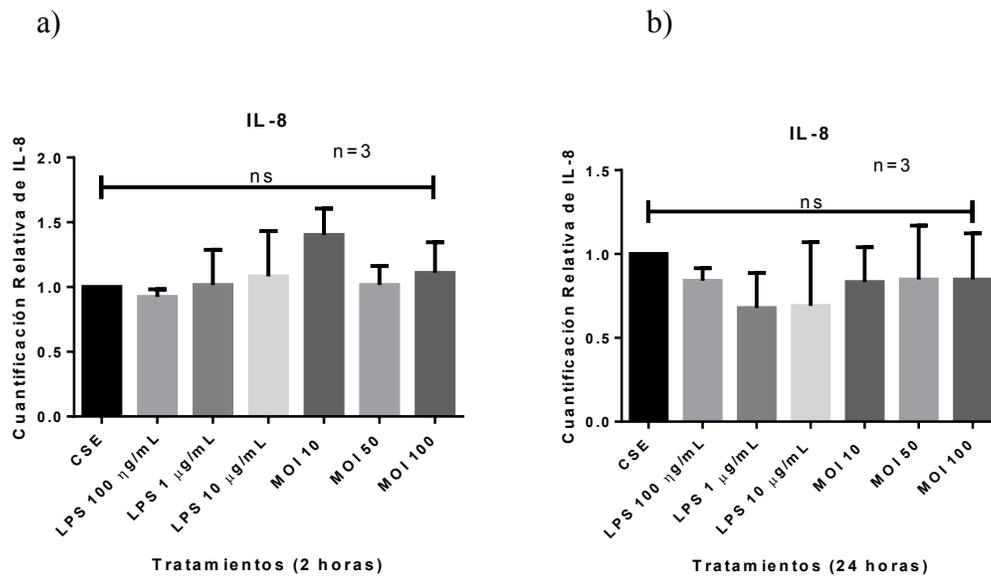


Figura 3: Niveles de expresión de IL-8, utilizando como inductor de respuesta inflamatoria LPS de *S. Typhimurium* e infección con *S. Typhimurium* a tiempos de estímulo de 2 horas (a) y 24 horas (b), cuantificados mediante Q-PCR en células Caco-2. Anova 1 vía, valores repetidos, paramétrico, post-test Tukey. Cuantificación Relativa+SEM.

Por otro lado, con el propósito de analizar el efecto de tBHQ en la línea Caco-2, se analizó el efecto de este compuesto sobre la viabilidad celular, realizando curvas dosis-respuesta a distintas concentraciones de tBHQ. Para ésto las células fueron expuestas durante 24 horas de con dosis micromolares crecientes de tBHQ (2, 20, 50, 100 y 200 µM), seguidas de ensayos MTT. Se pudo determinar que ninguna de las dosis utilizadas modificaron de manera significativa la actividad mitocondrial en la línea celular Caco-2, lo que se relaciona a que no hubo cambios en el porcentaje de viabilidad celular (Fig. 3).

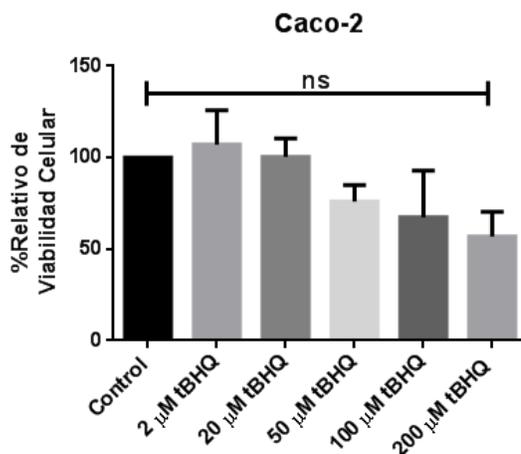


Figura 4. Curva dosis-respuesta de concentraciones crecientes de tBHQ realizadas en la línea celular intestinal Caco-2 evaluando la viabilidad celular mediante MTT. Porcentaje de viabilidad celular expresado con respecto al control (% viabilidad + DS). Anova 1 vía, simple, post-test Tukey.

Debido a los resultados mostrados en las figuras 3a y 3b, que señalan nula respuesta de las células Caco-2 frente a los agentes inductores de inflamación usados, es que se decidió no continuar trabajando con esta línea celular, a pesar de que tBHQ no mostró diferencias significativas en las distintas dosis probadas.

Posteriormente, se evaluó el efecto de LPS sobre las células de la línea HT-29, realizando tratamientos de 3 y 6 h de exposición a LPS (según lo descrito en la literatura) con dosis de 10 ng/ml, 100 ng/ml y 1 µg/ml, para posteriormente determinar si estas dosis afectaban la viabilidad, mediante ensayos MTT. Como se observa en la figura 5, se pudo determinar que ninguna de las dosis empleadas de LPS cambió la viabilidad celular en células HT-29.

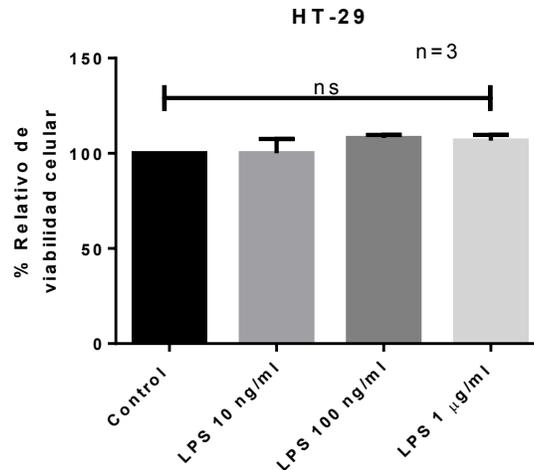


Figura 5. Efecto de las distintas dosis de LPS de *S.typhimurium*, evaluando la viabilidad celular en células HT-29 mediante MTT. Porcentaje de viabilidad celular expresado con respecto al control (% viabilidad + DS). Anova 1 vía, valores repetidos, post-test Tukey.

LPS de *S.typhimurium* induce la expresión de mRNA de la citoquina IL-8 en la línea celular intestinal HT-29.

Una vez establecido que ninguna de las dosis utilizadas de LPS generan un impacto significativo sobre la viabilidad celular en células HT-29, se procedió a analizar el efecto sobre el perfil de expresión a nivel de mRNA, del marcador de respuesta inmune pro-inflamatorio IL-8, mediante reacciones de Q-PCR.

Los resultados muestran que en todas las dosis de LPS utilizadas, a los 2 tiempos de tratamiento, los niveles de IL-8 fueron inducidos significativamente al ser comparados con respecto a las células de la condición control (no tratadas). Las dosis de 10 y 100ng/ml (3h) fueron las que más aumentaron la inducción de IL-8 con respecto a las células del grupo control no tratadas (Fig. 6). Sin embargo, se eligió la dosis que más indujo la expresión de IL-8 al menor tiempo de tratamiento y que no afectaba la viabilidad celular en las células HT-29, es decir, LPS de 10ng/ml (3h), para inducir la respuesta pro-inflamatoria en estas células, para la posterior evaluación del posible efecto anti-inflamatorio que podría generar tBHQ en este modelo de línea celular colónica.

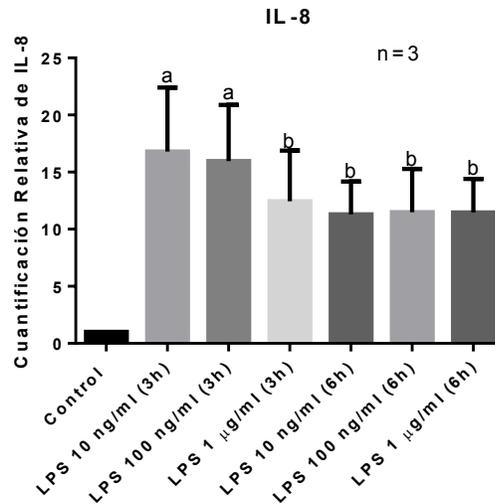


Figura 6. Niveles de expresión de IL-8, cuantificados mediante Q-PCR en células HT-29 post-tratamientos con LPS durante 3 y 6 h con respecto al control. Anova 1 vía, valores repetidos, post-test Tukey. Cuantificación Relativa + SEM. a ** p<0,0001; b *** p<0,001 con respecto al valor del control.**

Por lo tanto, se eligió la dosis que más indujo la expresión de IL-8 a menor tiempo de tratamiento y que no afectaba la viabilidad celular en células HT-29, es decir, LPS 10 ng/ml 3h para los experimentos posteriores.

Ensayos de viabilidad celular: MTT. Curva dosis-respuesta de tBHQ en línea celular intestinal HT-29.

Para analizar el efecto de tBHQ en células HT-29, se analizó el efecto de este compuesto sobre la viabilidad celular, donde se realizaron curvas dosis-respuesta de distintas concentraciones de tBHQ, dado que no había mucha información en la literatura. Las células fueron expuestas durante 24 horas de con dosis micromolares crecientes (2, 20, 50, 100, 150 y 200 µM) de este compuesto, seguidos de ensayos MTT, como se describió en materiales y métodos. Se pudo observar que las dosis utilizadas no modifican la viabilidad celular (Fig. 7). Sin embargo, se decidió seguir utilizando las dosis más altas probadas (100µM y 200µM) para los experimentos posteriores de evaluación del efecto de tBHQ a nivel de mRNA, dado que la literatura señala que a nivel de proteína estas dosis inducen la expresión de la proteína en esta línea celular (Cheung *et al.* 2011).

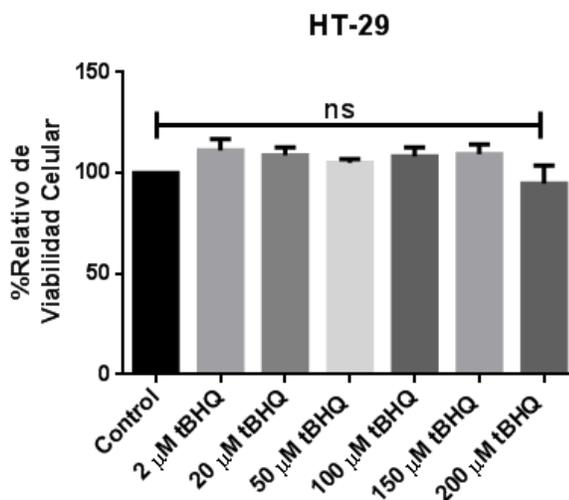


Figura 7. Curva dosis-respuesta de concentraciones crecientes de tBHQ realizadas en la línea celular intestinal HT-29 evaluando la viabilidad celular mediante MTT. Porcentaje de viabilidad celular expresado con respecto al control (% viabilidad + DS). Anova 1 vía, simple, post-test Tukey.

Evaluación de la expresión de HO-1 en la línea celular intestinal HT-29, tratada con tBHQ durante 24 horas.

Una vez establecidas las concentraciones de tBHQ a utilizar (100 y 200 µM), se procedió a evaluar su efecto sobre el perfil de expresión de HO-1. Se pudo determinar que la dosis más alta utilizada de tBHQ (200µM), incrementó significativamente la expresión de HO-1 en células HT-29 con respecto al grupo control (Fig. 8). Por lo tanto, esta fue la única dosis seleccionada a utilizar para la posterior evaluación del efecto de tBHQ, antes de realizar estímulos con LPS 3h.

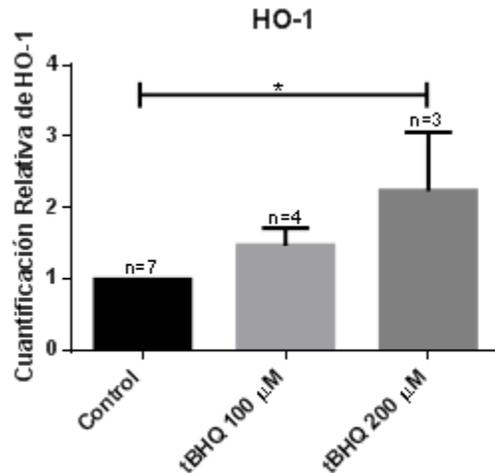


Figura 8. Niveles de expresión de HO-1, post-tratamientos de 24h con dosis de 100 y 200 μ M tBHQ, cuantificados mediante Q-PCR en células HT-29. Anova 1 vía, valores repetidos, Post-Test Tuckey. Cuantificación relativa + SEM. * $p < 0,05$ con respecto al valor del control.

Expresión de HO-1 y de las citoquinas IL-8, IL-12a, IFN- γ , TNF- α e IL-10 mediante Q-PCR en células HT-29, estimuladas con LPS de *S. Typhimurium 14028s*, tBHQ y co-estímulo.

Con el objetivo de evaluar el efecto anti-inflamatorio de tBHQ sobre el perfil de expresión de las moléculas mencionadas anteriormente en células HT-29, se realizaron experimentos con las dosis definidas previamente: LPS (10 ng/ml, 3h), tBHQ (200 μ M, 24h), y el co-estímulo, realizando un pre-tratamiento de 21 horas con tBHQ para luego estimular LPS durante 3 horas, para generar un tratamiento total de 24 horas.

Se pudo establecer que 200 μ M tBHQ y el co-estímulo (tBHQ+LPS) inducen de manera significativa la expresión de HO-1, con respecto al grupo control en células HT-29 (Fig 9a).

Con respecto a IL-8, LPS incrementa significativamente en las células HT-29, generando una respuesta pro-inflamatoria necesaria para evaluar el efecto anti-inflamatorio mediado por tBHQ. Por otro lado, tBHQ no aumenta significativamente los niveles de expresión de mRNA de IL-8. Sin embargo, el tratamiento de tBHQ por 21h, previo a la adición de LPS 3h incrementa significativamente los niveles de IL-8 inducidos por LPS (Fig. 9b).

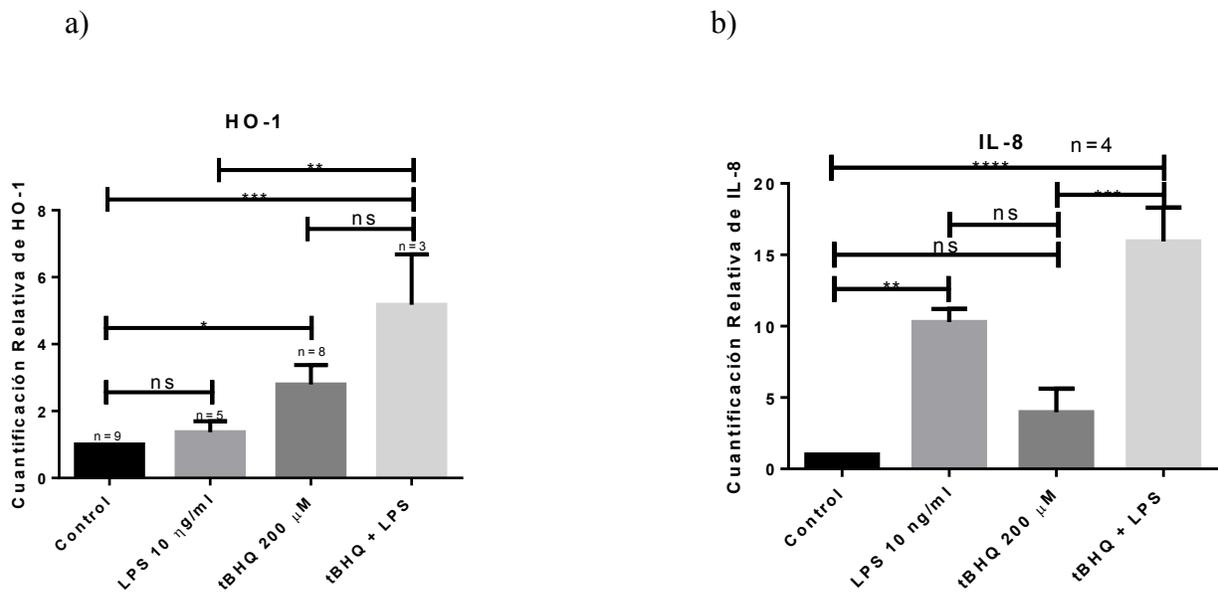


Figura 9. Niveles de expresión de HO-1 (a) e IL-8 (b), post-tratamientos con LPS, tBHQ y en co-estímulo, cuantificados mediante Q-PCR en células HT-29. Anova 1 vía, valores repetidos, post-test Tukey. Cuantificación relativa + SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$, con respecto al valor del control.

Con respecto a $\text{TNF-}\alpha$, LPS incrementa significativamente su expresión en las células HT-29; tBHQ no aumenta significativamente los niveles de expresión de mRNA de $\text{TNF-}\alpha$; el tratamiento de tBHQ por 21h, previo a la adición de LPS 3h no modifica significativamente los niveles de $\text{TNF-}\alpha$ inducidos por LPS (Fig. 10a). Con respecto a IL-12a, solo se observa que LPS induce significativamente los niveles de expresión de mRNA para esta citoquina.

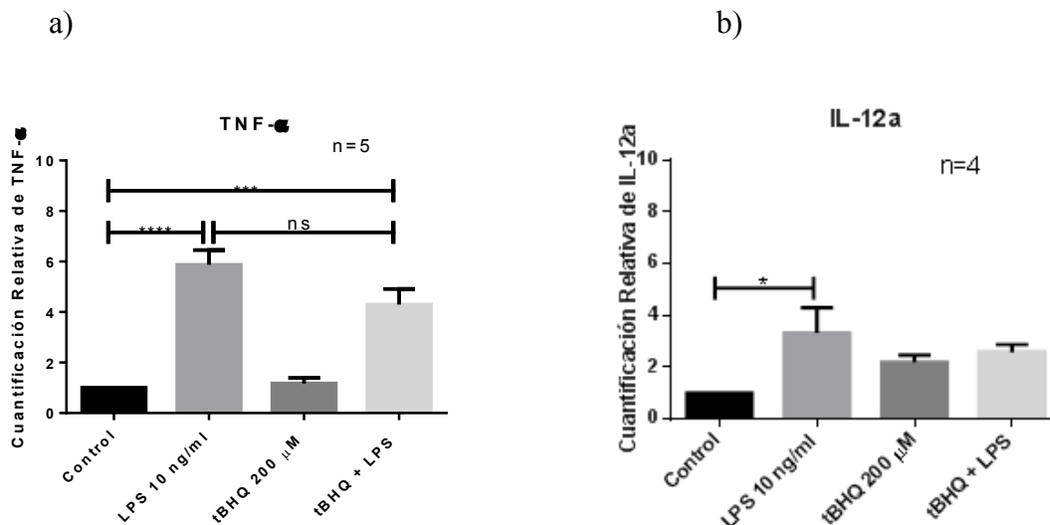


Figura 10. Niveles de expresión de TNF- α (a) e IL-12a (b), post-tratamientos con LPS, tBHQ y en co-estímulo, cuantificados mediante Q-PCR en células HT-29. Anova 1 vía, valores repetidos, post-test Tukey. Cuantificación relativa + SEM. * $p < 0,05$; * $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$, con respecto al valor del control.**

Con respecto a los niveles de expresión de citoquinas IFN- γ e IL-10, no se pudo hacer el análisis con el $\Delta\Delta C_T$ para evaluar las veces de cambio de los niveles de expresión de mRNA, dado que los valores de C_T dieron indeterminados, esto quiere decir que esta citoquina no fue detectada mediante Q-PCR.

Análisis de expresión proteica de HO-1 detectada mediante inmunofluorescencia indirecta en células HT-29.

Como se puede ver en la figura 11, es posible observar la presencia de 2 tipos de marcas de la expresión de HO-1. Por un lado hay presencia de un tipo de marca "reticular" (según hoja informativa del anticuerpo) el cual aparentemente coincide con el núcleo de estas células, la que es una marcación de fluorescencia más intensa. También es posible observar una marca "punteada", más dispersa en la célula y con una fluorescencia menos intensa que la marca reticular. Además, se puede decir que este tipo de línea celular intestinal expresa basalmente HO-1 (Fig. 11 control).

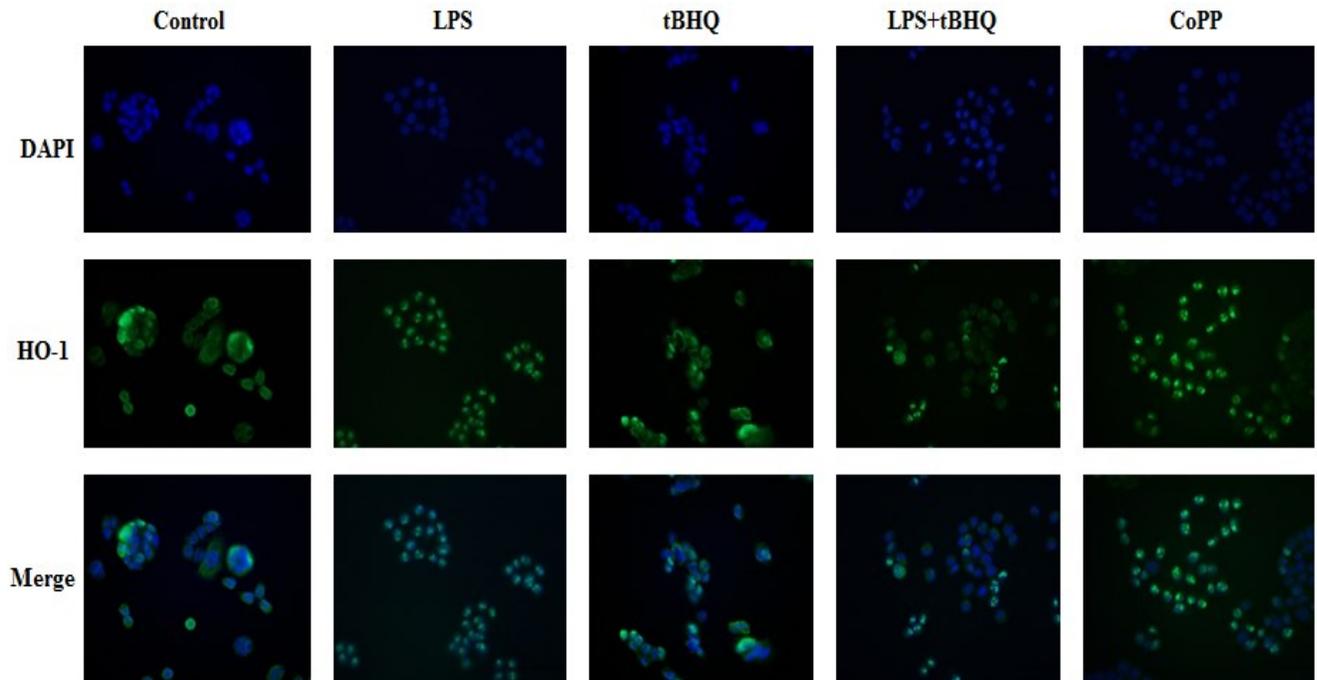


Figura 11. Análisis de la expresión proteica de HO-1 mediante ensayos de inmunofluorescencia en células HT-29. Las células fueron sometidas a tratamientos con LPS, tBHQ y ambos en co-estímulo. Se muestran microfotografías tomadas con objetivo 40X, representativas en cuanto al número y porcentaje de células.

Al realizar el análisis general de cuantificación de las marcas detectadas en la inmunofluorescencia y expresarlas en porcentaje con respecto a las células totales (DAPI+), se puede observar que el porcentaje de células HT-29 que dieron negativas para HO-1, es prácticamente nulo en todas las condiciones aplicadas, por lo que se puede decir que prácticamente el 100% de las células expresan HO-1 en todas las condiciones con respecto al porcentaje de células totales (Fig.12). También se puede decir que hay diferencias significativas al comparar el porcentaje de células totales de cada condición con respecto a su porcentaje de marca HO-1 reticular, punteada y doble marca (reticular y punteada) (Fig. 12).

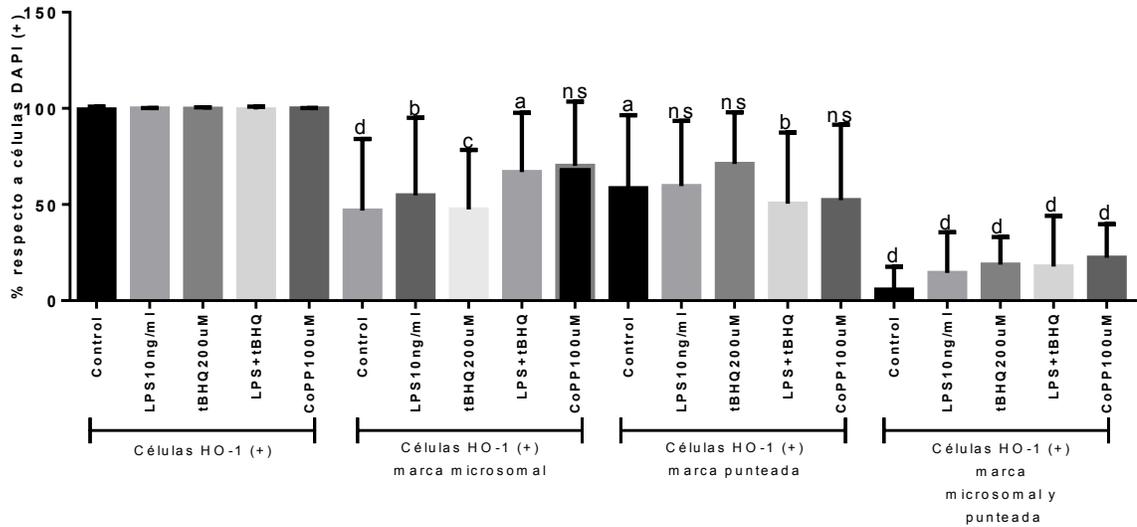


Figura 12. Análisis de la expresión proteica de HO-1, expresadas en porcentaje con respecto al porcentaje de células DAPI (+), de los ensayos de inmunofluorescencia en células HT-29 post-tratamiento con tBHQ (200μM), LPS (10 μg/ml) y ambos en co-estímulo. Anova 1 vía, no pareado, no paramétrico test Kruskal-Wallis, post-test Dunn's. % respecto a células DAPI(+) + DS. a:*p<0,05; b:**p<0,01; c:***p<0,001; d:**** p<0,0001, con respecto al valor del grupo de células totales.

En cuanto a la marca de HO-1 reticular, se puede decir que no se observaron diferencias entre los distintos tratamientos aplicados (Fig. 13),

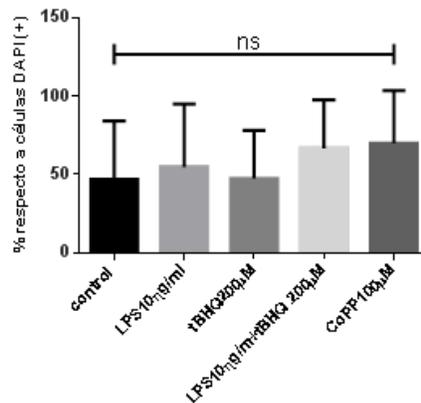


Figura 13. Análisis de la expresión proteica de HO-1 mediante ensayos de inmunofluorescencia en células HT-29, post-tratamiento con tBHQ (200μM), LPS (10 ng/ml) y ambos en co-estímulo, con respecto al tipo de marca reticular de HO-1 en los

resultados de las inmunofluorescencias realizadas. Anova 1 via, simple, post-test Kruskal-Wallis. % respecto a células DAPI(+) + DS.

Con respecto al porcentaje de células con marca HO-1 punteada, no se observaron cambios entre la condición control y los distintos tratamientos (Fig.14).

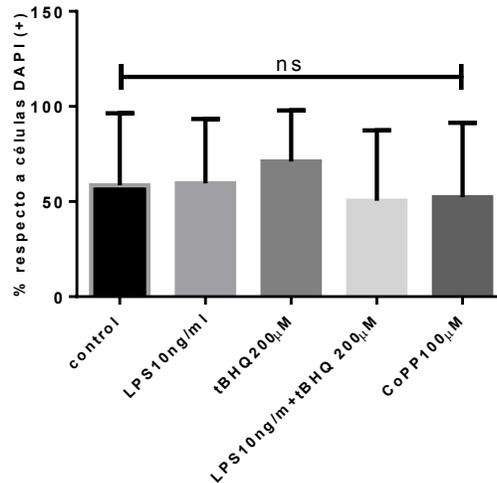


Figura 14. Análisis de la expresión proteica de HO-1 mediante ensayos de inmunofluorescencia en células HT-29, post-tratamiento con tBHQ (200µM), LPS (10 ng/ml) y ambos en co-estímulo, con respecto al tipo de marca punteada de HO-1 en los resultados de las inmunofluorescencias realizadas. Anova 1 via, simple, post-test Kruskal-Wallis. % respecto a células DAPI(+) + DS.

Sin embargo, para el grupo de células que presentó doble marca (reticular y punteada), las células tratadas con tBHQ (200µM) incrementaron significativamente sus niveles de expresión proteica de HO-1 con respecto al control de doble marca. También se observó un incremento significativo de la expresión proteica de HO-1 doble marca frente al estímulo CoPP (control positivo para la inducción de la expresión proteica de HO-1) (Fig. 15)

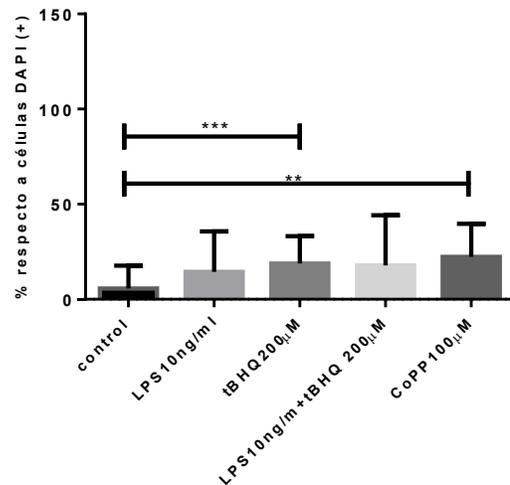


Figura 15. Análisis de la expresión proteica de HO-1 mediante ensayos de inmunofluorescencia en células HT-29, post-tratamiento con tBHQ (200µM), LPS (10 ng/ml) y ambos en co-estímulo, con respecto a la doble marca de HO-1. Anova 1 vía, simple, no paramétrico, post-test Kruskal-Wallis. % respecto a células DAPI(+) + DS. ** $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ con respecto al control.

5.2 2.- Determinar el efecto anti-inflamatorio de tBHQ, *ex vivo*, en PBMCs de muestras de sangre obtenidas de pacientes con EC y de sujetos controles.

Con respecto a este modelo de estudio, cabe destacar que el rendimiento de obtención de RNA total para realizar el Q-PCR de las distintas citoquinas a analizar fue bajo a pesar de realizar diversas modificaciones del método. Por lo tanto, se privilegió utilizar las muestras de RNA total obtenidas para los análisis de expresión de mRNA de HO-1, IL12, por ser los blancos a evaluar por efectos de tBHQ, y de IL-8 por ser un marcador de la respuesta inmune pro-inflamatoria.

Para definir las dosis de los estímulos a utilizar en estos estudios, nos basamos en la información de la literatura (Turley *et al.* 2015). Se pudo determinar que ninguna de las dosis utilizadas en los tratamientos aplicados modifica de manera significativa el porcentaje de viabilidad celular en PBMCs. Se utilizaron sujetos controles para evaluar las concentraciones de los distintos estímulos (Fig. 16).

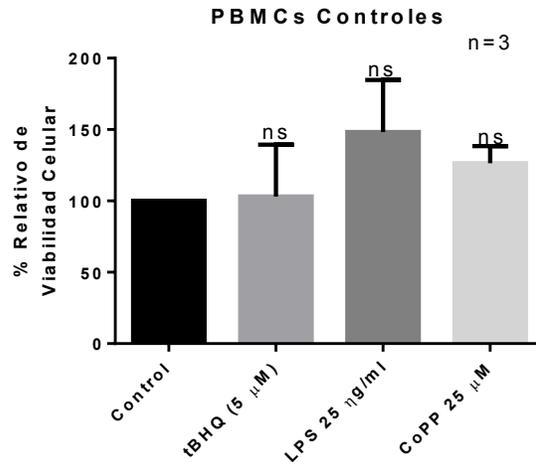


Figura 16. Evaluación de concentraciones de tBHQ, LPS y CoPP en la viabilidad celular de PBMCs de sujetos controles. Anova 1 vía, valores repetidos, post-test Tukey. % viabilidad celular con respecto al control +DS

Efecto de tBHQ y LPS de *S.typhimurium*, en la expresión de HO-1 e IL-8 en PBMCs de sujetos controles.

Una vez ya determinado de que ninguna dosis utilizada tanto de tBHQ como de LPS genera cambios significativos sobre la viabilidad celular en PBMCs, se analizó el efecto sobre el perfil de expresión de HO-1 y también sobre el marcador de respuesta inmune pro-inflamatorio IL-8.

Se determinó que tBHQ (5 μ M) induce significativamente los niveles de expresión de mRNA HO-1, ya sea en forma individual como en co-estímulo con LPS con respecto a la condición control (no tratada) y, que LPS solo no induce HO-1 y tampoco en co-estímulo con respecto al control (Fig. 17a). Con respecto a IL-8, se estableció que tBHQ (solo o en co-estímulo) no induce cambios en su expresión y, que LPS es el único tratamiento que generó un incremento significativo en la expresión de IL-8 con respecto a la condición control (Fig. 17b).

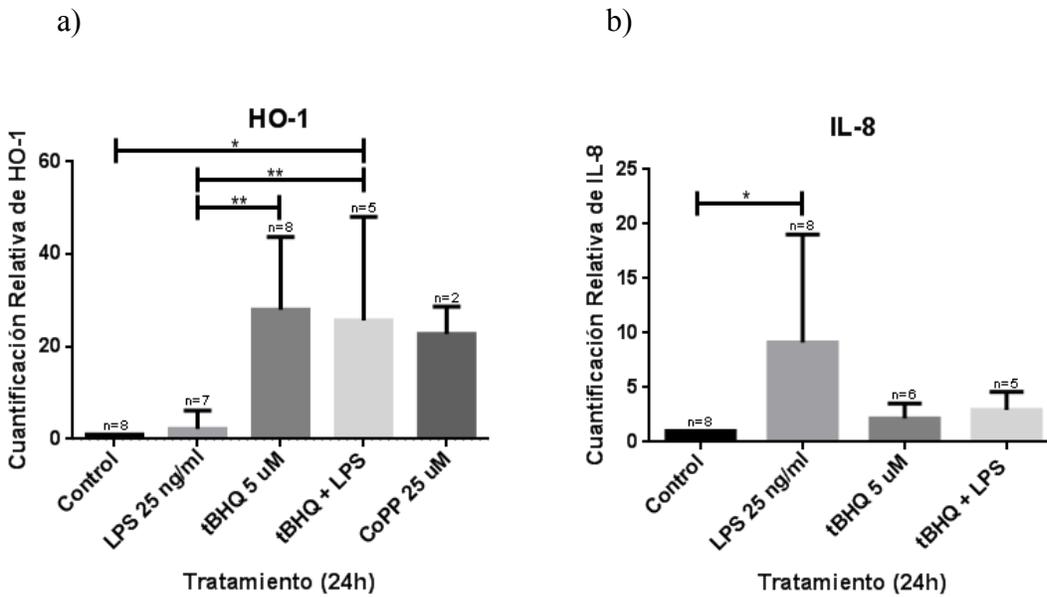


Figura 17: Niveles de expresión de HO-1 (a) e IL-8 (b), cuantificados mediante Q-PCR en PBMCs de sujetos controles, con respecto a la condición control (basal; Análisis A). Anova 1 vía, simple, post-test Tukey. Cuantificación relativa + SEM. CoPP control positivo de expresión de HO-1.

Por otro lado, respecto a los niveles de expresión de mRNA de IL-12a en PBMCs de sujetos controles, no se observaron diferencias significativas entre las distintas condiciones (Fig. 18).

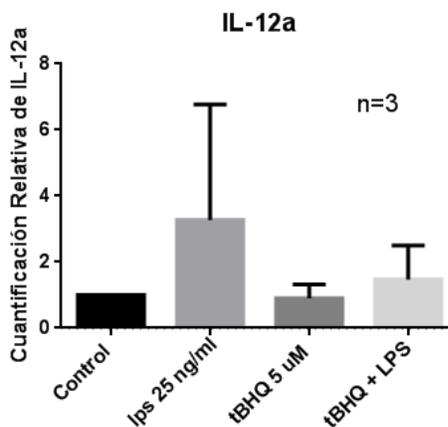


Figura 18: Niveles de expresión de IL-12a, cuantificados mediante Q-PCR en PBMCs de sujeto control, con respecto al control (basal; Análisis A). Anova 1 vía, valores repetidos, post-test Tukey. Cuantificación relativa + SEM.

tBHQ y LPS de *S.typhimurium*, no inducen la expresión de HO-1 y de IL-8 en PBMCs de Pacientes afectados con Enfermedad de Crohn.

Evaluado ya el efecto de tBHQ en PBMCs de sujetos controles, se procedió a analizar su efecto en PBMCs de pacientes afectados con enfermedad de Crohn. Cabe mencionar que la obtención de RNA total de pacientes afectados con EC, fue aún más ineficiente que en PBMCs de sujetos controles, por lo cual se decidió realizar los Q-PCR con 50 ng de RNA total por reacción, para poder analizar las mismas citoquinas evaluadas en sujetos controles.

Con respecto a HO-1, 5 μ M tBHQ no generó un incremento significativo de la expresión de esta enzima con respecto a la condición control (Fig. 19).

Con respecto a IL-8, se pudo hacer la reacción de Q-PCR para 3 pacientes, pero solo amplificaron 2 de ellos a niveles de expresión de mRNA tan bajos como la condición control. El tercer n dio indeterminado (gráficos no mostrados).

Por otro lado, respecto a IL-12a en PBMCs de pacientes afectados con Enfermedad de Crohn no se pudo evaluar debido a que no hubo amplificación durante la reacción de Q-PCR para esta citoquina (gráfico no mostrado).

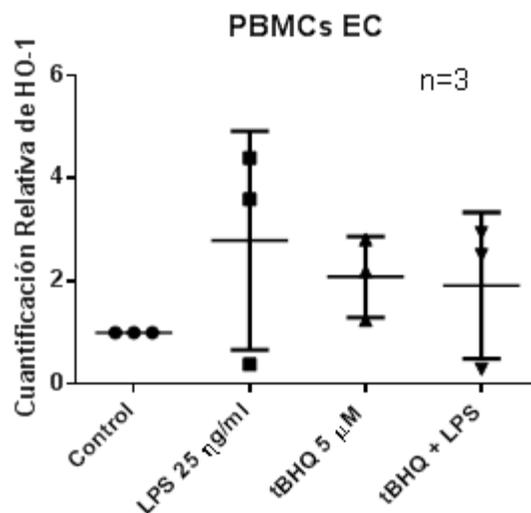


Figura 19. Niveles de expresión de HO-1 en PBMCs de pacientes afectados con EC, post-tratamientos con LPS, tBHQ y en co-estímulo, cuantificados mediante Q-PCR, con respecto al control (basal; Análisis A). Anova 1 vía, no pareado, no paramétrico, post-test Dunn's. Cuantificación relativa + SEM.

5.3 Estudiar el efecto anti-inflamatorio de tBHQ, *ex vivo*, en cultivos de microexplantes de tejido colónico intestinal de pacientes afectados con EC y de sujetos control.

Ensayos de viabilidad celular: MTT. Curva dosis-respuesta de tBHQ en explantes de tejido de colon.

Debido a los pocos antecedentes que existen sobre los efectos de tBHQ y LPS en EII y, particularmente en biopsias intestinales humanas, se procedió a evaluar si estos compuestos podrían modular la respuesta inflamatoria en explantes de tejido colónico (aprox. 16-20 mg, 2 biopsias por tratamiento) de sujetos controles, explantes colónicos de zona sana (ZS) y zona afectada (ZA) de pacientes con EC. En paralelo, se evaluó si las dosis de LPS obtenidas por literatura (1 y 10µg/ml) modifican el porcentaje de viabilidad. Para esto, se realizó una curva dosis-respuesta de distintas concentraciones de tBHQ (50, 100, 200 y 500 µM) durante un tiempo de exposición de 24 horas y también en explantes de colon de sujetos controles, para posteriormente ser sometidos a ensayos MTT. Dada la falta de antecedentes que relacionen tBHQ con este modelo de estudio, se decidió utilizar una dosis incluso más alta que la reportada para HT-29 (500µM) ya que este modelo no sólo puede incluir células epiteliales sino también inmunes, y debido a que el número de células por pocillo si bien no es exactamente conocido sí es mayor que en el modelo del objetivo N°1.

Se pudo determinar que ninguna de las dosis utilizadas en los tratamientos aplicados, tanto de LPS (3 horas) como de tBHQ (24 horas), afectaban la viabilidad de los explantes intestinales (Fig. 20).

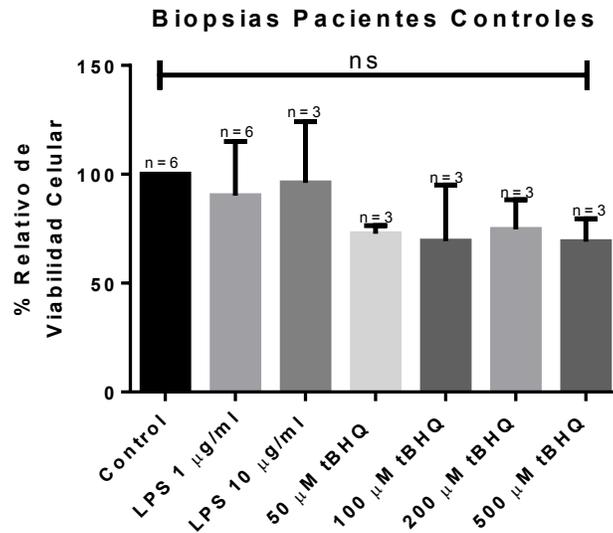


Figura 20. Curva dosis-respuesta de concentraciones de LPS y tBHQ realizadas en biopsias colónicas de sujetos controles sobre la viabilidad celular, expresado como el porcentaje de viabilidad celular con respecto al control. Anova 1 vía, no pareado, post-test Tukey. % de viabilidad con respecto al control + DS.

tBHQ induce la expresión de HO-1 en explantes de tejido colónico de sujetos controles.

Una vez evaluado que las dosis de tBHQ y LPS no afectaban la viabilidad celular de las biopsias intestinales sometidas a tratamientos, se procedió a evaluar si ambos compuestos podrían modular la expresión de HO-1 e IL-8, mediante análisis de ensayos de Q-PCR, para poder establecer las dosis apropiadas que generen cambios significativos en la inducción de la expresión de ambas proteínas (Fig. 21).

Se pudo determinar que sólo la dosis de 500µM tBHQ (24h) incrementó significativamente los niveles de expresión de HO-1 con respecto a la condición control, mientras que LPS no produjo ningún cambio (Fig. 21a).

Por otro lado, sólo la dosis menor de LPS utilizada en estos ensayos (1µg/ml, 3h) pudo modular la expresión de IL-8, incrementando significativamente los niveles de expresión de esta citoquina con respecto a la condición control (no tratada) (Fig. 21b).

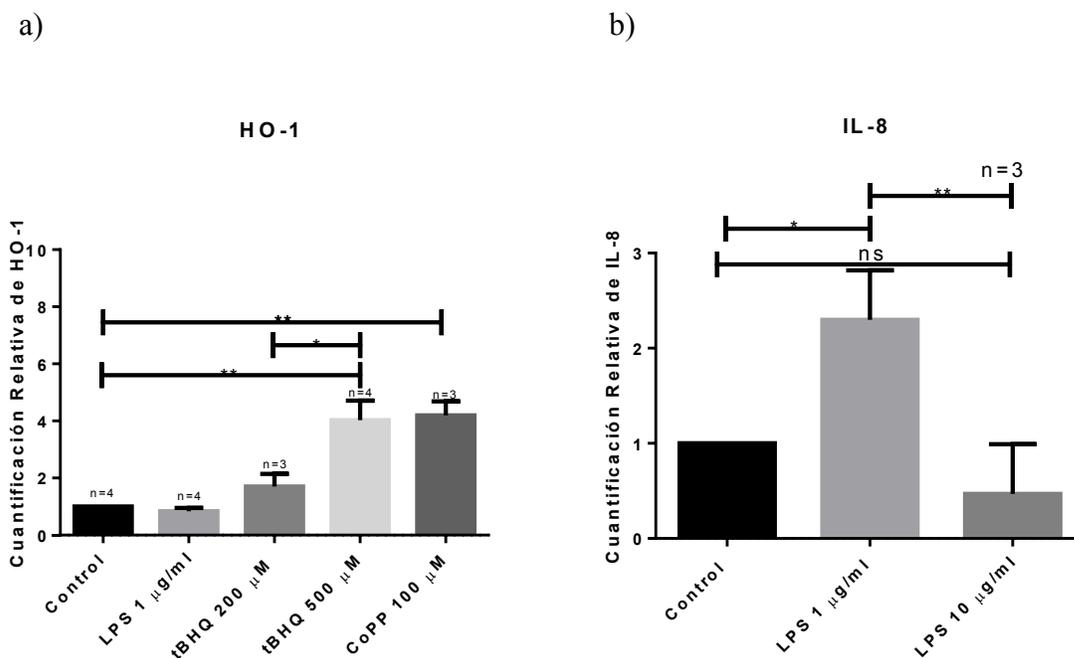


Figura 21. Niveles de expresión de HO-1 (a) e IL-8 (b), post-tratamientos con LPS y tBHQ, cuantificados mediante Q-PCR en explantes colónicos de sujetos controles, con respecto al control (basal; Análisis A). Anova 1 vía, no pareado, post-test Tukey. Cuantificación relativa+ SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, con respecto al valor del control.

tBHQ induce la expresión de HO-1 en biopsias de tejido colónico de sujetos controles, pero no en biopsias intestinales de pacientes afectados con EC, sometidas a tratamientos con tBHQ, LPS y ambos compuestos en co-estímulo.

Al poder establecer las concentraciones tanto de tBHQ como LPS, que modulen la expresión de HO-1 e IL-8 en biopsias intestinales, respectivamente, se procedió a evaluar si modulan la expresión de HO-1 utilizando ambos compuestos en co-estímulo (Fig. 22), tanto en explantes de sujetos controles como explantes de pacientes afectados con EC, En primer lugar se realizaron tratamientos con 500µM tBHQ durante 21 horas, para posteriormente adicionar LPS (1µg/ml) por 3 horas, y completar un tratamiento total de 24 horas.

Al igual que en los ensayos de Q-PCR anteriores (ensayos de determinación de dosis), tratamientos con 500µM tBHQ, inducen significativamente la expresión de HO-1 en biopsias de sujetos controles, pero en tratamientos realizados en co-estímulos con LPS, tBHQ no moduló su

expresión. (Fig. 22a). Sin embargo, en biopsias intestinales de pacientes afectados con EC, no fue posible inducir la expresión de HO-1 mediante tratamientos con tBHQ o tBHQ+LPS. Aunque hubo un incremento de la expresión de HO-1 en biopsias de ZS de pacientes afectados con EC con respecto al grupo control, este no fue significativo (Fig. 22b). Respecto a la expresión de HO-1 en ZA de pacientes afectados con EC, no hubo cambios en ninguna condición evaluada EC (Fig. 22c).

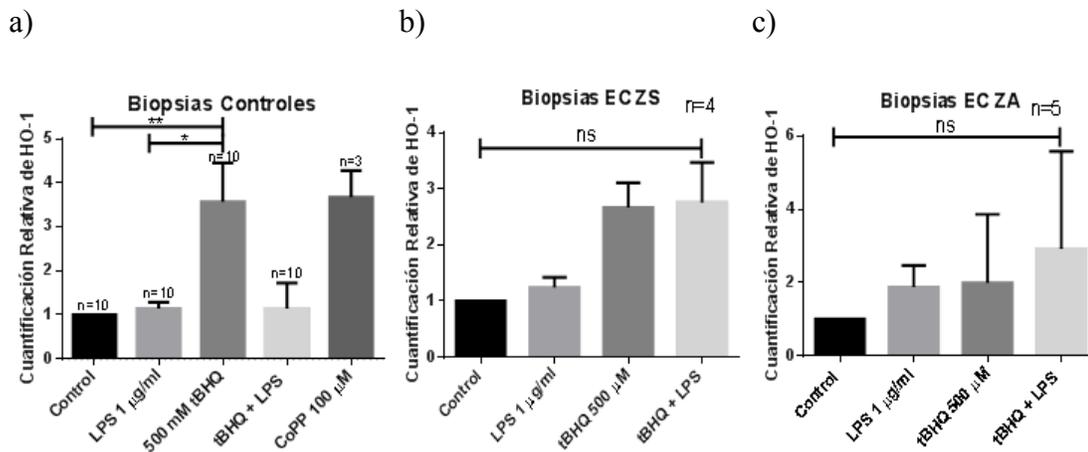


Figura 22. Niveles de expresión de HO-1, post-tratamientos con LPS, tBHQ y ambos en co-estímulos, cuantificados mediante Q-PCR en explantes colónicos de sujetos controles, de ZS y ZA de pacientes afectados con EC, con respecto a la condición control (basal; Análisis A). Anova 1 vía, valores repetidos, post-test Tukey. Cuantificación relativa+ SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, con respecto al valor del control.

tBHQ disminuye la inducción de la expresión de IL-8 mediado por LPS en biopsias colónicas de sujetos sanos y en explantes de zona sana de pacientes afectados con EC.

Al igual que en el ensayo anterior, se realizaron tratamientos con 500µM tBHQ durante 21 horas, para posteriormente adicionar LPS (1µg/ml, 3h), y completar un tratamiento total de 24 horas.

Luego de realizar la misma metodología para HO-1, se pudo determinar que LPS (1µg/ml), induce la expresión de IL-8 con respecto a la condición control, en biopsias intestinales de sujetos sanos y en explantes de zona sana (ZS) de pacientes afectados con Enfermedad de

Crohn (EC), a diferencia de los explantes de zona afectada (ZA) de pacientes que padecen de EC donde no hubo inducción de esta quimioquina (Fig. 23).

Sin embargo, fue posible establecer que en biopsias de sujetos controles y de zonas sanas de pacientes con EC, realizar un tratamiento con tBHQ o tBHQ 21h antes de adicionar iniciar el tratamiento con LPS, no solo reduce significativamente el aumento de los niveles de expresión de IL-8 mediado por LPS, sino que reduciría esos niveles incluso bajo los niveles basales (Fig. 23).

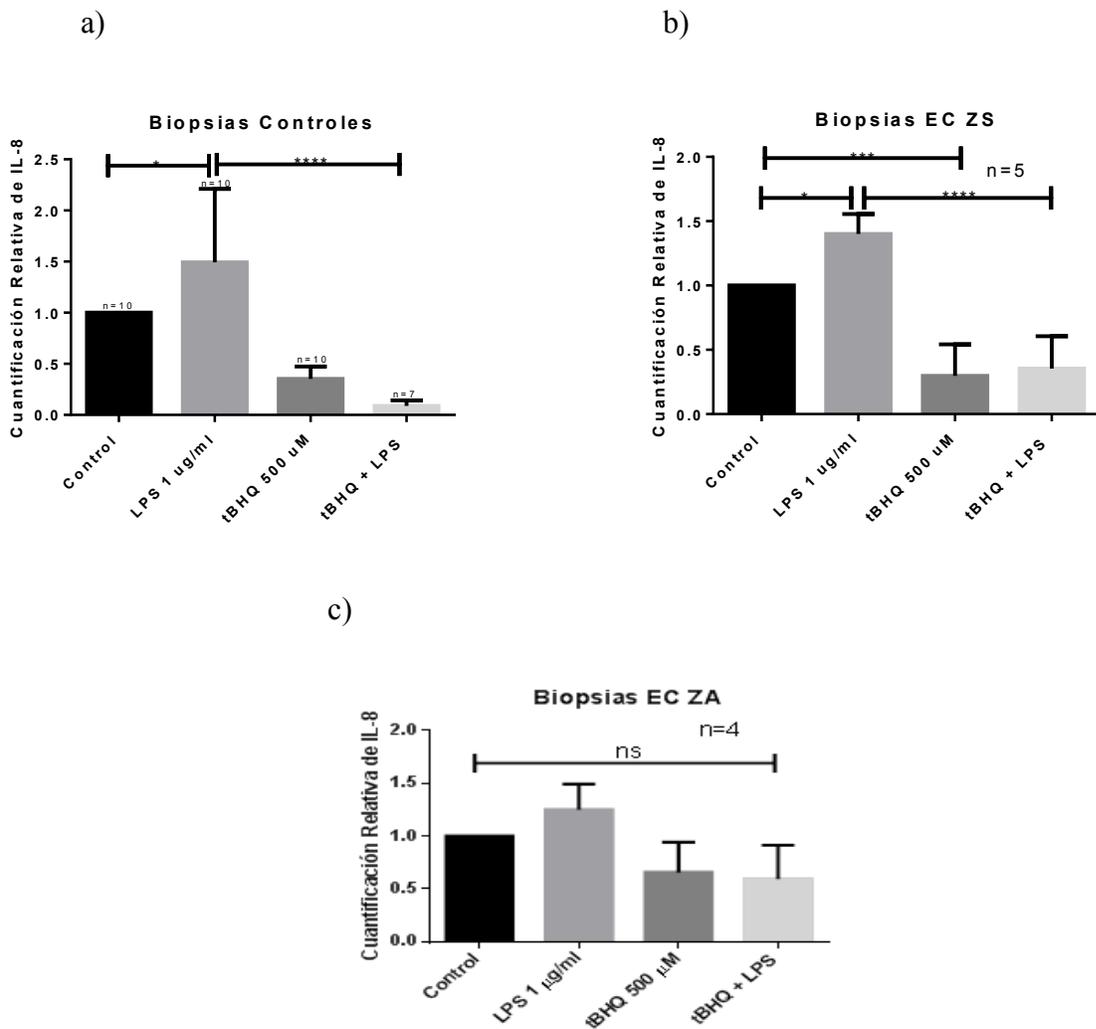


Figura 23. Niveles de expresión de IL-8, post-tratamientos con LPS, tBHQ y ambos en co-estímulo, cuantificados mediante Q-PCR en explantes colónicos de sujetos controles (a), como también de zona sana (b) y zona afectada (c) de pacientes afectados con EC, con respecto a la condición control (basal; Análisis A). Anova 1 vía, valores repetidos, post-test Tukey. Cuantificación relativa + SEM. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$, con respecto al valor del control.

tBHQ no modula la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias IL-12a, TNF- α e IFN- γ en tejido intestinal.

Una vez ya determinado que tBHQ reduce los niveles de expresión de IL-8 inducidos por LPS, en biopsias colónicas de sujetos controles y en explantes de zonas sanas de pacientes afectados con EC, se procedió a analizar su efecto sobre las demás citoquinas pro-inflamatorias que son de interés en este estudio (IL-12a, TNF- α e IFN- γ).

Se pudo determinar que tBHQ, no altera la expresión de las citoquina pro-inflamatorias mencionada anteriormente, tanto en biopsias colónicas de sujetos controles como en explantes de pacientes afectados con EC (ZS y ZA) (Fig. 24, 25 y 26).

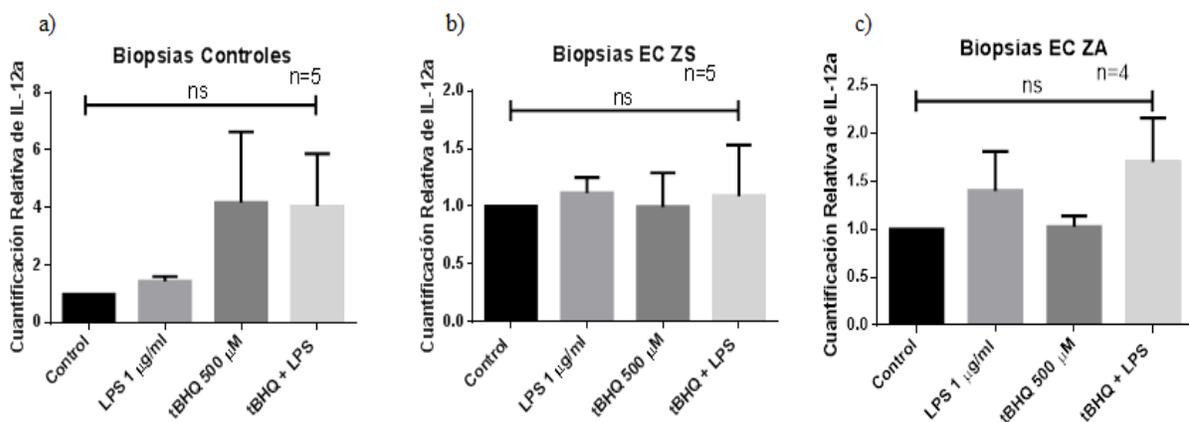
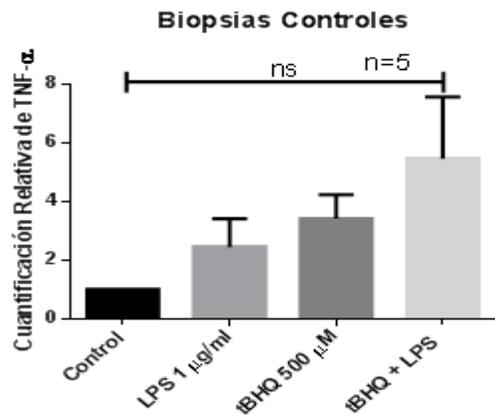
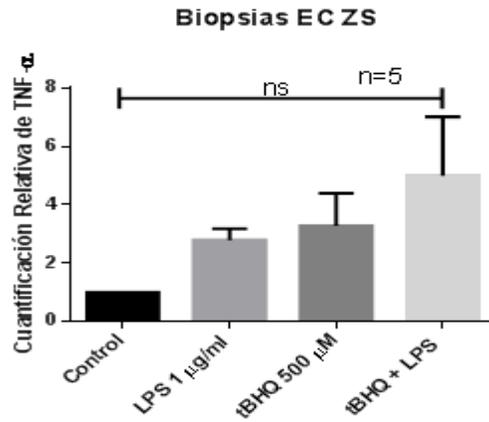


Figura 24. Niveles de expresión de mRNA para IL-12a, post-tratamientos con LPS, tBHQ y ambos en co-estímulo, cuantificados mediante Q-PCR en explantes colónicos de sujetos controles (a), como también de zona sana (b) y zona afectada (c) de pacientes afectados con EC, con respecto a la condición control (basal; Análisis A). Anova 1 vía, valores repetidos, post-test Tukey. Cuantificación relativa + SEM.

a)



b)



c)

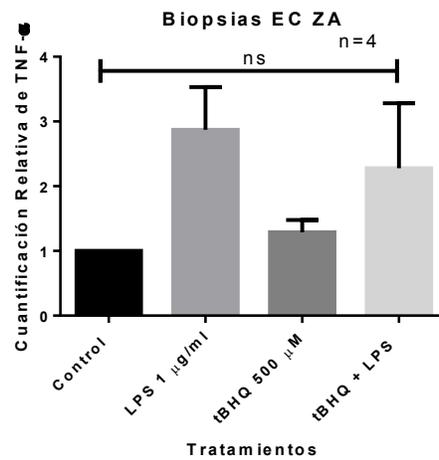


Figura 25. Niveles de expresión de TNF- α , post-tratamientos con LPS, tBHQ y ambos en co-estimulo, cuantificados mediante Q-PCR en explantes colónicos de sujetos controles (a), como también de zona sana (b) y zona afectada (c) de pacientes afectados con EC, con respecto a la condición control (basal; Análisis A). Anova 1 vía, valores repetidos, post-test Tukey. Expresión relativa + SEM.

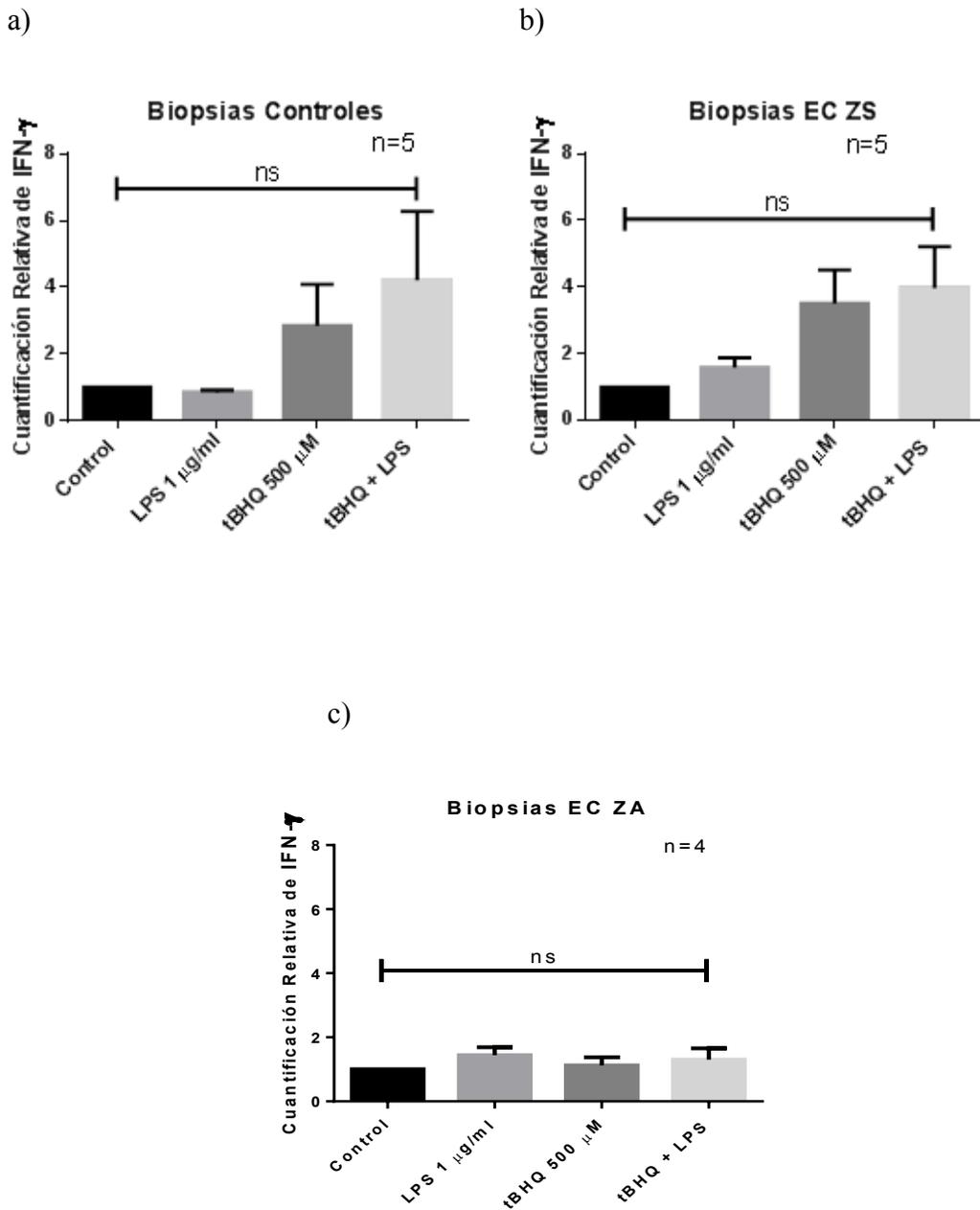


Figura 26. Niveles de expresión de mRNA para IFN- γ , post-tratamientos con LPS, tBHQ y ambos en co-estímulo, cuantificados mediante Q-PCR en explantes colónicos de sujetos controles (a), como también de zona sana (b) y zona afectada (c) de pacientes afectados con EC, con respecto a la condición control (basal; Análisis A). Anova 1 vía, valores repetidos, post-test Tukey. Cuantificación relativa + SEM.

tBHQ no modula la expresión de la citoquina pro-inflamatoria IL-10 en tejido intestinal.

Ya analizado el efecto de tBHQ sobre HO-1 y además las citoquinas pro-inflamatorias de interés para este estudio ya mencionadas anteriormente, se procedió a determinar si tBHQ modula la expresión de IL-10, en biopsias colónicas de sujetos controles y también en explantes de pacientes afectados con EC.

Se pudo establecer, a diferencia de HO-1 e IL-8, que tBHQ no moduló la expresión de IL-10 en ninguno de los 3 grupos de explantes analizados (Fig. 27).

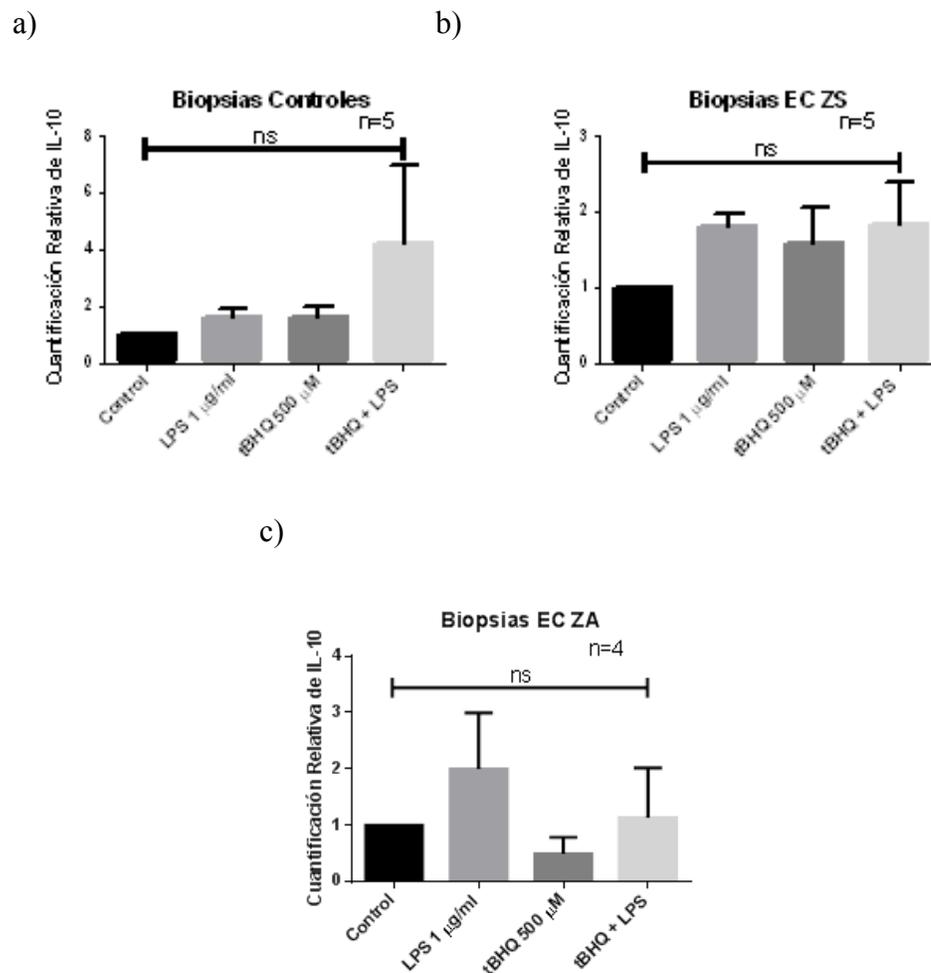


Figura 27. Niveles de expresión de IL-10, post-tratamientos con LPS, tBHQ y ambos en co-estímulo, cuantificados mediante Q-PCR en explantes colónicos de sujetos controles (a), como también de zona sana (b) y zona afectada (c) de pacientes afectados con EC, con respecto a la condición control (basal; Análisis A). Anova 1 vía, valores repetidos, post-test Tukey. Cuantificación relativa + SEM.

Cuantificación de citoquinas secretadas (IL-8, IL12a, TNF α , IFN- γ e IL-10) por explantes colónicos tratados con LPS, tBHQ y ambos compuestos en co-estímulo, mediante ELISA múltiple.

Para poder analizar el efecto de tBHQ en la secreción de los mediadores inflamatorios (IL-8, IL12a, TNF α , IFN- γ) y anti-inflamatorio (IL-10) de los explantes intestinales estimulados, se realizaron mediciones de estas citoquinas en sus sobrenadantes con el kit de ELISA múltiple. Los explantes de colon fueron analizados en 3 grupos: Sujetos Controles, pacientes con EC zona sana (EC ZS) y pacientes con EC zona afectada (EC ZA). Se pudo determinar que los niveles de IL-8 secretados tanto por los explantes de sujetos controles como por los explantes de los pacientes afectados con EC (ZS y ZA) fueron basalmente altos en los explantes de la condición control. Además, no se registraron diferencias significativas en la secreción de este mediador pro-inflamatorio con respecto a los tratamientos aplicados en cada grupo de biopsias ni tampoco entre grupos de explante (Fig. 28a, Control, EC ZS y EC ZA).

Respecto a las lecturas de los niveles de esta citoquina, en la mayoría de las muestras de los pacientes EC ZS y ZA, en todas las condiciones, se sobrepasó el límite máximo de detección del kit (Fig. 28, b y c), la excepción fue una muestra de EC ZS en las condiciones TBHQ y co-estímulo que alcanzó valores cercanos al límite inferior de detección para esta citoquina, lo cual hizo que dado el bajo número de muestras, se aumentara la dispersión y la baja en el promedio no diera significativa (Fig.27c). En los sobrenadantes del grupo de los sujetos controles, los valores detectados en la condición control y LPS sobrepasaron los niveles máximos de detección, sin embargo, la mayoría de estas muestras mostraron valores menores en las condiciones TBHQ y co-estímulo alcanzando la mitad de la lectura del control o LPS, a pesar de ello y dada la alta dispersión y bajo número de muestras no se observaron diferencias significativas (Fig.28b).

Sobre los niveles de secreción de TNF- α , se puede decir que todas las muestras de todas las condiciones, en los 3 grupos de explantes analizados, dieron dentro del rango de detección del kit. Los niveles de secreción en el grupo control (31.88 ± 8.58) y EC ZS (14.07 ± 1.96) fueron bastante más bajos con respecto al valor del grupo de EC ZA (540.37 ± 544.21) en la condición control. En cuanto a las diferencias entre las distintas condiciones dentro de un mismo grupo, no se observaron cambios significativos (Fig 29 a, b, c y d), a pesar que si se ve una tendencia de

lecturas mayores de secreción de TNF- α en los explantes de EC ZA, lo que se entiende por ser un área afectada y, por lo tanto, inflamada (Fig. 29a y c).

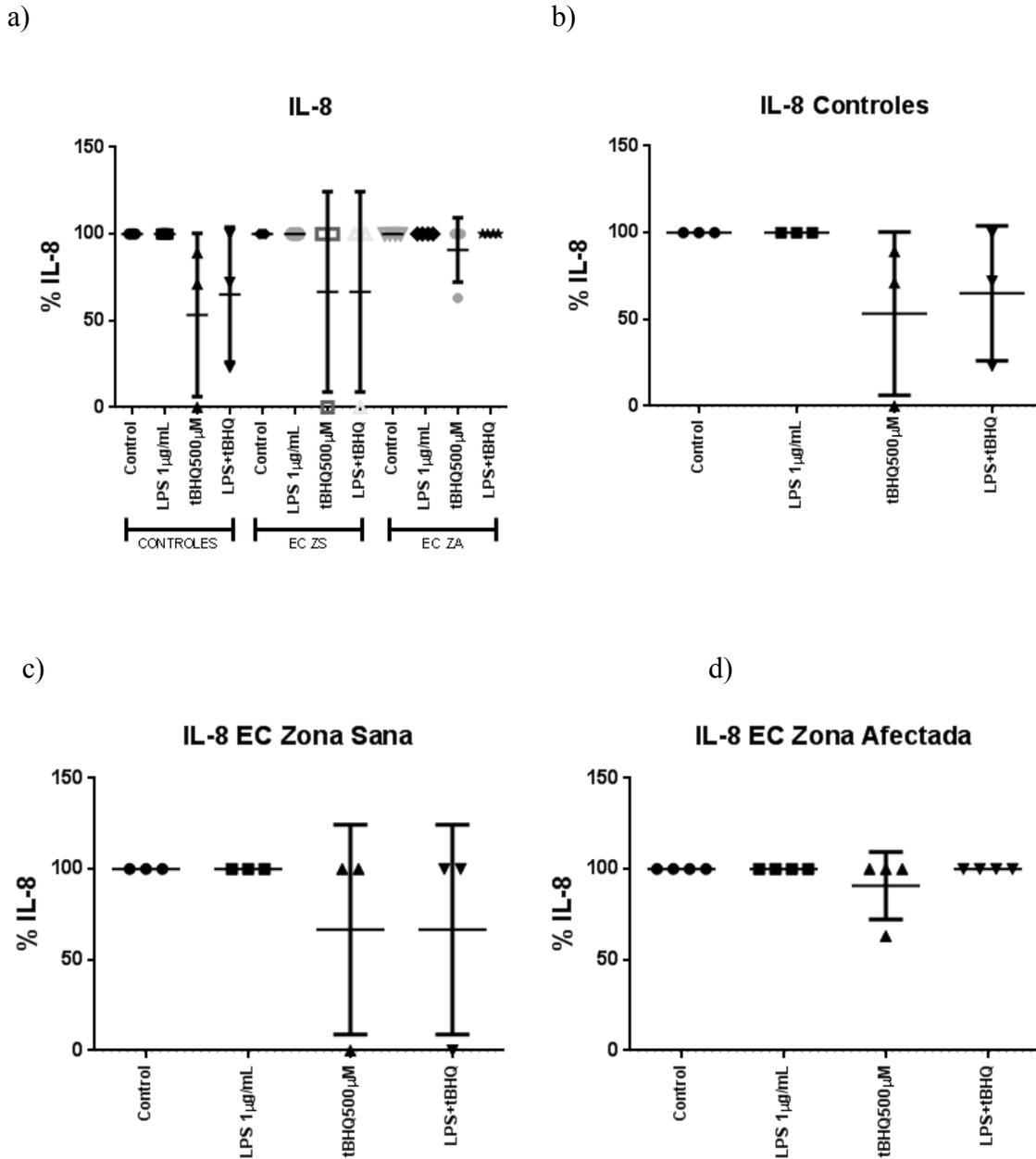
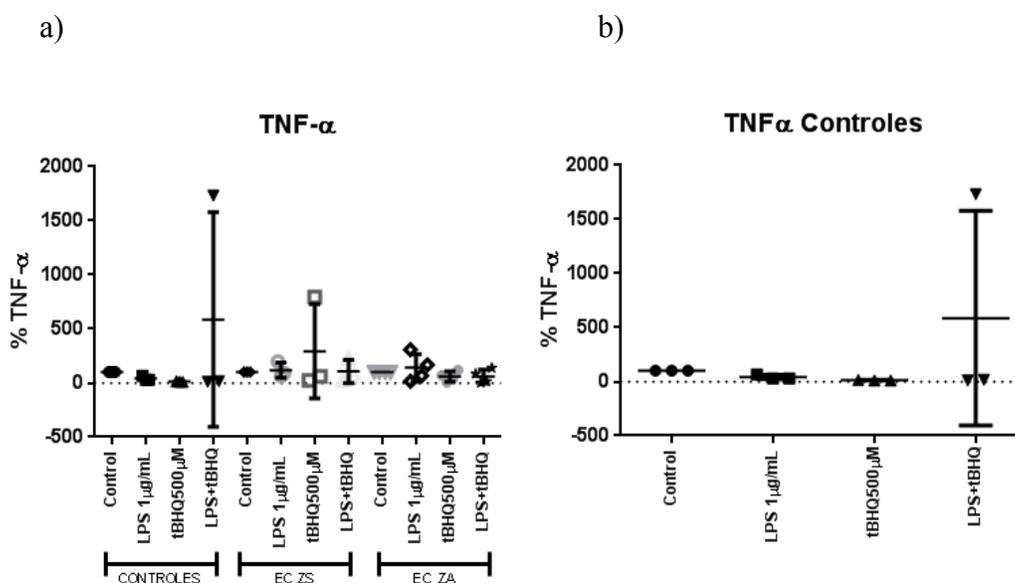


Figura 29. Niveles de secreción de IL-8, post-tratamientos con LPS, tBHQ y ambos en co-estímulo, cuantificados mediante Elisa Múltiple en explantes colónicos entre grupos de explantes (a), en sujetos controles (b), pacientes con EC ZS (c) y pacientes con EC ZA (d). Anova 1 vía, no paramétrico, no pareado, Kruskal-Wallis test, post-test Dunn's. Porcentaje de niveles secretados. %IL-8+DS.

Sobre los niveles de secreción de TNF- α , se puede decir que todas las muestras de todas las condiciones, en los 3 grupos de explantes analizados, dieron dentro del rango de detección del kit. Los niveles de secreción en el grupo control (31.88 ± 8.58) y EC ZS (14.07 ± 1.96) fueron bastante más bajos con respecto al valor del grupo de EC ZA (540.37 ± 544.21) en la condición control. En cuanto a las diferencias entre las distintas condiciones dentro de un mismo grupo, no se observaron cambios significativos (Fig 29 a, b, c y d), a pesar que si se ve una tendencia de lecturas mayores de secreción de TNF- α en los explantes de EC ZA, lo que se entiende por ser un área afectada y, por lo tanto, inflamada (Fig. 29a y c).



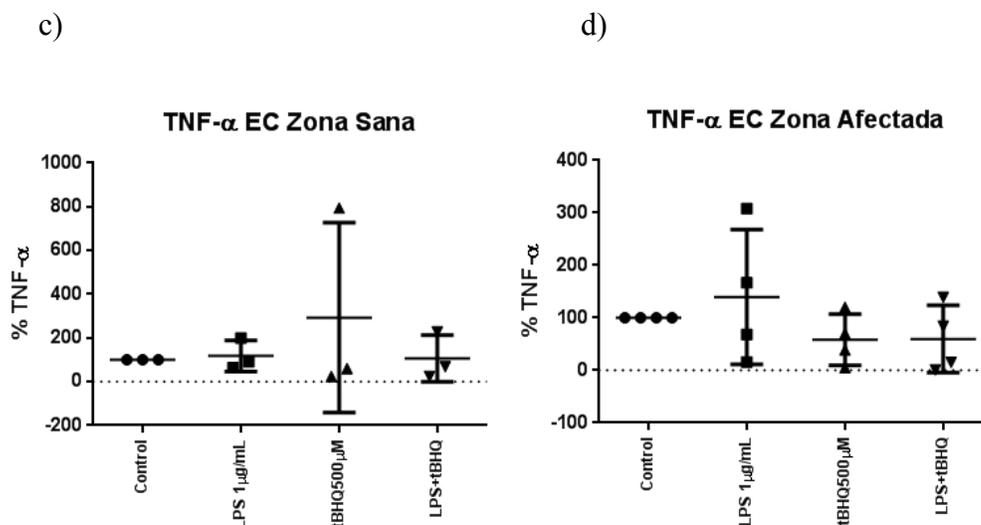


Figura 29. Niveles de secreción de TNF- α , post-tratamientos con LPS, tBHQ y ambos es co-estímulo, cuantificados mediante Elisa Múltiple en Explantes colónicos entre grupo de explantes (a), en sujetos controles (b), EC ZS (c) y EC ZA (d). Anova 1 vía, no paramétrico, no pareado, Kruskal-Wallis test, post-test Dunn's. Porcentaje de niveles secretados. %TNF- α +DS

Con respecto a IL-12a, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos aplicados dentro de cada grupo de explante, ni entre la misma condición entre los distintos grupos de explantes (Fig. 30a). Sin embargo, al analizar con más detalle los valores obtenidos, fue posible observar que el tratamiento con tBHQ solo o en co-estímulo generó una tendencia a la disminución de la secreción de IL-12a en todos los grupos de explantes con respecto a su condición control (no tratada). Respecto al tratamiento con LPS, se pudo notar que este tratamiento no indujo la secreción de esta citoquina en ningún grupo de explante, siendo sus valores siempre cercanos al valor de la condición control. También se pudo observar que los niveles basales secretados de esta citoquina por los explantes de la ZA de los pacientes con EC eran mayores que los niveles secretados por los explantes de ZS de pacientes con EC e incluso que los valores secretados por los explantes de los sujetos controles, con respecto a la condición control (Fig. 30)

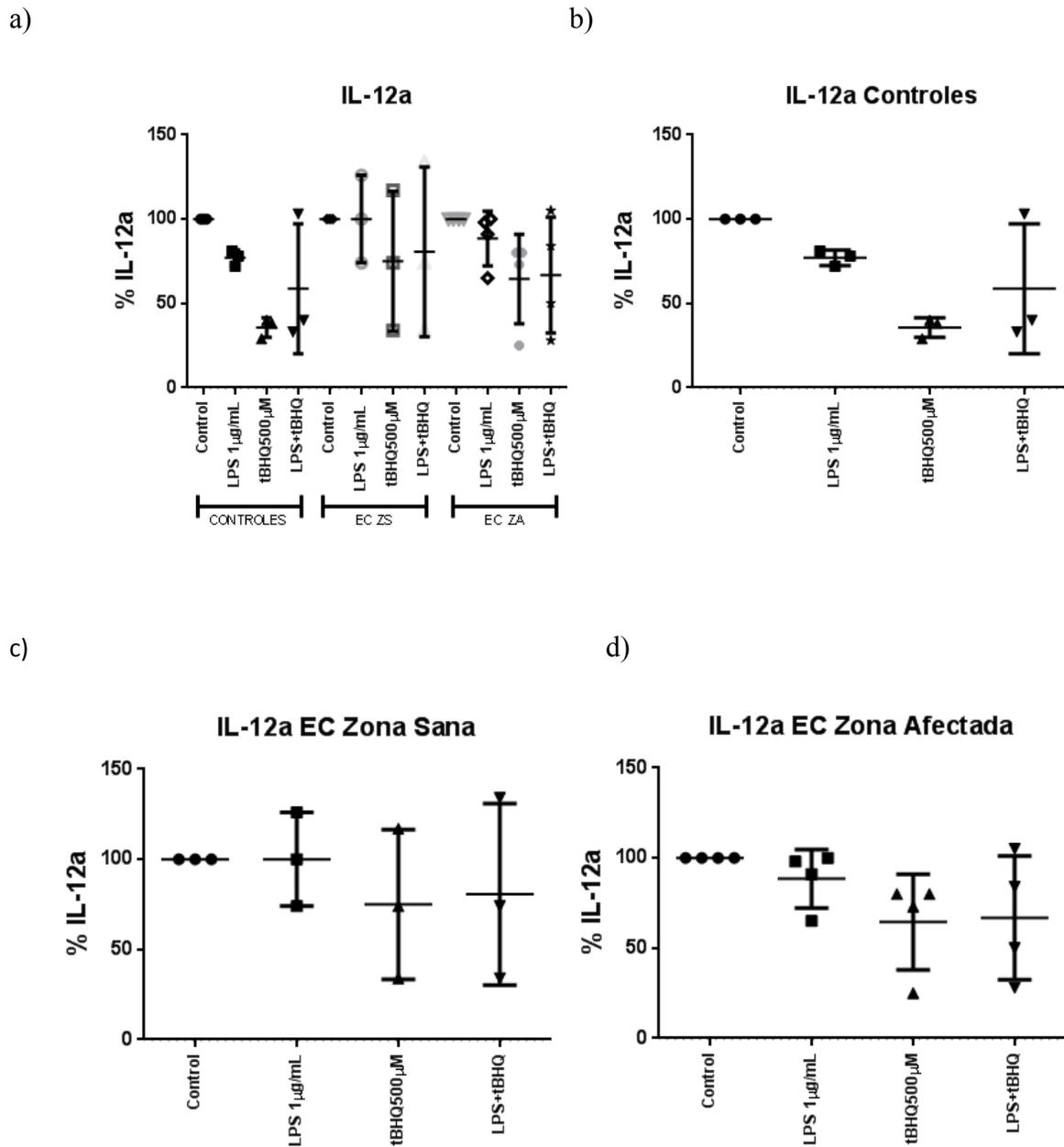
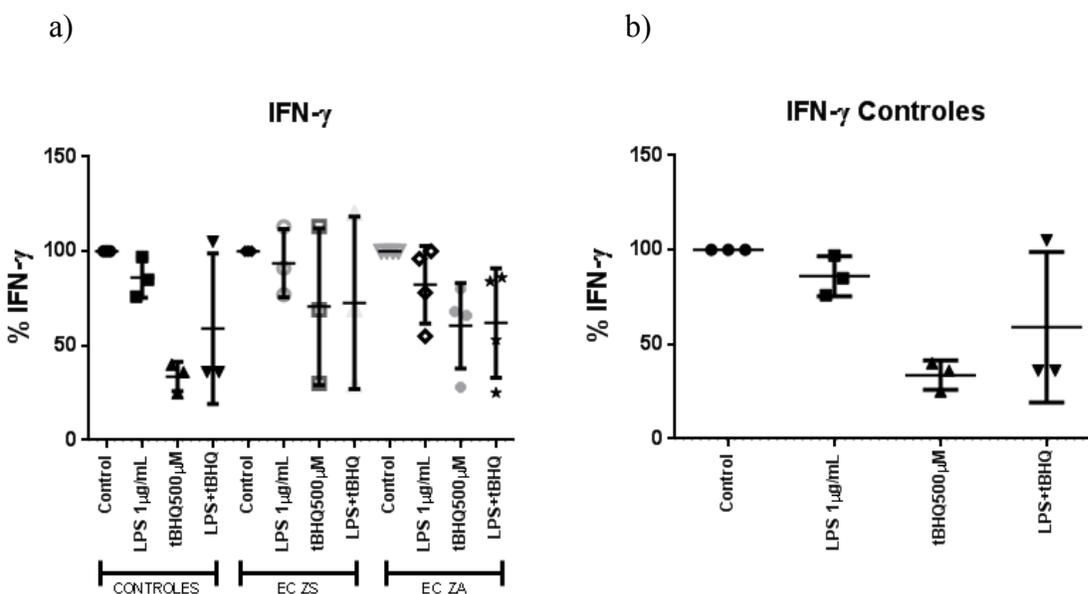


Figura 30. Niveles de secreción de IL-12a, post-tratamientos con LPS, tBHQ y ambos en co-estímulo, cuantificados mediante Elisa Múltiple en explantes colónicos entre grupos de explantes (a), en sujetos controles (b), EC ZS (c) y EC ZA (d). Anova 1 vía, no paramétrico, no pareado, Kruskal-Wallis test, post-test Dunn's. Porcentaje de niveles secretados. % IL-12^a + DS.

Sobre los niveles de secreción de IFN- γ , se pudo observar un perfil de secreción muy similar al observado para IL-12a, con la diferencia que los valores de secreción alcanzados por IFN- γ fueron menores. Se puede decir que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos aplicados dentro de cada grupo de explante, ni entre la misma condición entre los distintos grupos de explantes (Fig. 31a). Pero al analizar con detalle los valores obtenidos, se observó que los tratamientos tBHQ o tBHQ+LPS generaron una tendencia a la disminución de la secreción de IFN- γ en todos los grupos de explantes con respecto a su condición control (no tratada). Respecto al tratamiento con LPS, se pudo notar que este tratamiento no indujo la secreción de esta citoquina en ningún grupo de explantes, siendo sus valores siempre cercanos al valor de la condición control. También se pudo observar que los niveles basales secretados de esta citoquina por los explantes de la ZA de los pacientes con EC eran mayores que los niveles secretados por los explantes de ZS de pacientes con EC e incluso que los valores secretados por los explantes de los sujetos controles, con respecto a la condición control (Fig. 31).



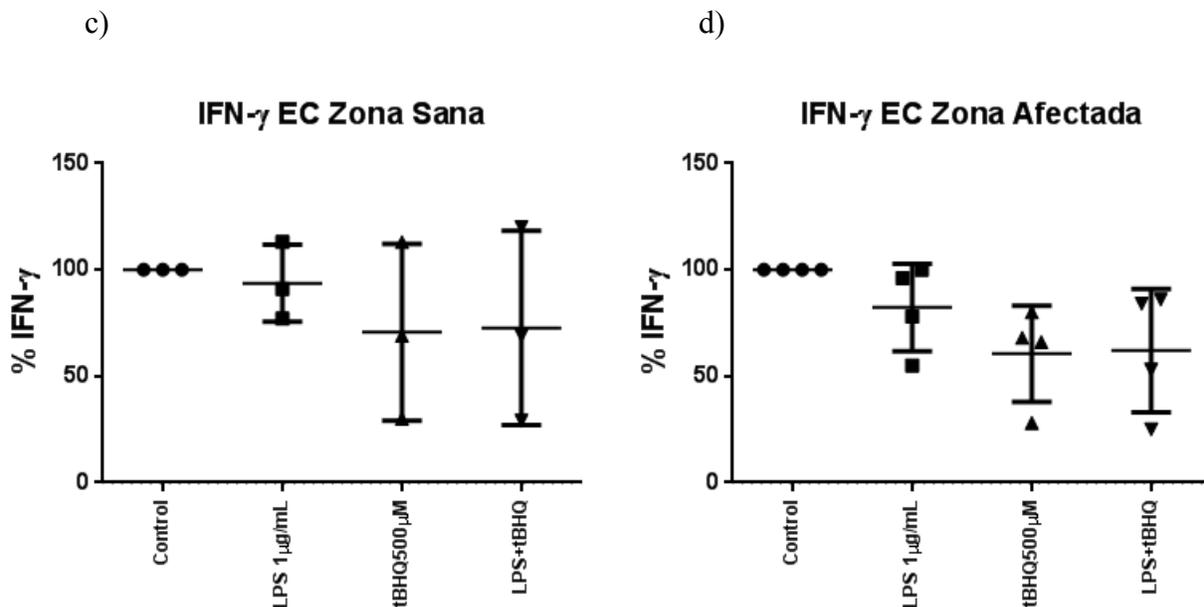


Figura 31. Niveles de secreción de IFN- γ , post-tratamientos con LPS, tBHQ y ambos en co-estímulo, cuantificados mediante Elisa Múltiple en explantes colónicos entre grupos de explantes (a), en sujetos controles (b), EC ZS (c) y EC ZA (d). Anova 1 vía, no paramétrico, no pareado, Kruskal-Wallis test, post-test Dunn's. porcentaje de niveles secretados. % IFN- γ + DS

Por otro lado, con respecto a IL-10 se pudo observar un perfil de secreción muy similar al observado para IL-12a e IFN- γ , con la diferencia que los valores de secreción alcanzados por IL-10 fueron mucho más bajos que estas citoquinas pro-inflamatorias. Se puede decir que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos aplicados dentro de cada grupo de explante, ni entre la misma condición entre los distintos grupos de explantes (Fig. 32a). Pero al analizar con detalle los valores obtenidos, se observó que los tratamientos tBHQ o tBHQ+LPS nuevamente generaron una tendencia a la disminución de la secreción de IL-10, al igual que para IL-12a e IFN- γ , en todos los grupos de explantes con respecto a su condición control (no tratada). Respecto al tratamiento con LPS, se pudo notar que este tratamiento no modificó la secreción de IL-10 en ningún grupo de explante, siendo sus valores siempre cercanos al valor de la condición control. También se pudo observar que los niveles basales secretados de esta citoquina por los explantes de la ZA de los pacientes con EC eran mayores que los niveles secretados por los explantes de ZS de pacientes con EC e incluso que los valores secretados por los explantes de los sujetos controles, con respecto a la condición control (Fig. 32). En el grupo de explantes EC ZA,

se pudo determinar que 500 μ M tBHQ produjo una disminución en la secreción de esta citoquina anti-inflamatoria con respecto a los explantes controles de manera significativa (* $p < 0,05$) (Fig. 32d).

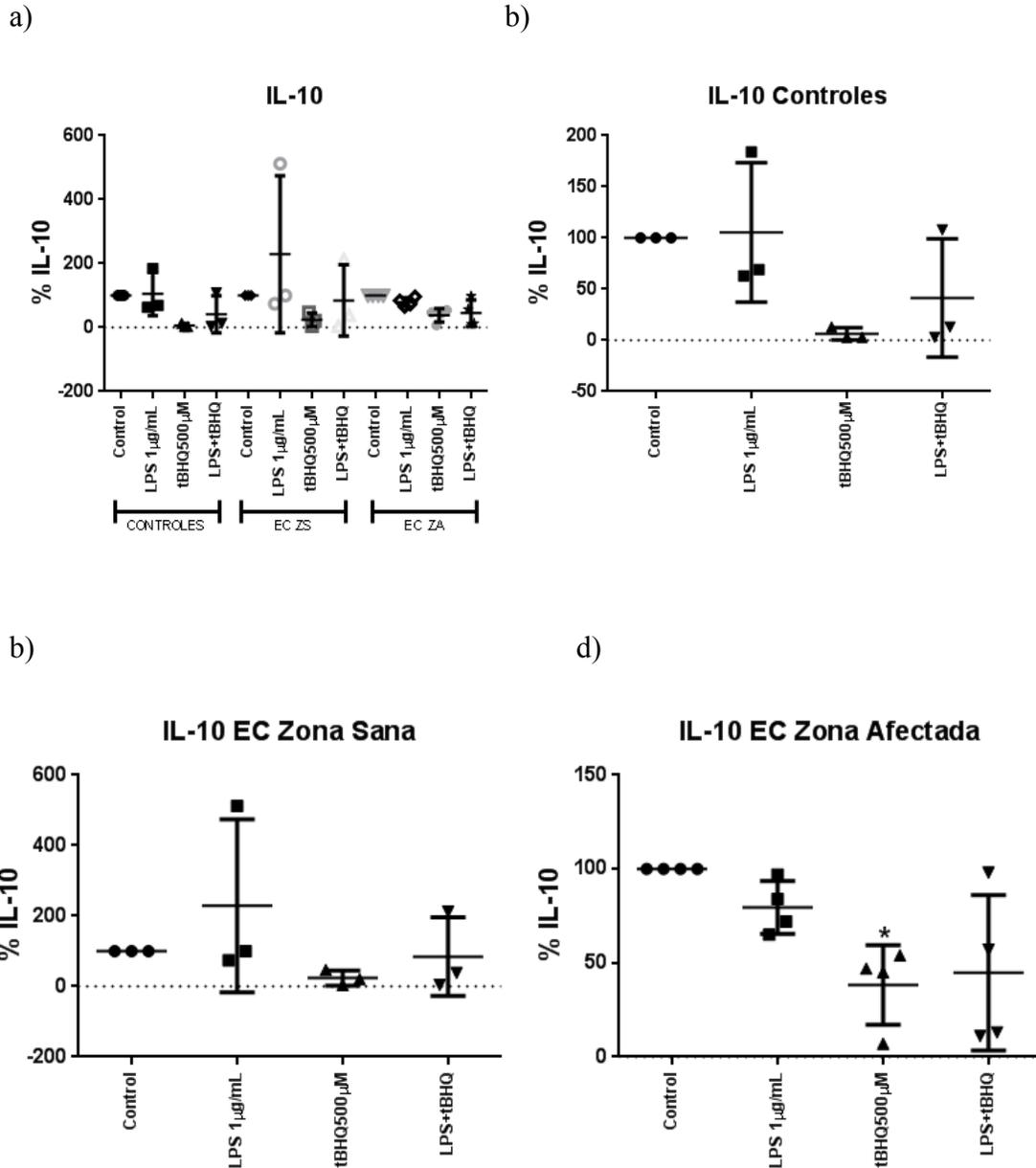


Figura 32. Niveles de secreción de IL-10, post-tratamientos con LPS, tBHQ y ambos en co-estímulo, cuantificados mediante Elisa Múltiple en explantes colónicos entre grupos de explantes (a), en sujetos controles (b), EC ZS (c) y EC ZA (d). Anova 1 vía, no paramétrico, no pareado, Kruskal-Wallis test, post-test Dunn's. Porcentaje de niveles secretados. % IL-10 \pm DS. * $p < 0,05$ respecto a condición control en EC ZA.

5. DISCUSIÓN

Este estudio propone que el preservante alimenticio tBHQ podría tener un rol modulador en la respuesta inflamatoria intestinal en la Enfermedad inflamatoria intestinal. Para esto, se analizó su efecto en la enzima anti-inflamatoria HO-1, como también en diversas citoquinas que modulan la respuesta inflamatoria en líneas celulares intestinales, células mononucleares de sangre periférica y en explantes colónicos tanto de sujetos sanos como en pacientes afectados con EII. Se sabe que tBHQ es un potente inductor de Nrf2, aunque su mecanismo no ha sido dilucidado (Imhoff y Hansen, 2010). Además, existe evidencia que implica un efecto anti-inflamatorio de Nrf2 en una variedad de modelos experimentales y, que tBHQ puede desempeñar un papel anti-inflamatorio importante mediante el aumento del sistema antioxidante celular regulando positivamente a Nrf2 resultando en la disminución de la producción de citoquinas pro-inflamatorias a través de la inactivación de la vía de señalización NF- κ B (Jin *et al.* 2010). Cabe destacar que no existe evidencia que relacione los efectos de tBHQ con EII, particularmente con EC, por lo tanto, este estudio aporta nuevos antecedentes para ayudar a comprender los posibles mecanismos anti-inflamatorios que se le han conferido a este compuesto.

Para analizar el efecto anti-inflamatorio de tBHQ, se buscó un agente gatillante de una respuesta inflamatoria en células Caco-2 y HT-29, ya que estas líneas celulares exhiben funciones y características específicas del epitelio intestinal (Gagnon *et al.* 2013). Cabe destacar que en EII, existe un deterioro funcional de las células epiteliales intestinales, concomitante con la infiltración de células inflamatorias en la lámina propia (Al-Ghadban *et al.* 2016). Para poder generar una respuesta pro-inflamatoria en células Caco-2 y HT-29 se utilizó como agente gatillante de esta respuesta LPS, principal componente de membrana de las bacterias Gram-negativas, el cual es un potente estímulo inflamatorio, cuya liberación durante el crecimiento o la lisis bacteriano provoca una diversidad de factores de crecimiento, citoquinas y mediadores inflamatorios (Chen H. *et al.* 2015).

En este estudio se pudo determinar que en las células Caco-2, los tratamientos aplicados con LPS no afectaron la viabilidad celular, como lo señalado en la literatura donde Wells y sus colaboradores demostraron que el LPS no tuvo ningún efecto discernible sobre la estructura de los enterocitos, la viabilidad y la susceptibilidad a la invasión bacteriana, por lo cual, sus

resultados sugirieron que podría no implicar pérdida de viabilidad epitelial o facilitar la entrada de bacterias en las células epiteliales intestinales (Wells *et al.* 1993).

Con respecto a la responsividad de las células Caco-2 ante el estímulo con LPS, no fue posible generar una respuesta pro-inflamatoria, con ninguna de las concentraciones aplicadas y seleccionadas por literatura, para lo cual se utilizó el mediador IL-8 como marcador de respuesta pro-inflamatoria. Se usó esta citoquina como marcador ya que podría ser un marcador para diversas condiciones clínicas y el incremento en los niveles de IL-8 podría ser resultado de diversas condiciones inflamatorias (Todorović-Raković y Milovanović, 2013). Se sabe que en células de mamíferos, LPS y otros productos bacterianos son reconocidos por una clase de receptores reconocedores de patrones llamados Toll-like receptors (TLRs), donde la activación de TLR-4 mediado por LPS, culmina en actividad transcripcional de la vía de señalización NF- κ B junto con la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (Abreu *et al.* 2001). Particularmente, con la línea celular Caco-2, existe evidencia que expresan bajos niveles de mRNA para *TLR4*. En un estudio realizado por Hung Q. y sus colaboradores, analizaron la expresión de TLR-4 en líneas celulares colorectales humanas (Caco-2, HCT116, HT29, SW480 and KM20) mediante Q-PCR y pudieron determinar aumentos significativos en la expresión de TLR4 en células HT29, SW480 y KM20, mientras que las células Caco-2 y HCT116 que muestran sólo expresión mínima (Hung *et al.* 2012), lo que da cuenta de los resultados obtenidos.

Al haber evidencia bibliográfica de que células Caco-2 son poco responsivas frente a LPS, se buscó otro inductor de respuesta pro-inflamatoria. A raíz de esto surge la idea de utilizar infección con *S.typhimurium* 14028. Se utilizaron 3 multiplicidades de infecciones distintas (MOI) para analizar la respuesta pro-inflamatoria generada (MOI 10, 50 y 100) elegidas por literatura (Gal-Mor *et al.* 2012) (Sierro *et al.* 2001). Se sabe que este patógeno es reconocido por células epiteliales intestinales por medio de la detección de monómeros de flagelina vía TLR-5 (Lyons *et al.* 2004). Cabe destacar que ninguna de las dosis de infección con *S.typhimurium*, incrementó los niveles de IL-8 en células Caco-2. Existen antecedentes en la literatura con respecto a esto, en donde *Serovar Typhimurium* no induce IL-8, en células Caco-2 cultivadas en ausencia de suero, indicando que los factores séricos también pueden ser importantes para la producción de IL-8 inducida por *Serovar typhimurium* (Mynott *et al.* 2002). Cabe destacar que durante los ensayos de infección realizados en este trabajo, los medios de cultivo de células Caco-2 si fueron suplementados con suero fetal bovino al 10% (pero sin presencia del mix de

antibióticos para no matar las bacterias de Salmonella), lo que en este caso no habría afectado el resultado observado. Por otro lado, también hay evidencia de una reducida secreción de IL-8 por células Caco-2 infectadas con Serovar Typhimurium a MOI 100, presumiendo que fue causada debido a la disrupción de las monocapas inducida por las bacterias (Mynott *et al.* 2002).

Por lo tanto, debido a la utilización de 2 estímulos distintos para generar una respuesta pro-inflamatoria, que no produjeron una alteración significativa de IL-8, se decidió descartar esta línea celular y trabajar sólo con las células epiteliales colónicas humanas HT-29, de las cuales existe evidencia bibliográfica del incremento de los niveles de mRNA de IL-8 (mediante Q-PCR) después de una exposición ante LPS (Angrisano *et al.* 2010).

Descartadas las células Caco-2, se procedió a evaluar el efecto de las mismas dosis de LPS mencionadas anteriormente esta vez en células HT-29 estableciéndose que ninguna dosis alteró la viabilidad celular en esta línea celular, al igual que en el trabajo desarrollado por Duary y sus colaboradores, donde el porcentaje de viabilidad de células HT-29 sometidas a tratamientos con 100 ng/ml LPS por 3h fue superior al 95% (Duary *et al.* 2014).

Se pudo determinar que todas las dosis de LPS utilizadas y descritas por literatura incrementaron significativamente la inducción de IL-8 en células HT-29 a ambos tiempos de tratamiento (3 y 6 h). Debido a que la dosis más baja utilizada (10ng/ml) al menor tiempo de tratamiento (3h) fue la que más incrementó los niveles de IL-8 con respecto al control, se decidió utilizar esta concentración de LPS. Este resultado apoya lo que indica en su trabajo Angrisano y sus colaboradores, quienes determinaron que mediante análisis de Q-PCR, los niveles de mRNA de IL-8 incrementan rápidamente en células HT-29 después de ser expuestas ante LPS (Angrisano *et al.* 2010).

Una vez ya definido el inductor de respuesta pro-inflamatoria y su dosis para células HT-29, se procedió a analizar el efecto de tBHQ en esta línea celular. Se sabe que tBHQ posee efectos quimiopreventivos, que podrían ser atribuidos debido a la fuerte inducción de los genes regulados por Nrf2, como HO-1 y NQO-1 (Cheung *et al.* 2011). Se decidió utilizar las concentraciones micromolares de tBHQ ya utilizadas en estudios previos en HT-29 (20, 50, 100 y 200 μ M) en tratamientos de 24h (Cheung *et al.* 2011), una concentración baja de 2 μ M utilizada en estudios en plaquetas (Cavallini *et al.* 1995) y la dosis intermedia de 150 μ M entre las dosis más altas probadas en HT-29. Se pudo determinar que ninguna dosis de tBHQ utilizada alteró significativamente la viabilidad celular. Existen reportes previos que indican que mediante

ensayos MTT realizados post-tratamientos de 24h con distintas concentraciones de tBHQ (1, 10, 50 100 y 500 μ M) en células Hepa 1c1c7 (células de hepatoma murino), las dosis de 1-200 μ M no afectan la viabilidad celular (Gharavi y El-kadi, 2005), lo que está de acuerdo con los resultados obtenidos.

Luego de establecer que las dosis de tBHQ utilizadas en los tratamientos, no alteraron la viabilidad celular en células HT-29, se evaluó su efecto sobre HO-1. Se pudo observar que la dosis más alta de tBHQ utilizada (200 μ M), produce un aumento significativo de la expresión de HO-1 en células HT-29, mediante análisis de Q-PCR. Este resultado es consistente por lo establecido por Cheung y sus colaboradores, donde pudieron determinar que tBHQ produce localización nuclear de Nrf2 e induce la expresión de mRNA y de la proteína de HO-1 en forma dosis dependiente (Cheung *et al.* 2011).

Establecidas las concentraciones a utilizar de tBHQ (200 μ M) y de LPS (10ng/ml), se realizaron nuevos experimentos que incluyeron los estímulos por sí solos y en co-estímulo, determinando que LPS no altera la expresión de HO-1 en células HT-29, pero en co-estímulo con tBHQ se genera un efecto sinérgico que induce la expresión de mRNA de HO-1 aún más que en tratamientos con tBHQ solo. Existen antecedentes bibliográficos que postulan que la expresión del gen de HO-1 y del gen de detoxificación de Glutatión S-transferasa (GSTs) son regulados positivamente después de tratamiento con LPS a concentraciones sub-letales (Kim *et al.* 2013). Por lo tanto, los resultados presentados estarían de acuerdo con la literatura y dan cuenta que es posible que ambos compuestos en co-estímulo hayan incrementado la expresión de mRNA de HO-1 en células HT-29, generando una mayor expresión de HO-1 que tBHQ en forma individual.

En células HT-29, TNF- α es inducido significativamente con 10ng/ml de LPS con respecto al control y tBHQ solo no afecta la expresión de mRNA de esta citoquina. Sin embargo, el co-estímulos de tBHQ con LPS induce significativamente la expresión de TNF- α con respecto al control y también con respecto al tratamiento con tBHQ. Cabe destacar que la inducción de la expresión de mRNA de esta citoquina expuesta a tratamientos en co-estímulo, muestra una tendencia a disminuir en tratamientos con LPS solo, sugiriendo que tBHQ podría de alguna manera ejercer un efecto anti-inflamatorio frente a LPS. Se ha descrito que la disminución de la actividad NF- κ B explica parcialmente el efecto anti-inflamatorio de tBHQ, lo que es consistente con estudios previos donde se ha demostrado que tBHQ o sulforafano disminuye la activación de

NF- κ B, y la producción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1 β , e IL-6 *in vitro* (Hae-Ryung y Loch-Caruso, 2014).

Por otro lado, IL-12a (que codifica para la sub-unidad p35 de IL-12p70), aumenta significativamente su expresión de mRNA mediada por LPS. Sin embargo, tBHQ ya sea solo o en co-estímulo con LPS no afecta significativamente la expresión de esta citoquina con respecto al control. Cabe destacar que si bien no hay evidencia que relacione el efecto de tBHQ sobre IL-12 en células HT-29, existen antecedentes donde se evalúa el efecto de tBHQ sobre las sub-unidades p35 y p40 (codificadas por los genes IL12A e IL12B, respectivamente) en células dendríticas humanas. En este estudio se pudo determinar que realizando pre-tratamientos con tBHQ se reprime significativamente los niveles de mRNA de IL12A e IL12B, lo que sugiere que Nrf2 podría mediar la inhibición de la expresión de IL12 en DCs tratadas con tBHQ (Cheung *et al.* 2011). Durante este trabajo no se observó que tBHQ modulara la inducción de IL-12 por el efecto pro-inflamatorio de LPS, posiblemente debido a que IL-12 es producida, principalmente, por células presentadoras de antígeno profesionales incluyendo células dendríticas, macrófagos y monocitos (Ma *et al.* 2015).

Con respecto a la expresión proteica de HO-1, al no ser una molécula secretada, se realizó una inmunofluorescencia indirecta. Se pudo determinar que células HT-29 expresan basalmente HO-1 y que hubo detección de esta proteína HO-1 en todos los tratamientos aplicados en esta línea celular. Además fue posible observar distribuciones, marcaciones e intensidades de cada tipo de marcación de HO-1 distintas. Sin embargo, no se observaron cambios significativos entre las distintas condiciones dentro de un mismo tipo de marca (reticular o punteada). Pero sí se observaron cambios significativos al evaluar el porcentaje de la doble marcación, donde tBHQ y CoPP (control positivo de expresión HO-1) son los únicos tratamientos que generan cambios significativos lo que daría cuenta que tBHQ induciría la expresión de la proteína HO-1, lo que coincidiría con lo reportado por Cheung y colaboradores (2011), quienes demostraron por western blot que esta proteína se induce a la dosis de tBHQ usada en este estudio.

Respecto a los tipos de marcación detectados especulamos que la marcación punteada se refiere a la distribución general de la enzima en la célula en las zonas donde se requiera su actividad anti-oxidante y/o posiblemente esta distribución general pueda estar asociada también al ciclo de degradación de la proteína y, que la marcación “reticular” observada como más intensa y como vesícula coincidente con la ubicación nuclear pudiera ser una ubicación de

retículo, de ahí el nombre “reticular” asignado. Aunque poco se sabe sobre las chaperonas, como HO-1, que pueden transportar hemo hidrófobo a través del citosol acuoso y, además, poco se sabe sobre la ruta para el transporte de hemo desde el fagosoma al HO-1 unido al retículo endoplasmático. Además, las enzimas hemo-oxigenasas (HOs) tienen una única región transmembrana C-terminal y se cree que espontáneamente se anclan a la membranas en el retículo endoplasmático (RE) en fracciones microsomales, ya que las HOs no tienen secuencia de orientación ER. Estudiando las fracciones microsomales de hígado de rata, se sugirió que la orientación de HO no es hacia el lumen microsómico, ya que la parte soluble principal (N-Terminal) fue escindible por tripsina a partir de la fracción microsomal *in vitro*. Sin embargo, la orientación de HO nunca se ha estudiado en células intactas (Gottlieb *et al.* 2012), por lo que se necesitan más estudios para poder aclararlo.

Por otro lado, con respecto a los experimentos realizados en PBMCs, se determinó que ninguna de las dosis seleccionadas por literatura de LPS, tBHQ y CoPP afectaron la viabilidad celular en PBMCs de sujetos controles mediante ensayos MTT. Con respecto a tBHQ, hay evidencia bibliográfica donde PBMCs humanas fueron estimuladas con 25 μ M tBHQ y se pudo establecer que no se altera significativamente la viabilidad celular, determinado con ensayos de exclusión de yoduro de propidio mediante citometría de flujo, por lo tanto, al ocupar concentraciones 5 veces menor (5 μ M) no debería haber disminución de viabilidad. LPS tampoco afectó la viabilidad en PBMCs de sujetos controles, lo que está en línea con estudios previos donde se ha reportado que en microglías, consideradas como las células inmunes del cerebro, tratadas con 1 μ g/ml LPS no se reduce la viabilidad celular evaluada mediante ensayos MTT (Acton, 2013). Durante este trabajo, en PBMCs sólo se realizaron tratamientos de 24h para todos los estímulos.

Al realizar el análisis Q-PCR de la forma A (comparando con respecto a la condición control en cada experimento independiente), se pudo determinar que en PBMCs de sujetos controles, el tratamiento de 24h con 5 μ M tBHQ no afecta la expresión de IL-8 e IL-12a, pero incrementó significativamente los niveles de expresión del mRNA de HO-1 (ya sean tratamientos con tBHQ solo o en co-estímulo con LPS). Estos resultados son consistentes con los resultados obtenidos por Turley y sus colaboradores, donde PBMCs humanas fueron tratadas con tBHQ (1-5 μ M), incrementando la expresión de los genes controlados por Nrf2; HO-1, NQO1y GCLC,

Sugiriendo que las concentraciones de tBHQ usadas en este estudio activan Nrf2 en PBMCs humanas primarias (Turley *et al.* 2015). Con respecto a IL-8, LPS incrementó significativamente la expresión de mRNA de esta citoquina en PBMCs, con respecto al control y, aparentemente, habría una tendencia del co-estímulo a reducir los niveles de expresión de IL-8, ya que los niveles de expresión de IL-8 al ser estimulados con tBHQ+LPS y al ser comparados con los niveles de la condición control y de tBHQ no muestran diferencias significativas entre ellos, lo que podría estar dando cuenta del efecto anti-inflamatorio de tBHQ en este modelo de estudio. Es importante decir que LPS solo versus tBHQ+LPS tampoco mostró diferencias significativas lo que puede deberse a la alta dispersión observada con LPS y el bajo número de muestras. Está reportado que NF- κ B está altamente activado en sitios de inflamación en diversas enfermedades y que puede inducir la transcripción de citoquinas pro-inflamatorias, quimioquinas, moléculas de adhesión, MMPs, Cox-2 y óxido nítrico inducible (iNOS). Además, NF- κ B es uno de los reguladores más importantes de la expresión génica pro-inflamatoria, donde la síntesis de citoquinas tales como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 es mediada por esta molécula (Tak y Firestein, 2001). Sin embargo, existen antecedentes que han demostrado que Nrf2, inducido por tBHQ, inhibe la señalización NF- κ B en varios tipos de células, en las que el tratamiento con tBHQ disminuye la unión a ADN de NF κ B en extractos nucleares de PBMCs. Sin embargo, se necesitarán estudios adicionales para determinar el efecto de tBHQ en la defensa del huésped humano (Turley *et al.* 2015).

Con respecto a IL-12a (análisis Q-PCR forma A), si bien hubo una inducción de la expresión de mRNA de IL-12a con LPS, respecto al control, no hubo una diferencia significativa. A pesar de esto, el perfil de los niveles de expresión son similares a los de IL-8, observándose que tBHQ solo no afectó la expresión de esta citoquina y observándose también una tendencia a bajar la expresión de IL-8 con el co-estímulo acercándose a los valores de la condición control. Existe evidencia bibliográfica de que IL-12 es producida por células fagocíticas y células presentadoras de antígeno (APC), tales como monocitos, macrófagos y células dendríticas cuando estas células son activadas por componentes bacterianos, incluyendo lipopolisacárido (LPS) (Takata *et al.* 1998). Por otro lado, Macoch y sus colaboradores pudieron demostrar que pre-tratamientos con tBHQ reprimen significativamente los niveles de mRNA de IL12A e IL12B en células dendríticas humanas estimuladas con LPS. Otros estudios relacionados con tBHQ demostraron que LPS induce la producción de luciferasa y, que tert-butil hidroquinona (tBHQ), un prototipo de antioxidantes fenólicos, bloquea esta inducción en la célula. Además, está

reportado que ciertos antioxidantes fenólicos exhiben actividad anti-inflamatoria y, por lo tanto, protegen contra la toxicidad química, pero el mecanismo de la anti-inflamación por los antioxidantes es poco claro aún (Kinneer *et al.* 2002). La no significancia observada se puede deber a que sólo se pudieron realizar 3 experimentos independientes (n=3), debido a la dificultad de rendimiento presentada durante la extracción de RNA en PBMCs obteniendo poca cantidad de RNA para poder realizar los análisis por Q-PCR (concentraciones de RNA bajo los 50 ng/ μ L), por lo cual no se pudo evaluar el efecto de tBHQ en las citoquinas IFN- γ , TNF- α e IL-10.

Una vez analizado el efecto de las distintas condiciones en PBMCs de sujetos controles, se procedió a evaluar su efecto en PBMCs de pacientes afectados con EC (análisis Q-PCR forma A). Como el rendimiento de extracción de RNA total fue aún más bajo que en las muestras de los sujetos controles no fue posible poder extraer cantidades suficientes de RNA para realizar los mismos análisis de Q-PCR como se hizo en sujetos controles (con 100 ng por reacción de Q-PCR), y las reacciones de Q-PCR fueron realizadas con 50 ng/ por reacción de Q-PCR para las mismas 3 moléculas analizadas con las muestras de los sujetos controles (n=3).

Sobre la expresión de los niveles de HO-1 en muestras de PBMCs de pacientes con EC, se pudo determinar que tBHQ (solo o en co-estímulo) y también LPS solo mostraban una tendencia a aumentar los niveles de mRNA comparados con la condición control (no tratada), pero no alcanzó a haber un incremento significativo de la expresión de mRNA de esta enzima. Existen reportes donde vinculan LPS con inducción de la expresión de mRNA de HO-1, donde particularmente en un estudio realizado por Camhi y sus colaboradores, demuestran que LPS induce altos niveles de mRNA del gen inducible por estrés hemo oxigenasa-1 (HO-1) en el pulmón de rata y que el aumento de los niveles de ARNm de HO-1 se correlaciona con el aumento de la proteína HO-1 y la actividad enzimática. Además, se examinó la regulación molecular de la expresión de HO-1 después de la exposición de células de macrófagos RAW 264,7 a LPS *in vitro* y se pudo establecer que estas células responden a LPS con mayor expresión de mRNA de HO-1 y transcripción de genes de HO-1, cuya activación transcripcional mediante LPS, está mediada por un fragmento distal 5' localizado aproximadamente a 4 kbp río arriba del sitio de transcripción (Cahmi *et al.* 1998). Por otro lado, la ausencia de cambios significativos con respecto a la condición control también podría explicarse debido tal vez a una

alta expresión basal de esta enzima en sujetos con inflamación crónica como los afectados por EC.

Con respecto al análisis de los datos de Q-PCR de la forma **B**, esto es, comparar entre los grupos de muestras normalizando los datos por los promedios del grupo control en la condición control (no tratada), no se pudo realizar dado que sólo alcanzó muestra para un par de las moléculas de interés, sin lograr un número de muestras mínimas para las muestras de pacientes con EC.

Además, se evaluó el efecto de tBHQ en biopsias colónicas de sujetos controles y en pacientes afectados con EC. Se realizó el análisis de los datos obtenidos por Q-PCR de la forma **A** y **B**. Interesantemente, no existen antecedentes bibliográficos que relacionen los efectos de tBHQ con tejido intestinal humano, por lo que este trabajo sería el primer acercamiento para comprender el efecto de este compuesto sobre HO-1, como también en la secreción de mediadores inflamatorios en tejido intestinal de sujetos controles y de pacientes con EC.

Se pudo determinar que ninguna dosis de LPS usada (obtenida de la literatura) afectó la viabilidad celular en biopsias de sujetos controles, resultado que concuerda con lo realizado por Bahar y sus colaboradores, donde concluyeron que el explante de colon sigue siendo fisiológicamente viable y responde al desafío inmunológico hasta por 3h *ex vivo* (Bahar *et al.* 2016). Con respecto a tBHQ, al no haber antecedentes bibliográficos sobre las concentraciones utilizadas en tejido intestinal, se decidió utilizar la dosis más alta de tBHQ aplicada en HT-29 (200µM) y también una concentración de tBHQ mayor (500µM), ya que los tejidos humanos están compuestos por una multiplicidad de tipos celulares, muchos de los cuales son desconocidos y no caracterizados (Kalisky *et al.* 2013). Al igual que con LPS, se pudo determinar que ninguna dosis de tBHQ afectó significativamente la viabilidad celular.

Al hacer el análisis de los datos de Q-PCR de la forma **A**, se pudo obtener la siguiente información:

Con respecto a HO-1, se determinó que sólo la dosis de 500µM de tBHQ, incrementó significativamente la expresión de mRNA de HO-1 en biopsias colónicas de sujetos controles. Por otro lado, solo la dosis menor utilizada de LPS (1µg/ml), pudo incrementar significativamente la expresión de mRNA de IL-8, gatillando una respuesta inflamatoria. Existen reportes en la literatura de inducción de HO-1 en tejido intestinal, como en el trabajo de Zhu y sus colaboradores donde la expresión de HO-1 fue inducida por inflamación intestinal en

modelos animales, y el aumento de la expresión de esta enzima se encontró en biopsias de colon de pacientes con EII. Sin embargo, no está claro si HO-1 en enterocitos y, en otras células y / o tejidos (incluyendo las células inmunitarias que se infiltran en el colon inflamado) es importante para el papel protector de la inducción de HO-1 contra la inflamación del colon (Zhu *et al.* 2015). Respecto a IL-8, aumenta su expresión mediada por LPS, como lo descrito por Mukhopadhyaya, donde se demostró que en tejidos colónicos porcinos, el tratamiento con LPS fue asociado con un incremento en los niveles de mRNA de IL-8, comparado con el tejido colónico no tratado (Mukhopadhyaya *et al.* 2014). A raíz de esto, las dosis de 500 μ M de tBHQ y 1 μ g/ml de LPS, fueron seleccionadas para los experimentos posteriores de evaluación del efecto anti-inflamatorio de tBHQ.

Ya determinado que las dosis de tBHQ y LPS generaban los efectos esperados en biopsias intestinales, se procedió a analizar ambos compuestos en co-estímulo en nuevos experimentos independientes incluyendo todas las condiciones. Se estableció que 500 μ M tBHQ, fue el único tratamiento que indujo significativamente la expresión de mRNA de HO-1 en biopsias colónicas controles, a diferencia de lo ocurrido en la monocapa de epitelio intestinal de células HT-29, donde ambos compuestos en co-estímulo si inducen a esta enzima.

Con respecto a IL-8, se determinó que LPS induce significativamente la expresión de IL-8 en explantes colónicos controles y en explantes EC ZS, pero no en biopsias EC ZA. Además, tBHQ solo o en co-estímulo, no afecta la expresión de mRNA de esta quimioquina en ningún grupo de explante. Sin embargo, en explantes controles y EC ZS, se produjo una disminución significativa de la expresión de mRNA de IL-8 mediada por LPS al realizar el co-estímulo tBHQ+LPS. Como no existen reportes del efecto de tBHQ con explantes colónicos, se procedió a analizar los fármacos administrados a los pacientes de los cuales se obtuvieron muestras biológicas. Está reportado que las drogas farmacéuticas de todos los tipos y clases influyen en el sistema inmunológico, pero los mecanismos de estas perturbaciones son a menudo poco conocidos (Kidd *et al.* 2016). De los sujetos de los cuales se obtuvieron biopsias colónicas controles, 8 de 9 personas consumían distintos fármacos que podrían modular la respuesta inflamatoria. De estos fármacos administrados, entre ellos el Omeprazol, bloquea la secreción de IL-8 mediante la supresión de la activación del promotor de IL-8, lo que disminuye la expresión de mRNA de IL-8 estimulada por sales biliares ácidas, en células escamosas del esófago (Huo *et al.* 2014). Si bien en este estudio se utilizó LPS como inductor de la expresión de IL-8, el efecto

generado en esta citoquina fue el mismo que el descrito por Huo y sus colaboradores, por lo que se requieren más estudios de interacción tBHQ-LPS para poder establecer este efecto. Con respecto a IL-12a, TNF- α e IFN- γ , no fue posible modular significativamente la expresión de mRNA con respecto al grupo control en ningún grupo de explantes colónicos (Controles, EC ZS y EC ZA), ya sea con LPS como con tBHQ (solo o en co-estímulo). Por otro lado, con respecto a los fármacos administrados a los pacientes de los cuales se obtuvieron biopsias de colon, está reportado que el tratamiento con Enalapril (consumido por algunos pacientes) inhibió la activación de NF-kB y AP-1, la expresión de TNF, colágeno y la deposición de colágeno en ratones C57BL/6 expuestos a bleomicina (Ortiz *et al.* 2002). Además, Losartan (otro fármaco consumido por las personas de las cuales se obtuvieron biopsias), disminuyó la producción de IFN- γ (P <0,001) en células T alorreactivas purificadas *in vitro*, según lo reportado por Weidanz *et al.* (2005). Si bien son muchos los fármacos consumidos por los sujetos controles y pacientes con EC de los cuales se han obtenido muestras intestinales, se requieren más estudios ojalá con sujetos que no consuman fármacos (sanos) y pacientes con Ec naive, idealmente hablando, de modo de poder aclarar el efecto de tBHQ en tejido intestinal, y poder descartar como a variable a considerar el posible efecto en la interacción con fármacos consumidos frecuentemente por las personas y también el efecto de estos fármacos sobre la respuesta inmune intestinal.

Con respecto al análisis de los datos de Q-PCR de la forma **B**, esto es, comparar entre los grupos de muestras normalizando los datos por los promedios del grupo control en la condición control (no tratada), no se observaron diferencias significativas entre las distintas condiciones de cada grupo respecto a la condición control, ni entre la misma condición de los distintos grupos (ver anexo 4).

Finalmente, se analizó la secreción de las citoquinas en estudio en explantes de sujetos sanos y pacientes con EC (ZS y ZA), sometidos a tratamientos con LPS y tBHQ (solo o en co-estímulo con LPS). Se pudo determinar que IL-8 fue altamente secretado en los 3 grupos de explantes (grupos sujetos Control, EC ZS y EC ZA) sobrepasando el límite superior de detección de la técnica en todas las condiciones. Además, tBHQ (solo y en co-estímulo) generó una tendencia a disminuir la expresión de mRNA de IL-8, aunque no fue significativa con respecto a la condición control en cada grupo de explantes de sujetos controles o de pacientes con EC ZS. Daig y sus colaboradores pudieron determinar en su trabajo que la proteína IL-8 aumentó significativamente en los especímenes macroscópicamente inflamados de la enfermedad de

Crohn, colitis ulcerosa y controles inflamados en comparación con los controles normales (Daig *et al.* 1996). Sin embargo, esta diferencia no lo observamos posiblemente debido a que nuestro grupo de sujetos controles la mayoría de ellos consumían medicamentos.

Con respecto a TNF- α , los niveles de secreción de citoquinas del grupo control y EC ZS fueron muy bajos con respecto al valor del grupo de EC ZA en la condición control. Por otro lado, en cuanto a las diferencias entre las distintas condiciones dentro de un mismo grupo, no se observaron cambios significativos a pesar que si se ve una tendencia de lecturas mayores de secreción de TNF- α en los explantes de EC ZA, lo que se entiende por ser un área afectada y, por lo tanto, inflamada. Tomasz y sus colaboradores pudieron observar que la concentración elevada de proteína TNF- α que se correlacionaba con la actividad de la enfermedad, estaba presente en el suero sanguíneo de pacientes con EC, mientras que otros grupos encontraron niveles aumentados de proteína TNF tanto en suero como en la lámina intestinal de pacientes EC y CU, como la submucosa intestinal de los pacientes con EC. Sin embargo, la producción de TNF en la mucosa del colon de los pacientes con CU se localizó en macrófagos de la lámina propia. Aunque varios grupos no detectaron niveles incrementados de proteína TNF o mRNA en suero sanguíneo o mucosa de colon de pacientes con EII, respectivamente (Ślebioda y Kmiec, 2014).

Con respecto a IL-12a e IFN- γ , se pudo observar un perfil de secreción muy similar, donde en ambas citoquinas no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos dentro de cada grupo de explante, ni tampoco entre la misma condición entre los distintos grupos de explantes. Sin embargo, se observó que el tratamiento con tBHQ (solo o en co-estímulo con LPS) generó una tendencia a la disminución de la secreción de ambas citoquinas pro-inflamatorias en todos los grupos de explantes con respecto a su condición control y que el tratamiento con LPS no indujo la secreción de estos mediadores pro-inflamatorios en ningún grupo de explante, siendo sus valores siempre cercanos a los de la condición control. Existen reportes que respaldan estos resultados sobre disminución de la expresión de IFN- γ mediada por tBHQ en células inmunes, donde Turley y sus colaboradores pudieron determinar que células T CD4 aisladas eran más sensibles a tBHQ que las PBMC totales, con una mayor disminución en la producción de IFN- γ e IL-2. (Turley *et al.* 2015). En cuanto a IL-12a, existe evidencia de que tBHQ disminuye la expresión de esta citoquina en células dendríticas humanas, donde Macoch y sus colaboradores pudieron determinar que tBHQ, conocido como inductor de expresión y

actividad de Nrf2 activa Nrf2 en células dendríticas inmaduras y que también inhibe fuertemente la inducción de la expresión de IL-12 mediado por LPS (Macoch et al. 2015). Si bien, la mayoría de los reportes descritos que estudian el efecto de tBHQ en la respuesta inmune están realizados en células del sistema inmune, se puede apreciar un comportamiento a disminuir la secreción de las citoquinas TNF- α , IFN- γ e IL12a posiblemente debido a la presencia de células inmunes residentes del sistema gastrointestinal (Vighi et al. 2008) y a las células inmunes infiltrantes en los explantes de pacientes con EC.

Finalmente, con respecto a IL-10, hubo un comportamiento similar a TNF- α , IFN- γ e IL-12a, a una escala de secreción mucho menor, pero con la diferencia que en el grupo de explantes EC ZA, se pudo determinar que 500 μ M tBHQ produjo una disminución en la secreción de esta citoquina anti-inflamatoria con respecto a los explantes controles de manera significativa. Este resultado no era lo esperado según lo reportado en literatura, donde Drechsler y sus colaboradores establecieron que HO-1 también regula la producción de IL-10 y TNF- α , ya que pudieron observar que en ratones estimulados con LPS *in vivo*, la activación de HO-1 aumentó IL-10 e inhibieron los niveles séricos de TNF- α (Drechsler et al., 2006). Sin embargo, con nuestras muestras sólo logramos alcanzar a ver una tendencia de incremento de HO-1 con tBHQ tanto en biopsias EC ZS como en biopsias de EC ZA por lo que la inducción de IL-10 no era totalmente esperada. Por lo tanto, si bien tBHQ generó un incremento en la expresión de HO-1 y una tendencia a disminuir la secreción citoquinas pro-inflamatorias claves como TNF- α , IFN- γ e IL-12 en tejido intestinal, se requieren más estudios para poder establecer su efecto anti-inflamatorio en tejido intestinal colónico.

7. CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES

7.1 Objetivo 1: Modelo línea celular intestinal HT-29

Las células Caco-2 fueron poco responsivas ante los gatillantes de respuesta inflamatoria probados, por lo que fueron descartadas como modelo y se continuo trabajando en las células HT-29 ya que estas células no se vieron afectadas por tBHQ ni LPS y además fueron capaces de generar una respuesta inflamatoria al evaluar los niveles de expresión de mRNA de IL-8.

Respecto a los niveles de expresión de mRNA, se pudo observar que:

1. 200 μ M tBHQ induce significativamente la expresión de mRNA de HO-1 con respecto al control, solo y en co-estímulo. LPS no induce HO-1.
2. Con respecto a los niveles de expresión de mRNA de las citoquinas, LPS Induce el incremento significativo de la expresión de mRNA para IL-8, IL-12a y TNF- α , tBHQ no las induce y en co-estímulos, se induce IL-8 y TNF- α , por lo que tBHQ no tendría un efecto anti-inflamatorio en este modelo.
3. Con respecto a IFN- γ e IL-10, no fue posible detectar niveles de expresión para estas citoquinas.

Por lo tanto, dado los antecedentes anteriores podemos decir que esta línea celular no es el modelo más adecuado para responder de manera íntegra este objetivo. Al evaluar la expresión proteica de HO-1 en este modelo se pudo determinar que todas las células expresaron basalmente HO-1 con respecto a la condición control. También se pudo detectar 2 tipos de marca: una punteada dispersa en la célula más opaca y otra que coincide con la localización nuclear (reticular) más concentrada e intensa fluorescentemente. Respecto a los 2 tipos de marca, las distintas condiciones no modificaron el porcentaje de marcación ya sea punteado o reticular. Sin embargo, al realizar un análisis con respecto a la doble marca, se pudo determinar que 200 μ M tBHQ, aumentó significativamente con respecto al control, relacionando este aumento con un incremento de la expresión proteica de esta enzima, ya que CoPP (inductor de la expresión de mRNA y proteína de HO-1), también incrementó significativamente esta marca con respecto al control.

7.2 Objetivo 2: Modelo PBMC

Se determinó que 25 ng/ml LPS y 5 μ M tBHQ no afectan la viabilidad celular en PBMCs de sujetos controles durante tratamientos de 24h.

La extracción de RNA realizadas en este modelo, fue mucho menos eficiente que en los otros 2 modelos, ya sea en PBMCs de sujetos sanos como en pacientes con EC, siendo en estos últimos aún menos eficiente, por lo que se debió usar la mitad de la cantidad de RNA para poder evaluar las mismas citoquinas que en sujetos controles (50ng RNA/racción deQ-PCR).

LPS incrementa de manera significativa la expresión de mRNA de IL-8 con respecto al control. Con respecto a IL-12, LPS muestra una tendencia a aumentar los niveles de mRNA de esta citoquina con respecto al control, por lo que se requieren más experimentos independientes para poder evaluarlo. Sin embargo, con respecto a PBMCs de pacientes con EC, no fue posible realizar el análisis de expresión de IL-8 ni de IL-12a.

Se pudo determinar que dosis bajas de 5 μ M de tBHQ, aumentan significativamente la inducción de los niveles de expresión de HO-1 en PBMCs de sujetos controles. En cambio en PBMCs de pacientes con EC, solo se observa una tendencia a aumentar de los niveles de mRNA de HO-1, pero no alcanza a ser significativa.

Estas células con respecto al modelo anterior, son más responsivas en cuanto a la expresión de HO-1 ya que con dosis tan bajas como 5 μ M se logra una expresión más significativa y en cuanto a la expresión significativa de citoquinas se pudo observar que ambos modelos inducen las citoquinas pro-inflamatorias IL-8 e IL-12a.

7.3 Modelo *ex vivo* de explante colónico humano

En este modelo, las dosis probadas de los estímulos LPS 3h y tBHQ 24h no modificaron la viabilidad celular de explantes de sujetos controles en cultivo.

tBHQ (500 μ M) incrementa significativamente los niveles de expresión de HO-1 con respecto a la condición control en explantes de sujetos controles y genera una clara tendencia a incrementar la expresión de mRNA de HO-1 en explantes de EC ZS, sin embargo, esta tendencia no es tan clara en explantes EC ZA y, además, LPS no produce ningún cambio en los niveles de expresión de HO-1, por lo que la respuesta protectora frente al LPS gatillada en este modelo no es por la vía de inducción de HO-1, pero para esto se requieren más estudios para poder evaluarlo. Con respecto a LPS, HO-1 no cambia sus niveles de expresión en los 3 grupos de explantes.

Con respecto al co-estimulo de tBHQ con LPS, en explantes de sujetos controles el efecto de LPS domina sobre el efecto de tBHQ sobre los niveles de expresión de HO-1. Sin embargo, en explantes EC se ve una tendencia al aumento de la expresión de mRNA de HO-1. Para definir si esta tendencia es significativa, requieren más experimentos independientes para poder evaluarlo.

Respecto a IL-8, se pudo reproducir lo reportado en la literatura, ya que se observó un incremento en la expresión de mRNA de esta citoquina con dosis de 1 μ g/ml (3h), en explantes de sujetos controles como en explantes EC ZS, pero no en explantes EC ZA.

tBHQ si bien no afecta la expresión de IL-8 con respecto al control, sus niveles son inferiores respecto a la condición control. Sin embargo, en co-estímulo con LPS, la expresión de esta citoquina es significativamente más baja que la expresada por LPS y alcanzando valores casi tan bajos como con tBHQ solo ya sea en explantes de sujetos controles como en biopsias EC ZA, pero no en EC ZA. Si bien el perfil de expresión de IL-8 es similar a los de los otros 2 grupos de explantes, no se alcanzaron a ver diferencias significativas. Por lo tanto, solo podemos decir que tBHQ tiene efecto anti-inflamatorio frente a los niveles de expresión de IL-8 en explantes de EC ZS de pacientes con EC igual a lo observado en los sujetos controles.

Con respecto a IL-12, IFN- γ e IL-10 no se observaron cambios significativos en la expresión de mRNA en ningún grupo de explante colónico tratado (Controles, EC ZS y EC ZA) y a nivel de expresión de proteína, si bien no se observan diferencias significativas, sí se observan perfiles similares de secreción de citoquinas para IL-12 α , IFN- γ e IL-10. Por lo tanto, no habría co-relación entre los niveles de expresión de mRNA de estas citoquinas con los niveles de secreción de estas citoquinas (al tiempo de 24h de tratamiento).

Por lo tanto, dadas las diferencias del perfil de comportamiento entre los tres modelos utilizados frente a los distintos estímulos y las respuestas observadas, no es posible hacer una conclusión general. Sin embargo, a pesar del incremento significativo de la expresión de mRNA de HO-1 en los 3 modelos de estudio analizados con tBHQ; de la tendencia del co-estímulo a disminuir el incremento de expresión de IL-8 e IL-12a en PBMCs de sujetos controles, respecto a la inducción con LPS; y, a pesar de la disminución significativa debido al co-estímulo de la expresión de IL-8, en biopsias colónicas de sujetos sanos y de EC ZS, se puede decir, que sólo hubo un efecto anti-inflamatorio a nivel intestinal, en estos explantes, y que sólo se observó una tendencia anti-inflamatoria en EC ZA. Por lo tanto, se requiere aumentar el número de experimentos independientes y, realizar más estudios para poder establecer este posible efecto anti-inflamatorio local de tBHQ y dilucidar si tiene realmente un efecto sistémico, a pesar de los efectos terapéuticos mencionados anteriormente.

8. REFERENCIAS

- Abraham C, Medzhitov R. (2011). Interactions between the host innate immune system and microbes in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 140(6), 1729–37.
- Abreu MT, Vora P, Faure E. (2001). Decreased Expression of Toll-Like Receptor-4 and MD-2 Correlates with Intestinal Epithelial Cell Protection Against Dysregulated Proinflammatory Gene Expression in Response to Bacterial Lipopolysaccharide. *The Journal of Immunology*, 167(3), 1609–1616.
- Al-Ghadban S, Kaissi S, Homaïdan. (2016). Cross-talk between intestinal epithelial cells and immune cells in inflammatory bowel disease. *Scientific reports*, 6(June).
- Alvarez-Lobos M, Arostegui JI. (2005). Crohn's disease patients carrying Nod2/CARD15 gene variants have an increased and early need for first surgery due to stricturing disease and higher rate of surgical recurrence. *Annals of surgery*, 242(5), 693–700.
- Angrisano T, Pero R, Peluso S. (2010). LPS-induced IL-8 activation in human intestinal epithelial cells is accompanied by specific histone H3 acetylation and methylation changes. *BMC microbiology*, 10, 172.
- Bahar B, O'Doherty JV, Vigors S, Sweeney T (2016). Activation of inflammatory immune gene cascades by lipopolysaccharide (LPS) in the porcine colonic tissue ex-vivo model. *Clin Exp Immunol* 186, 266-276.
- Baumgart DC (2009). The diagnosis and treatment of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Dtsch Arztebl Int* 106:123-133.
- Belkaid Y, Hand T. (2008). Role of the Microbiota in Immunity and inflammation. *National Institutes Of Health*, 6(9), 2166–2171.
- Bettelli E, Kuchroo VK. (2005). IL-12– and IL-23–induced T helper cell subsets: birds of the same feather flock together. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(2), 169–171.
- Borruel N, Carol M, Casellas F. (2002). Increased mucosal tumour necrosis factor alpha production in Crohn's disease can be downregulated ex vivo by probiotic bacteria. *Gut*, 51(5), 659-64
- Bonyadi M, Abdolmohammadi R, Jahanafrooz Z. (2014).TNF-alpha gene polymorphisms in Iranian Azari Turkish patients with inflammatory bowel diseases. *Saudi journal of gastroenterology : official journal of the Saudi Gastroenterology Association*, 20(2), 108–12.

- Brown K, DeCoffe D, Molcan E, Gibson DL. (2012). Diet-induced dysbiosis of the intestinal microbiota and the effects on immunity and disease. *Nutrients* 4:1095-119.
- Bryan HK, Olayanju A, Goldring CE. (2013). The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation. *Biochemical pharmacology*, 85(6), 705–17.
- Camhi SL, Alam J, Wiegand GW, Chin BY, Choi AM (1998). Transcriptional activation of the HO-1 gene by lipopolysaccharide is mediated by 5' distal enhancers: role of reactive oxygen intermediates and AP-1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18, 226-34.
- Carpenter HA, Talley NJ. (2000). The importance of clinicopathological correlation in the diagnosis of inflammatory conditions of the colon: histological patterns with clinical implications. *The American journal of gastroenterology*, 95(4), 878–96.
- Cavallini L, Coassin M, Alexandre A. (1995). Two classes of agonist-sensitive Ca²⁺ stores in platelets, as identified by their differential sensitivity to 2,5-di-(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone and thapsigargin. *The Biochemical journal*, 452(Pt 2), 449–52.
- Chang WK., Yang KD, Shaio MF. (1999). Lymphocyte proliferation modulated by glutamine: Involved in the endogenous redox reaction. *Clinical and Experimental Immunology*, 117(3), 482–488.
- Chaplin DD (2010). Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol.* 125 (2 Suppl 2):S3-23.
- Chen H, Liu S, Lin H. (2015). Irisfloreantin improves α -synuclein accumulation and attenuates 6-OHDA-induced dopaminergic neuron degeneration, implication for Parkinson's disease therapy. *BioMedicine*, 5(1), 24-32
- Cheung KL, Yu S, Pan Z, (2011). tBHQ-induced HO-1 expression is mediated by calcium through regulation of Nrf2 binding to enhancer and polymerase II to promoter region of HO-1.
- De Santis S, Cavalcanti E, Mastronardi M, Jirillo E, Chieppa M. (2015). Nutritional Keys for Intestinal Barrier Modulation. *Front Immunol.* 6:612.
- Digestiva A. E. de E. (2010). *Tratado de ultrasonografía abdominal* (Vol. 26). Ediciones Díaz de Santos.
- Duary RK, Batish VK, Grover S. (2014). Immunomodulatory activity of two potential probiotic strains in LPS-stimulated HT-29 cells. *Genes & nutrition*, 9(3), 398.
- EFSA. (2004). Opinion of the Scientific Panel on Food Additives , Flavourings , Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to tertiary - Butylhydroquinone (TBHQ) Question number EFSA-Q-2003-141. *EFSA Journal*, 84, 1–50.

- Elewaut D, DiDonato J, Truong F. (1999). NF- κ B is a central regulator of the intestinal epithelial cell innate immune response induced by infection with enteroinvasive bacteria. *J. Immunology*, 163, 1457–1466.
- Evans JM, Morris LS, Marchesi JR. (2013). The gut microbiome: the role of a virtual organ in the endocrinology of the host. *J Endocrinol.* 218(3):R37-47.
- Ewing JF, Maines MD. (1995). Distribution of constitutive (HO-2) and heat-inducible (HO-1) heme oxygenase isozymes in rat testes: HO-2 displays stage-specific expression in germ cells. *Endocrinology*, 136(5), 2294–302.
- Fakhoury M, Negrulj R, Mooranian A. (2014). Inflammatory bowel disease: clinical aspects and treatments. *Journal of inflammation research*, 7, 113–20.
- Fantuzzi G, David A, Reed CAD. (1999). IL-12-induced IFN- γ is dependent on caspase-1 processing of the IL-18 precursor.
- Ferraretto A, Gravaghi C, Donetti E. (2007). New methodological approach to induce a differentiation phenotype in Caco-2 cells prior to post-confluence stage. *Anticancer research*, 27(6B), 3919–25.
- Figueroa C, Quera P, Valenzuela E. (2005). Enfermedades inflamatorias intestinales: Experiencia de dos centros chilenos. *Revista Medica de Chile*, 133(11), 1295–1304.
- Fiocchi C. (1997). Intestinal inflammation: a complex interplay of immune and nonimmune cell interactions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 273(4), 769–775.
- Fiocchi C. (2008). What is "physiological" intestinal inflammation and how does it differ from "pathological" inflammation?. *Inflamm Bowel Dis. Suppl 2*:S77-8.
- Florczyk U, Łoboda A, Stachurska A. (2010). [Role of Nrf2 transcription factor in cellular response to oxidative stress]. *Postepy biochemii*, 56(2), 147–55.
- Flores AI. (2015). Stem cell therapy in inflammatory bowel disease: A promising therapeutic strategy. *World Journal of Stem Cells*, 7(2), 343.
- Frosali S, Pagliari D, Gambassi G. (2014). How the Intricate Interaction among Toll-Like Receptors, Microbiota, and Intestinal Immunity Can Influence Gastrointestinal Pathology.
- Fujino S, Andoh A, Bamba S. (2003). Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut*, 52(1), 65–70.
- Gagnon M, Zihler Berner A, Chervet N. (2013). Comparison of the Caco-2, HT-29 and the mucus-secreting HT29-MTX intestinal cell models to investigate Salmonella adhesion and invasion. *Journal of Microbiological Methods*, 94(3), 274–279.

- Gal-Mor O, Suez J, Elhadad D. (2012). Molecular and cellular characterization of a *Salmonella enterica* serovar paratyphi A outbreak strain and the human immune response to infection. *Clinical and Vaccine Immunology*, 19(2), 146–156.
- Gee K, Guzzo C, Che Mat NF. (2009). The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders. *Inflammation & allergy drug targets*, 8(1), 40–52.
- Gerritsen J, Smidt H, Rijkers GT. (2011). Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. *Genes & nutrition*, 6(3), 209–40.
- Gerson LB, Triadafilopoulos G. (2000). Palliative care in inflammatory bowel disease: an evidence-based approach. *Inflammatory bowel diseases*, 6(3), 228–43.
- Gharavi N, El-kadi AOS. (2005). Tert-butylhydroquinone is a novel aryl hydrocarbon receptor ligand. *Drug Metabolism and Disposition*, 33(3), 365–372.
- GI Microbiota and Regulation of the Immune System*. (2009). Springer Science & Business Media.
- Goldhill JM, Stojadinovic A, Kiang J. (1999). Hyperthermia prevents functional, histological and biochemical abnormalities induced during ileitis. *Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 11(1), 69–76.
- Gottlieb Y, Truman M, Cohen L. (2012). Endoplasmic reticulum anchored heme-oxygenase 1 faces the cytosol. *Haematologica*, 97(10), 1489–1493.
- Guinane CM., Cotter PD. (2013). Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ. *Therapeutic advances in gastroenterology* 6, 295–308.
- Hae-Ryung P, Loch-Carusio R. (2014). Protective Effect of Nuclear Factor E2-Related Factor 2 on Inflammatory Cytokine Response to Brominated Diphenyl Ether-47 in the HTR-8/SVneo Human First Trimester Extravillous Trophoblast Cell Line. *Toxicol Appl Pharmacol* 281(7503), 67–77.
- Harrison C. (2014). Patent watch: Stelara safe after IL-12 antibody dispute. *Nature Reviews Drug Discovery* 13, 647–647.
- Hayashi S, Omata Y, Sakamoto H. (2004). Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. *Gene*, 336(2), 241–50.
- Hekmati M, Polak-Charcon S, Ben-Shaul Y. (1990). A morphological study of a human adenocarcinoma cell line (HT29) differentiating in culture. Similarities to intestinal embryonic development. *Cell differentiation and development: the official journal of the International Society of Developmental Biologists*, 31(3), 207–18.

- Henderson P, Stevens C. (2012). The Role of Autophagy in Crohn's Disease. *Cells*, 1(4), 492–519.
- Hilgendorf C, Spahn-Langguth H, Regårdh CG. (2000). Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX co-cultured cell lines: permeabilities via diffusion, inside- and outside-directed carrier-mediated transport. *Journal of pharmaceutical sciences*, 89(1), 63–75.
- Hill-Batorski L, Halfmann P, Neumann G. (2013). The Cytoprotective Enzyme Heme Oxygenase-1 Suppresses Ebola Virus Replication. *Journal of Virology*, 87(24), 13795–13802.
- Hodge-Dufour J, Marino MW, Horton MR. (1998). Inhibition of interferon gamma induced interleukin 12 production: a potential mechanism for the anti-inflammatory activities of tumor necrosis factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(23), 13806–11.
- Hung QD, Kanika A, Bowen LN. (2012). Toll-like Receptor 4 Activation Increases Akt Phosphorylation in Colon Cancer Cells. *National Institutes Of Health*, 76(October 2009), 211–220.
- Imhoff BR, Hansen JM. (2010). Tert-butylhydroquinone induces mitochondrial oxidative stress causing Nrf2 activation. *Cell Biol Toxicol*, 26(6), 541-51
- Ireland KA. (2010). *Visualizing Human Biology*. John Wiley & Sons. completar la cita es un libro.
- Jin W, Ni H, Dai Y. (2010). Effects of tert-butylhydroquinone on intestinal inflammatory response and apoptosis following traumatic brain injury in mice. *Mediators of inflammation*,
- Khodagholi F, Tusi SK. (2011). Stabilization of Nrf2 by tBHQ prevents LPS-induced apoptosis in differentiated PC12 cells. *Molecular and cellular biochemistry*, 354(1-2), 97–112.
- Kim SR, Kim DL, Kang MR. (2013). Endoplasmic reticulum stress influences bronchial asthma pathogenesis by modulating nuclear factor κ B activation. *J Allergy Clin Immunol*, 132(6) 1397-408.
- Kobayashi EH, Suzuki T, Funayama R. (2016). Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nature Communications*, 7(May), 11624.
- Li S, Li J, Shen C. (2014). tert-Butylhydroquinone (tBHQ) protects hepatocytes against lipotoxicity via inducing autophagy independently of Nrf2 activation.
- Lichtenstein GR, Hanauer SB, Sandborn WJ. (2009). Management of Crohn's disease in adults. *The American journal of gastroenterology*, 104(2), 465–483; quiz 464, 484.

- Loftus EV. (2004). Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*, 126(6), 1504–17.
- Lowe DC., Savidge TC, Pickard D. (1999). Characterization of candidate live oral Salmonella typhi vaccine strains harboring defined mutations in aroA, aroC, and htrA. *Infection and Immunity*, 67(2), 700–707.
- Lyons S, Wang L, Casanova JE. (2004). Salmonella typhimurium transcytoses flagellin via an SPI2-mediated vesicular transport pathway. *J Cell Sci*, 117(24), 5771–5780.
- Ma X, Yan W, Zheng H. (2015). Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells. *F1000Research*, 4(31370903), 1–13.
- Mackern-Oberti JP, Riquelme S, Llanos C. (2014). Heme Oxygenase-1 as a Target for the Design of Gene and Pharmaceutical Therapies for Autoimmune Diseases. *Current gene therapy*.
- Macoch M, Morzadec C, Génard R. (2015). Nrf2-dependent repression of interleukin-12 expression in human dendritic cells exposed to inorganic arsenic.
- Maines MD. (1997). The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 37(1), 517–554.
- Matricon J, Barnich N, Ardid D. (2010). Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease, 1(4), 299–309.
- Matsuura K, Otsuka F, Fujisawa H. (1998). Effects of interferons on tumour necrosis factor alpha production from human keratinocytes. *Cytokine*, 10(7), 500–5.
- McMahon M, Itoh K, Yamamoto M. (2001). The cap “n” collar basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (NF-E2 p45-related factor 2) controls both constitutive and inducible expression of intestinal detoxification and glutathione biosynthetic enzymes. *Cancer Research*, 61, 3299–3307.
- Mizoguchi E. (2006). Chitinase 3-like-1 exacerbates intestinal inflammation by enhancing bacterial adhesion and invasion in colonic epithelial cells. *Gastroenterology*, 130(2), 398–411.
- Molodecky N, Kaplan GG. (2010). Environmental risk factors for inflammatory bowel disease. *Gastroenterology & hepatology*, 6(5), 339–346.
- Muzes G, Tulassay Z, Sipos F. (2013). Interplay of autophagy and innate immunity in Crohn’s disease: A key immunobiologic feature. *World Journal of Gastroenterology*, 19(28), 4447–4454.

- Mynott TL, Crossett B, Prathalingam SR. (2002). Proteolytic Inhibition of Salmonella enterica Serovar Typhimurium- Induced Activation of the Mitogen-Activated Protein Kinases ERK and JNK in Cultured Human Intestinal Cells. *Society*, 70(1), 86–95.
- Naito Y, Takagi T, Yoshikawa T. (2004). Heme oxygenase-1: a new therapeutic target for inflammatory bowel disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 20 Suppl 1, 177–84.
- Ngo B, Farrel CP, Barr M. (2010). Tumor necrosis factor blockade for treatment of inflammatory bowel disease: efficacy and safety. *Curr Mol Pharmacol*. 3(3),145-52.
- Nikolaus S, Bauditz J, Gionchetti P. (1998). Increased secretion of pro-inflammatory cytokines by circulating polymorphonuclear neutrophils and regulation by interleukin 10 during intestinal inflammation. *Gut*, 42(4), 470–476.
- Olendzki BC, Silverstein TD, Persuitt GM. (2014). An anti-inflammatory diet as treatment for inflammatory bowel disease: a case series report. *Nutrition journal*, 13, 5.
- Pariente B, Mary JY, Danese S. (2015). Development of the Lémann index to assess digestive tract damage in patients with Crohn’s disease. *Gastroenterology* 148:52–63
- Pittalà V, Salerno L, Romeo G. (2013). A focus on heme oxygenase-1 (HO-1) inhibitors. *Current medicinal chemistry*, 20(30), 3711–32.
- Ponferrada A. (2006). Mecanismos de disfunción de la barrera mucosa e inflamación en el colon de ratas tras exposición a estrés. Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones.
- Price AB, Morson BC. (1975). Inflammatory bowel disease: the surgical pathology of Crohn’s disease and ulcerative colitis. *Human pathology*, 6(1), 7–29.
- Purdom-Dickinson SE, Sheveleva EV, Sun H. (2007). Translational control of nrf2 protein in activation of antioxidant response by oxidants. *Molecular pharmacology*, 72(4), 1074–81.
- Ranaldi G, Consalvo R, Sambuy Y.(2003). Permeability characteristics of parental and clonal human intestinal Caco-2 cell lines differentiated in serum-supplemented and serum-free media. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 17(5-6), 761–7.
- Rogler G. (2010). Gastrointestinal and liver adverse effects of drugs used for treating IBD. *Best practice & research. Clinical gastroenterology*, 24(2), 157–65.
- Sales-Campos H, Basso PJ, Alves VBF. (2015). Classical and recent advances in the treatment of inflammatory bowel diseases. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 48(2), 96–107.

- Sánchez C, Rodeiro I, Garrido G. (2005). Hemo-Oxygenasa 1: Un Promisorio Blanco Terapéutico, *24*(4), 619–626.
- Shahidi F, Zhong Y. (2005). Antioxidants: regulatory status. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, (7), 491–512.
- Sierro F, Duboi B, Coste A. (2001). Flagellin stimulation of intestinal epithelial cells triggers CCL20-mediated migration of dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(24), 13722–7.
- Smith M, Thompson KC, Britain RS. (2001). *Cryptosporidium: The Analytical Challenge*. Royal Society of Chemistry.
- Stier H, Bischoff SC. (2016). Influence of *saccharomyces boulardii* CNCM I-745 on the gut-associated immune system. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, *9*, 269–279.
- Strober W, Fuss IJ. (2011). Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, *140*(6), 1756–1767.
- Tak PP, Firestein GS. (2001). NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest*, *107*(1), 7-11.
- Takagi T, Naito Y, Uchiyama K. (2010). The role of heme oxygenase and carbon monoxide in Inflammatory Bowel Disease. *Redox Report Communications in Free Radical Research*, *15*(5), 193-201.
- Takata Y, Seki S, Dobashi H. (1998). Inhibition of IL-12 synthesis of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) stimulated with a bacterial superantigen by pooled human immunoglobulin: implications for its effect on Kawasaki disease (KD). *Clin Exp Immunol*, *114*(2), 311-9.
- Todorović-Raković N, Milovanović J. (2013). Interleukin-8 in breast cancer progression. *Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, *33*(10), 563–70.
- Turley AE, Zagorski JW, Rockwell CE. (2015). The Nrf2 activator tBHQ inhibits T cell activation of primary human CD4 T cells. *Cytokine*, *71*(2), 289–295.
- Williams C, Panaccione R, Ghosh S. (2011). Optimizing clinical use of mesalazine (5-aminosalicylic acid) in inflammatory bowel disease. *Therapeutic advances in gastroenterology*, *4*(4), 237–248.

Wells CL, Jechorek RP, Olmsted SB. (1993). Effect of LPS on epithelial integrity and bacterial uptake in the polarized human enterocyte-like cell line Caco-2. *Circ Shock*, 40(4), 276-88.

Xavier RJ, Podolsky DK. (2007). Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease, 448(July).

Yan RG, Guo XD, Xu C. (2012). Reconstruction and visualization of human gastrointestinal tract. *International Journal of Biomedical Science*, 8(1), 22–27.

Zhu X. (2011). Heme oxygenase-1 system and gastrointestinal inflammation: A short review. *World Journal of Gastroenterology*, 17(38), 4283.

ANEXO 1. Consentimiento informado N° 3 para sujetos controles.

1



Pontificia Universidad Católica de Chile
Facultad de Medicina
Departamento de Gastroenterología
Marcoleta 367 – Santiago
Tel: 56-2-6863820
Fax: 56-2-6397780

Consentimiento Informado-3 **para Sujetos Control**

Título de la investigación:

“Papel de la Hemoxigenasa-1 en la inflamación intestinal aguda y crónica: Modelo infeccioso e inmunológico”

Investigadores responsables: **Dr. Manuel Álvarez Lobos**
Dr. Carlos Agüero Luengo

Departamento de Gastroenterología

Fuente de Financiamiento: FONDECYT.



El propósito de esta información es ayudarle a tomar la decisión de participar-o no-, en una investigación médica.

El objetivo específico de esta investigación es estudiar en pacientes adultos el papel de un elemento del cuerpo humano llamado hemoxigenasa en las infecciones e inflamaciones intestinales, lo que puede tener importancia para entender por qué se desarrollan estas enfermedades en las personas.

Le pedimos que lea atentamente este documento y pregunte si tiene cualquier duda al respecto.

¿Por qué se realiza este estudio?

Las diarreas agudas pueden afectar a cualquier persona durante su vida y son uno de los motivos de consulta médica más frecuente. Hay personas que tienen una mayor predisposición a tener estas infecciones o inflamaciones y aunque existen tratamientos antibióticos o antiinflamatorios adecuados, en ocasiones, estas enfermedades pueden provocar una serie de consecuencias.

Es posible que la hemoxigenasa pueda influir en las diarreas agudas, lo que puede ayudar a entender mejor estas enfermedades y buscar nuevos tratamientos.



¿En qué consiste mi participación en el estudio?

Su médico tratante le ha solicitado una colonoscopia y usted es un paciente que no tiene el antecedente de tener una enfermedad diagnosticada de su intestino o alguna enfermedad infecciosa o inmunológica.

Su participación en el estudio consiste en que si su colonoscopia es normal, se extraerá una muestra de sangre de un volumen de 10 mL (2 cucharadita de te) para estudiar la hemoxigenasa por ser una persona sin enfermedades conocidas.

En la colonoscopia solicitada por su médico tratante, aunque no siempre es necesario tomar biopsias de su intestino, frecuentemente se requiere hacerlo y éstas fluctúan entre 2 a más de 10 según los hallazgos del examen. Esto permite evaluar específicamente las posibles alteraciones presentes en su intestino y descartar complicaciones. Su participación específica en este punto consiste en poder tomar 5 muestras adicionales de biopsias con el fin de estudiar el estado inflamatorio de su intestino.

Las muestras obtenidas serán usadas únicamente para el propósito de esta investigación. Éstas serán almacenadas por 10 años e identificadas bajo un código que relaciona su información clínica, pero que no lleva su nombre ni otros identificadores personales para proteger su privacidad. Las muestras serán almacenadas en el Departamento de Gastroenterología de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile a cargo del Dr Manuel Alvarez L.

Las muestras serán utilizadas exclusivamente para este estudio, con el fin de estudiar aspectos relacionados con su enfermedad y podrán ser almacenadas para eventuales evaluaciones posteriores. Si en el futuro son usadas para propósitos diferentes a los de esta investigación médica, se le solicitará un nuevo consentimiento.

¿Qué beneficios obtengo al participar?

Con esta investigación se está contribuyendo a una comprensión más detallada de las infecciones e inflamaciones intestinales y de sus complicaciones y eventualmente al desarrollo de mejores estrategias de prevención. Usted no obtendrá ningún beneficio monetario directo al participar.

¿Qué riesgos tengo al participar en el estudio?

Usted viene a realizarse una colonoscopia solicitada por su médico tratante y al participar voluntariamente en este estudio no adiciona ningún riesgo adicional significativo por sobre lo que es este procedimiento.

Como leerá en el instructivo sobre la colonoscopia que se le entrega a todos los pacientes que se van a realizar este examen existen riesgos propios asociados a este procedimiento rutinario. Los más importantes son la perforación intestinal que se observa en el 0,07%, es decir menos de 1 perforación por cada 1.000 colonoscopias y el sangrado intestinal en el 0,1%, es decir 1 sangrado por cada 1000 colonoscopias.

Si estas complicaciones ocurren y se detectan durante el procedimiento pueden intentar repararse de inmediato, pero frecuentemente se detectan una vez terminado el procedimiento y no siempre es posible saber si fueron por la toma de alguna de las biopsias de la investigación.

La obtención de muestras endoscópicas adicionales de tejido no representa un riesgo adicional significativo para usted. Además, la extracción de sangre se realiza en la forma habitual de extraer sangre para los exámenes rutinarios por la misma vía que se emplea para medicarlo durante el procedimiento y no tiene un riesgo adicional que son moretón en el brazo, leve dolor después de la extracción, sensación de lipotimia o desmayo.

Este estudio no contempla compensaciones ni hay seguros comprometidos

¿Qué costos adicionales tengo al participar en el estudio?

Todos los costos producto de los análisis adicionales que se hagan no significaran ningún cobro extra para usted.

¿Para qué se utilizarán mis muestras?

Se realizarán diversos estudios para determinar el nivel de inflamación de su organismo e intestino.

¿Cómo se manejarán las muestras que se obtengan a través de este estudio?

La información obtenida se mantendrá en forma confidencial. Es posible que los resultados obtenidos sean presentados en revistas y conferencias médicas, sin embargo, su nombre no será conocido.

Su participación en esta investigación es completamente voluntaria. Usted tiene el derecho a no aceptar participar o a retirar su consentimiento y retirarse de esta investigación en el momento que lo estime conveniente. Al hacerlo, usted no pierde ningún derecho que le asiste como paciente de esta institución y no se verá afectada la calidad de la atención médica que merece.

Si usted retira su consentimiento, sus muestras (de sangre, biopsia y deposiciones) serán eliminadas y la información obtenida no será utilizada.



PREGUNTAS.

Si tiene preguntas acerca de esta investigación médica puede contactar o llamar al Dr. Manuel Álvarez Lobos, Investigador Responsable del estudio, al teléfono 2-23543820 o al mail: proyectoinflamacion@gmail.com

Si tiene preguntas acerca de sus derechos como participante en una investigación médica, usted puede llamar a la Dra. Beatriz Shand K., Presidente del Comité Ético Científico de la Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile, al teléfono 2-2354-8173, o al mail: cecmeduc@med.puc.cl.

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO.

Se me ha explicado el propósito de esta investigación médica, los procedimientos, los riesgos, los beneficios y los derechos que me asisten y que me puedo retirar de ella en el momento que lo desee.

Firmo este documento voluntariamente, sin ser forzado a hacerlo.

No estoy renunciando a ningún derecho que me asista.

Se me comunicará de toda nueva información relacionada con el estudio médico que surja durante el estudio y que pueda tener importancia directa para mi condición de salud.

Se me ha informado que tengo el derecho a reevaluar mi participación según mi parecer.

Al momento de la firma, se me entrega una copia firmada de este documento.

FIRMAS

..... Nombre Participante: Firma Participante Fecha
..... Nombre del Investigador: Firma Investigador Fecha
..... Nombre Director de la institución: Firma Investigador Fecha

ANEXO 2. Consentimiento informado N° 2 para pacientes con EC.

1



Pontificia Universidad Católica de Chile
Facultad de Medicina
Departamento de Gastroenterología
Marcoleta 367 – Santiago
Tel: 56-2-6863820
Fax: 56-2-6397780

Consentimiento Informado-2 para sujetos con enfermedad de Crohn

Título de la investigación:

**“Papel de la Hemoxigenasa-1 en la inflamación intestinal aguda y crónica:
Modelo infeccioso e inmunológico”**

Investigadores responsables: **Dr. Manuel Álvarez Lobos
Dr. Carlos Agüero Luengo**

Departamento de Gastroenterología

Fuente de Financiamiento: FONDECYT.



El propósito de esta información es ayudarle a tomar la decisión de participar-o no-, en una investigación médica.

El objetivo específico de esta investigación es estudiar en pacientes adultos portadores de una enfermedad de Crohn si una sustancia del cuerpo humano llamada Hemoxigenasa contribuye a la respuesta inflamatoria del intestino, lo que puede tener importancia para entender por qué se desarrolla esta enfermedad, sus consecuencias y buscar nuevas formas de tratamiento.

Le pedimos que lea atentamente este documento y pregunte si tiene cualquier duda al respecto.

¿Por qué se realiza este estudio?

La enfermedad de Crohn es una enfermedad en que se produce una inflamación del intestino y que se desconoce su causa. Aunque no existe un tratamiento curativo para la enfermedad si existen múltiples tratamientos que pueden mantener inactiva la enfermedad de Crohn.

Esta enfermedad es de curso crónico y la evolución es diferente en cada persona. Es posible que la forma en que se altera el intestino y el organismo, esté determinada por una serie de elementos del cuerpo humano encargados de la inflamación. Uno de los elementos implicados pudiese ser la hemoxigenasa y queremos evaluar el papel de este elemento en la enfermedad de Crohn, lo que pueda influir en el curso de la enfermedad.

¿En qué consiste mi participación en el estudio?

Ud. presenta síntomas compatibles con una enfermedad de Crohn, y su médico tratante ha determinado pertinente que se realice exámenes de sangre, deposiciones y una colonoscopia. Su participación en el estudio consiste en que se le tomará una muestra de sangre en una cantidad de aproximadamente 15 mL (3 cucharaditas de te) para estudiar su inflamación.

En segundo lugar se le tomará una muestra de sus deposiciones para determinar si hay una infección o inflamación en su intestino y por último la colonoscopia determinará la extensión de su enfermedad y el grado de inflamación de su intestino.

Durante este último examen en los pacientes con Enfermedad de Crohn habitualmente se toman varias biopsias de su intestino, las que fluctúan entre 2 a más de 20 según los hallazgos del examen. Esto permite evaluar específicamente las alteraciones presentes y descartar complicaciones. Su participación específica en el estudio este punto consiste en poder tomar 6 muestras adicionales de biopsias con el fin de estudiar la inflamación que Ud presenta.

Las muestras obtenidas serán usadas únicamente para el propósito de esta investigación y serán almacenadas por 10 años. Las muestras serán obtenidas bajo un código que relaciona su información clínica, pero que no lleva su nombre ni otros identificadores personales para proteger su privacidad.

Las muestras serán almacenadas en el Departamento de Gastroenterología de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile, a cargo del Dr. Manuel Alvarez L. Serán utilizadas exclusivamente para este estudio, con el fin de estudiar aspectos relacionados con su enfermedad de Crohn y podrán ser almacenadas para eventuales evaluaciones posteriores. Si en el futuro son usadas para propósitos diferentes a los de esta investigación médica, se le solicitará un nuevo consentimiento.

Si los resultados obtenidos muestran una infección le serán informados, al igual que a su médico tratante, el que le indicará el curso de acción médico más adecuado para usted.

¿Qué beneficios obtengo al participar?

Usted se podrá beneficiar en el sentido de poder determinar si tiene una infección activa, para poder iniciar el antibiótico correspondiente. Con esta investigación se está contribuyendo a una comprensión más detallada de la enfermedad de Crohn y eventualmente al desarrollo de mejores tratamientos. Usted no obtendrá ningún beneficio monetario directo al participar.

¿Qué riesgos tengo al participar en el estudio?

Debido a su enfermedad de Crohn, su médico tratante ha determinado necesario que se tome exámenes de sangre, deposiciones y que se realice una colonoscopia con toma de biopsias. Como leerá en el instructivo sobre la colonoscopia que se le entrega a



todos los pacientes que se realizan este examen existen riesgos propios asociados a este procedimiento rutinario. Los más importantes son la perforación intestinal que se observa en el 0,07%, es decir menos de 1 perforación por cada 1.000 colonoscopías y el sangrado intestinal en el 0,1%, es decir 1 sangrado por cada 1000 colonoscopías.

Si estas complicaciones ocurren y se detectan durante el procedimiento pueden intentar repararse de inmediato, pero frecuentemente se detectan una vez terminado el procedimiento y no siempre es posible saber si fueron por la toma de alguna de las biopsias de la investigación.

La obtención de muestras endoscópicas adicionales de tejido no representa un riesgo adicional significativo para usted. Además la extracción de sangre se realiza en la forma habitual como se extrae sangre para los exámenes rutinarios y no tiene un riesgo mayor que el de cualquier examen de sangre (moretón en el brazo, leve dolor después de la extracción, sensación de lipotimia o desmayo).

La obtención de una muestra de sus deposiciones no representa ningún riesgo para usted. Este estudio no contempla compensaciones ni hay seguros comprometidos

¿Qué costos adicionales tengo al participar en el estudio?

El estudio no pagará la colonoscopia, las biopsias rutinarias o los exámenes de sangre solicitados por su medico tratante, pero usted no pagará por ningún procedimiento adicional destinado sólo a esta investigación.

¿Para qué se utilizarán mis muestras?

Se realizarán diversos estudios para determinar el tipo de inflamación intestinal que presenta.



¿Cómo se manejarán las muestras que se obtengan a través de este estudio?

La información obtenida se mantendrá en forma confidencial. Es posible que los resultados obtenidos sean presentados en revistas y conferencias médicas, sin embargo, su nombre no será conocido.

Su participación en esta investigación es completamente voluntaria. Usted tiene el derecho a no aceptar participar o a retirar su consentimiento y retirarse de esta investigación en el momento que lo estime conveniente. Al hacerlo, usted no pierde ningún derecho que le asiste como paciente de esta institución y no se verá afectada la calidad de la atención médica que merece. Si usted retira su consentimiento, sus muestras (de sangre, biopsia y deposiciones) serán eliminadas y la información obtenida no será utilizada.

PREGUNTAS.

Si tiene preguntas acerca de esta investigación médica puede contactar o llamar al Dr. Manuel Álvarez Lobos, Investigador Responsable del estudio, al teléfono 2-23543820 o al mail: proyectoinflamacion@gmail.com

Si tiene preguntas acerca de sus derechos como participante en una investigación médica, usted puede llamar a la Dra. Beatriz Shand K., Presidente del Comité Ético Científico de la Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile, al teléfono 2-2354-8173, o al mail: cecmeduc@med.puc.cl.

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO.

Se me ha explicado el propósito de esta investigación médica, los procedimientos, los riesgos, los beneficios y los derechos que me asisten y que me puedo retirar de ella en el momento que lo desee.

Firmo este documento voluntariamente, sin ser forzado a hacerlo.

No estoy renunciando a ningún derecho que me asista.

Se me comunicará de toda nueva información relacionada con el estudio médico que surja durante el estudio y que pueda tener importancia directa para mi condición de salud.

Se me ha informado que tengo el derecho a reevaluar mi participación según mi parecer.

Al momento de la firma, se me entrega una copia firmada de este documento.

FIRMAS

..... Nombre Participante: Firma Participante Fecha
..... Nombre del Investigador: Firma Investigador Fecha
..... Nombre Director de la Institución: Firma Investigador Fecha

ANEXO 3. Acta de Aprobación del comité de ética de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Proyecto FONDECYT 1131012.



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE MEDICINA - COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN



**ACTA DE APROBACIÓN ÉTICA PARA PROYECTOS FONDECYT/CONICYT
A SER REALIZADOS EN PERSONAS**

Nº del Proyecto : 12-195

Fecha de aprobación: 07.08.2012

Investigador Responsable: Dr. Manuel Alvarez Lobos
Departamento de Gastroenterología, PUC.

Título del Proyecto: FONDECYT REGULAR 2013: Role of heme oxygenase-1 in acute and chronic intestinal inflammation: immune and infectious models

Sitio de realización: Facultad de Medicina, PUC.

Institución Patrocinador: Pontificia Universidad Católica de Chile

Financiamiento: Concurso Fondecyt Regular 2013.

Documentación recibida:

- Proyecto Fondecyt en referencia, incluyendo currículum investigador, en formato pdf.
- Documentos de consentimiento informado.
- Carta de respaldo del Jefe de Departamento.

Propósitos del Estudio:

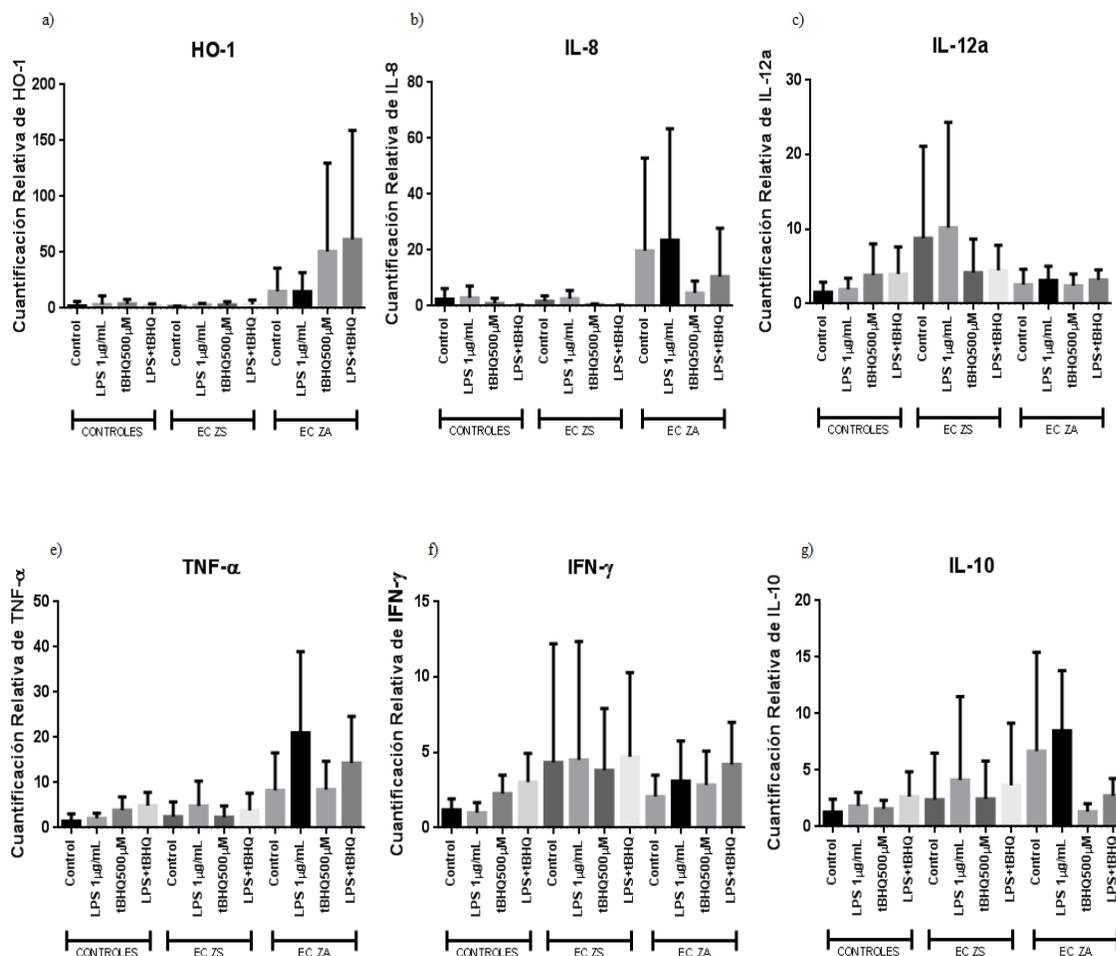
El objetivo de este estudio es evaluar el rol de Heme oxigenasa en enterocolitis aguda por salmonella entérica y en la severidad de la enfermedad de Crohn, en humanos y un modelo animal.

Fundamentos de la Aprobación :

Para otorgar esta aprobación, el Comité en pleno, en su sesión del **07 de agosto de 2012**, consideró los siguientes aspectos:

- El equipo investigador cuenta con la capacidad técnica y competencia profesional acorde a los requerimientos del estudio.
- Los aspectos científicos de la propuesta son considerados adecuados.
- La propuesta puede redundar en aportes al conocimiento y a la sociedad.
- Este proyecto no tiene fines terapéuticos y no existe ningún beneficio directo para los participantes. Se mezclan los beneficios de los exámenes solicitados la mayoría por el médico

ANEXO 4. Niveles de expresión de HO-1 y citoquinas en estudio entre grupo de explantes (Control, EC ZS y EC ZA).



Niveles de expresión de mRNA para HO-1, IL-8, IL-12a, IFN-γ y TNF-α, post-tratamientos con LPS, tBHQ y ambos en co-estímulo, cuantificados mediante Q-PCR entre grupo de explantes colónicos Controles, EC ZS y EC ZA. (Análisis forma B). Anova 1 vía, no pareado, no paramétrico, post-test Dunn's. + DS.