



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

“Papel de mastocitos en la inducción de Bcl-3 y las alteraciones de la unión estrecha epitelial intestinal en el Síndrome de Intestino Irritable”

Verónica Fabiola Torres Martínez

Memoria para optar al título profesional de Bioquímico

Directora de memoria
Dra. Caroll Beltrán Muñoz
Laboratorio de Inmunogastroenterología
Servicio de Gastroenterología
Hospital Clínico Universidad de Chile

Profesora Patrocinante
Dra. Lorena García Nanning.
Departamento de Bioquímica y Biología molecular

-Enero 2018-

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	1
ÍNDICE DE FIGURAS	3
ÍNDICE DE TABLAS:.....	3
ABREVIACIONES:.....	4
RESUMEN:.....	6
SUMMARY:	7
1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1 Fisiopatología del SII.....	8
1.2 Epitelio intestinal.....	9
1.3 Permeabilidad paracelular aumentada en el SII.....	9
1.4 Papel del factor nuclear κ B (NF- κ B) en la función de barrera del epitelio intestinal en Inflamación.	10
1.5 El factor B cell leukaemia/lymphoma 3 (Bcl-3) como regulador de la vía de activación de NF- κ B.....	11
1.6 Activación inmune en el SII, el papel de mastocitos en el intestino.....	13
1.7 Relevancia del proyecto.....	14
2. HIPÓTESIS:.....	15
3. OBJETIVOS:	15
3.1 Objetivo General:.....	15
3.2 Objetivos Específicos:.....	15
4. MATERIALES Y MÉTODOS:.....	16
4.1 Reactivos Generales:.....	16
Cultivos celulares:.....	16
4.2 Participantes del Estudio.....	17
4.2.1 Criterios de inclusión:.....	17
4.2.2 Criterios de exclusión:	17
4.2.3 Registro clínico y demográfico de los pacientes:.....	18
4.2.4 Evaluación psicosocial, calidad de vida, severidad en SII:.....	18
4.2.5 Toma de muestras	18
4.2.6 Evaluación de los tejidos obtenidos.....	19
4.2.7 Tamaño muestral:	19
4.3 Diseño y método de trabajo experimental.....	19
4.3.1 Evaluación por Western Blot.....	20
4.3.2 Determinación por ELISA (Ensayo inmuno-enzimático en fase sólida)	21
4.3.3 Determinación por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)	21
4.3.4 Extracción de ARN y síntesis de ADN complementario	22
4.3.5 Determinación por reacción en cadena de polimerasa cuantitativa en tiempo real (RTQ- PCR).....	23
4.3.6 Determinación por microscopía electrónica de transmisión (TEM)	23
4.3.7 Cultivos celulares	24
4.4 Análisis Estadístico:	25

5. RESULTADOS:	26
5.1 Características clínicas y demográficas de los participantes de estudio	26
5.2 Caracterización y comparación en los niveles de expresión de Bcl-3 en pacientes chilenos con SII y sujetos controles	27
5.3 Caracterización y comparación en los niveles de expresión de Triptasa en pacientes chilenos con SII y sujetos controles	32
5.4 Caracterización y comparación en los niveles de expresión de proteínas de unión estrecha: ZO-1, Ocludina y Claudina-2 en pacientes con SII y SC	33
5.4.1 Determinación de ZO-1, mediante western e IFI, en muestras intestinales de pacientes con SII y SC	34
5.4.2 Determinación de ZO-1, mediante western blot, en muestras intestinales de pacientes con SII y SC.	35
5.4.3 Determinación de ocludina, mediante western blot, en muestras intestinales de pacientes con SII y SC.....	36
5.4.4 Determinación de Claudina-2, mediante western blot e IFI, en muestras intestinales de pacientes con SII y SC.....	37
5.5 Evaluar la integridad del epitelio intestinal en pacientes chilenos con SII y sujetos controles	38
5.6 Comparar el número y actividad de mastocitos intestinales en pacientes chilenos con SII y sujetos controles	41
5.6.1 Determinación del número de mastocitos en muestras intestinales de pacientes con SII y SC.....	41
5.6.2 Determinación de la actividad de los mastocitos en muestras intestinales de pacientes con SII y SC.....	42
5.6.3 Características ultraestructurales de los mastocitos intestinales en pacientes con SII y SC.....	43
5.7 Evaluar in vitro si la activación del receptor PAR-2, mediante triptasa, induce un aumento en la expresión de Bcl-3 en líneas celulares de epitelio de colon	46
5.7.1 Expresión de Bcl-3 frente a una estimulación dosis y tiempo respuesta con triptasa.	46
5.7.2 Determinar si la inducción de Bcl-3, por Triptasa, es mediante la activación del receptor PAR2 en línea celular Caco-2.....	49
5.8 Determinar in vitro la alteración de las proteínas de unión estrecha, mediada por estimulación con triptasa, en líneas celulares de epitelio de colon	51
6. DISCUSIÓN:	54
6.1 Niveles aumentados de Bcl-3 en epitelio intestinal de pacientes con SII.	54
6.2 Aumento del número de mastocitos en pacientes con SII.....	57
6.3 Contenido de triptasa en mucosa intestinal de pacientes con SII.....	59
6.4 Inducción de Bcl-3 en líneas celulares de epitelio de colon.....	59
6.5 Inducción de Bcl-3, en modelos in vitro, mediada por el receptor PAR-2.....	61
6.6. Evaluación del estado de las proteínas de UE en pacientes con SII.....	62
6.7 Evaluación del efecto de triptasa sobre las proteínas de UE	64
7. CONCLUSIÓN:	66
8. REFERENCIAS:	67
9. ANEXOS	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Aumento del número de veces de cambio de Bcl-3 en mucosa intestinal de colon de pacientes con SII	28
Figura 2: Aumento de la expresión de la proteína de Bcl-3 en mucosa ileal de pacientes con SII	29
Figura 3: Inmunotinción para Bcl-3 en mucosa intestinal de pacientes con SII y SC.....	30
Figura 4: Aumento de la expresión relativa de Bcl-3 en epitelio de mucosa intestinal de pacientes con SII ...	31
Figura 5: Determinación en el contenido de Triptasa en mucosa intestinal de pacientes con SII.....	33
Figura 6: Distribución de la proteína ZO-1 en mucosa intestinal de pacientes con SII y SC.....	34
Figura 7: Disminución en los niveles de ZO-1 en mucosa ileal de pacientes con SII.....	35
Figura 8: Determinación en los niveles de ZO-1 en mucosa intestinal de pacientes con SII.....	36
Figura 9: Determinación en los niveles de ocludina en mucosa intestinal de pacientes con SII	37
Figura 10: Distribución de la proteína Claudina-2 en mucosa intestinal de pacientes con SII y SC.....	38
Figura 11: Ultraestructura de la barrera epitelial intestinal	39
Figura 12: Ultraestructura del complejo de unión estrecha en mucosa intestinal.....	39
Figura 13: Ultraestructura del complejo apical en mucosa de pacientes con SII y SC	40
Figura 14: Aumento de la distancia intercelular (nm) en mucosa intestinal de íleon de pacientes con SII	40
Figura 15: Mayor distribución de mastocitos en lámina propia de pacientes con SII	41
Figura 16: Aumento en el número de mastocitos en mucosa intestinal de pacientes con SII	42
Figura 17: Aumento del porcentaje de degranulación de mastocitos en íleon de pacientes con SII	43
Figura 18: Características ultraestructurales de mastocitos intestinales humanos.....	44
Figura 19: Contenido de gránulos citoplasmáticos en mastocitos de mucosa intestinal	45
Figura 20: : Cercanía de mastocitos a terminaciones nerviosas en mucosa intestinal de pacientes con SII	45
Figura 21: Ensayo de transfección en línea celular DLD-1 con SiRNA Bcl-3 y pCDNA Bcl-3	47
Figura 22: Ensayos de estimulación con triptasa en células DLD-1	47
Figura 23: Niveles de expresión de Bcl-3, en células Caco-2 estimuladas con 0,5 µg/mL de Triptasa, a las 0, 6,12 y 24 horas	48
Figura 24: Aumento de la expresión relativa de Bcl-3 en células DLD-1 y Caco-2 estimuladas con Triptasa	48
Figura 25: Estimulación con Fut en presencia de Triptasa en células DLD-1 a las 12 horas.....	49
Figura 26: Representación del experimento realizado en células Caco-2	50
Figura 27: Niveles de Bcl-3, en células Caco-2 estimuladas con Triptasa 0,5 µg/mL, agonista de PAR-2 100 µM (SLIGKV-NH ₂) y antagonista de PAR-2 100 µM (FSLRLRY-NH ₂) a las 24 horas	50
Figura 28: Detección de proteínas UE en línea celular Caco-2 estimuladas con Triptasa 0,5 µg/mL y agonista de PAR-2 100 µM (SLIGKV-NH ₂) por 12 horas.....	52
Figura 29: Detección de proteínas UE en línea celular Caco-2 estimuladas con Triptasa 0,5 µg/mL y agonista de PAR-2 100 µM (SLIGKV-NH ₂) por 12 horas.....	53
Figura 30: Detección de proteínas de unión estrecha en línea celular Caco-2 estimuladas con TNF-α 50 ng/mL por 24 horas	53

ÍNDICE DE TABLAS:

Tabla 1: Esquema de recolección y almacenamiento de muestras	18
Tabla 2: Datos técnicos de los anticuerpos usados en Western Blot	21
Tabla 3: Datos técnicos de los anticuerpos usados en Inmunofluorescencia.....	22
Tabla 4: Datos técnicos de los partidores usados en la reacción de PCR en tiempo real	23
Tabla 5: Características clínicas y demográficas de los participantes	26
Tabla 6: Aumento de comorbilidad psicosocial y sintomatología clínica en pacientes con SII.....	27
Tabla 7: Resumen de los resultados obtenidos en la caracterización de los pacientes con SII	65

ABREVIACIONES:

ADN: Ácido desoxiribonucleico
ARN: Ácido ribonucleico
Bcl-3: B cell leukemia/lymphoma-3
CRF: Factor liberador de corticotropina
CSF: Calidad de salud física
CSM: Calidad de salud mental
DAMP: Patrones moleculares asociados a daño
EII: Enfermedad inflamatoria intestinal
ELISA: Ensayo de inmunabsorción en fase sólida
Fut175: Nafamostato Mesilato
FSLRY-NH₂: Antagonista de PAR-2
HDAS: Escala de depresión y ansiedad
HCUCH: Hospital Clínico Universidad de Chile
HDAC: Histona desacetilasa
IFN- γ : Interferón gamma
IFI: Inmunofluorescencia Indirecta
I κ B: Inhibidor de κ B
IKK: Quinasa de I κ B
IMC: Índice de masa corporal
LPS: Lipopolisacárido
MAPK: MAP quinasa
miARN: micro ácido ribonucleico
MLCK: Quinasa de la cadena ligera de miosina
NEMO: Modulador esencial de NF- κ B
NF- κ B: Factor nuclear κ B
PAMP: Patrón molecular asociado a patógeno
PAR: Receptor activado por proteasa
PRR: Receptor de reconocimiento de patrones
q-PCR: Reacción cuantitativa de polimerasa en cadena

SII: Síndrome de intestino irritable
SII-A: Síndrome de intestino irritable alternante o mixto
SII-C: Síndrome de intestino irritable constipado
SII-D: Síndrome de intestino irritable diarreico
SII-I: Síndrome de intestino irritable indeterminado
Si-RNA: Acido ribonucleico de interferencia
SC: Sujetos controles
SF-36: Cuestionario de salud “Short form 36”
SII-SS: Escala de severidad de síntomas en SII
SLGKIV-NH₂: Agonista de PAR-2
SN: Sobrenadante
TEM: Microscopía electrónica de transmisión
TER: Resistencia transepitelial
TLR: Receptor de tipo Toll
UE: Unión estrecha
ZO: Zónula Ocludens

RESUMEN:

El síndrome de intestino irritable (SII) es un trastorno funcional digestivo caracterizado por la presencia de dolor abdominal asociado a alteraciones del hábito intestinal. Si bien su fisiopatología no ha sido dilucidada completamente, se reconoce la existencia de un desequilibrio del eje cerebro-intestino, que afecta diversas funciones intestinales, entre ellas el aumento de la permeabilidad paracelular y la activación de células inmunes. La elevada activación de mastocitos se asocia a aumento de la permeabilidad intestinal debido a alteraciones en la organización de la unión estrecha (UE), mecanismo mediado por la activación de PAR-2 (receptor activado por proteasa-2) por triptasa. La proteína inmuno-moduladora Bcl-3 (B-cell leukemia/lymphoma-3) es un regulador transcripcional de genes activados por NF- κ B, entre ellos los que regulan la UE. En este trabajo se proponen las siguientes hipótesis: 1) *En pacientes con SII, existe una pérdida de la función de barrera intestinal asociada a un aumento en la expresión de Bcl-3, a una elevada activación de mastocitos y a alteraciones de la unión estrecha epitelial;* 2) *La expresión de Bcl-3, es inducida por triptasa, mediante la activación de PAR-2, afectando el estado de la unión estrecha en líneas celulares de epitelio intestinal.* Para ello, muestras de mucosa ileal y colónica de pacientes con SII y SC (sujetos controles) fueron recolectadas. En ellas se evaluó la expresión de Bcl-3, mediante q-PCR, western blot e inmunofluorescencia indirecta (IFI); el número de mastocitos y su grado de activación, por IFI y microscopía electrónica de transmisión (TEM); y las alteraciones de la UE, mediante IFI y TEM. El efecto de triptasa sobre la expresión de Bcl-3 y las alteraciones en la UE fueron evaluadas *in vitro*, en líneas celulares DLD-1 y Caco-2, mediante western blot e IFI. Los resultados evidenciaron una elevada expresión de Bcl-3 un aumento en el número y actividad de mastocitos, alteraciones en la distribución y expresión de ZO-1 en mucosa y alteración de la arquitectura de la UE epitelial intestinal en pacientes con SII en comparación con SC. Nuestros resultados *in vitro* evidenciaron que la expresión de Bcl-3 fue inducida por triptasa, a través de la activación de PAR-2, induciendo este estímulo alteraciones en la distribución de proteínas de la UE. Nuestros hallazgos sugieren que en el SII, la proteína Bcl-3 actuaría como un factor intermediario de las alteraciones de la UE epitelial inducida por la activación de triptasa/PAR-2. Futuros estudios dirigidos estudiar con profundidad este mecanismo permitirán contribuir a la fisiopatología del SII, en miras de un nuevo marcador diagnóstico y blanco terapéutico.

SUMMARY:

“ROLE OF MAST CELLS IN THE INDUCTION OF BCL-3 AND ALTERATIONS OF THE TIGHT JUNCTIONS IN THE IRRITABLE BOWEL SYNDROME”.

Irritable bowel syndrome (IBS) is a digestive functional disorder characterized by the presence of abdominal pain associated with alterations of the intestinal habit. Although its pathophysiology has not been fully elucidated, the existence of an imbalance of the brain-intestine axis is recognized, which affects various intestinal functions, among them the increase in paracellular permeability and the activation of immune cells. The high activation of mast cells is associated with increased intestinal permeability due to alterations in the organization of the tight junction (TJ), a mechanism mediated by the activation of PAR-2 (receptor activated by protease-2) by tryptase. The Bcl-3 immunomodulating protein (B-cell leukemia / lymphoma-3) is a transcriptional regulator of genes activated by NF- κ B, including those that regulate the TJ. In this work, the following hypotheses are proposed: *1) In patients with IBS, there is a loss of intestinal barrier function associated with an increase in the expression of Bcl-3, a high activation of mast cells and alterations of the epithelial tight junction ; 2) The expression of Bcl-3 is induced by tryptase, through the activation of PAR-2, affecting the state of the tight junction in intestinal epithelial cell lines..* To do this, samples of ileal and colonic mucosa from patients with IBS and CS (control subjects) were collected. In them, the expression of Bcl-3 was evaluated by means of q-PCR, western blot and indirect immunofluorescence (IFI); the number of mast cells and their degree of activation, by IFI and transmission electron microscopy (TEM); and the alterations of the TJ, through IFI and TEM. The effect of tryptase on the expression of Bcl-3 and the alterations in the EU were evaluated in vitro, in cell lines DLD-1 and Caco-2, by means of western blot and IFI. The results showed a high expression of Bcl-3 an increase in the number and activity of mast cells, alterations in the distribution and expression of ZO-1 in mucosa and alteration of the architecture of the intestinal epithelial TJ in patients with IBS compared to CS . Our in vitro results showed that the expression of Bcl-3 was induced by tryptase, through the activation of PAR-2, inducing this stimulation alterations in the distribution of proteins of the TJ. Our findings suggest that in IBS, the Bcl-3 protein would act as an intermediary factor of epithelial TJ alterations induced by the activation of tryptase / PAR-2. Future studies aimed at studying in depth this mechanism will allow contributing to the pathophysiology of IBS, in view of a new diagnostic marker and therapeutic target.

1. INTRODUCCIÓN.

El síndrome de Intestino Irritable (SII) es un desorden funcional digestivo, con una prevalencia de un 11,2% de la población mundial adulta y que afecta principalmente al sexo femenino, en un rango etario que varía entre los 30 y 40 años¹. En Chile, estudios realizados en una población acotada de la Región Metropolitana, se reportó una prevalencia para el SII de un 26%, elevada en comparación con otros países de Sudamérica². Este síndrome se caracteriza por la presencia de síntomas gastrointestinales crónicos, tales como dolor abdominal recurrente, asociado a alteraciones en la función intestinal, que incluyen cambios en la frecuencia y consistencia de las deposiciones³, siendo la hinchazón y distensión abdominal síntomas muy frecuentes en el SII. Si bien este desorden no produce mortalidad, el profundo deterioro de la calidad de vida de los pacientes repercute en el bienestar social y económico de un país⁴. El diagnóstico del SII es complejo debido a que no se han comprendido completamente los mecanismos fisiopatológicos subyacentes, no existiendo biomarcadores específicos para su detección⁵. Durante los últimos diez años el diagnóstico se ha basado en los criterios clínicos establecidos por la fundación ROMA, sumados a la exclusión de causa orgánica, siendo identificado por la presencia de dolor abdominal asociado a alteraciones de la defecación, al menos una vez por semana en los últimos 3 meses (ROMA IV)⁶. Bajo estos criterios, el SII se puede clasificar en SII: con predominio de diarrea (SII-D), constipación o estreñimiento (SII-C), mixto o alternante (SII-M/A) e Indeterminado (SII-I), según el tipo de hábito intestinal³.

1.1 Fisiopatología del SII.

La fisiopatología de este trastorno es compleja y, a diferencia de otras enfermedades inflamatorias intestinales (EII), se caracteriza por presentar un bajo grado de activación inmune, asociada a un leve aumento de la inflamación sistémica⁷. Entre los diversos factores etiológicos descritos para este síndrome se encuentra el desequilibrio en la comunicación del eje cerebro-intestino, el que puede ser desencadenado por la presencia de episodios infecciosos previos, estrés psicosocial en edad temprana y adulta. Este desequilibrio induce la activación de células inmunes, entre las que se destacan los mastocitos intestinales como los más estudiados, encontrándose estrechamente cercanos a terminales nerviosos entéricos^{7, 8}. Además, se describe una aumentada permeabilidad

paracelular epitelial en el intestino asociada a una pérdida de la función de barrera y la alta actividad de mastocitos^{9, 10}.

1.2 Epitelio intestinal.

El epitelio del tracto intestinal cumple la función de absorción de nutrientes y agua. Constituye una barrera física capaz de actuar como primera línea de defensa frente al paso de antígenos a los tejidos sub-epiteliales, debido a la presencia de células, tales como linfocitos T y B, células NK, células dendríticas; y los mecanismos de barrido y neutralización otorgados por la secreción de agua, la capa de mucus, los anticuerpos y el peristaltismo. Las células epiteliales poseen la capacidad de identificar patrones moleculares asociados tanto a patógenos (PAMPs), como a daño celular (DAMPs), a través de receptores de reconocimiento de estos patrones (PRRs), y la de activar señales intracelulares que inducen inflamación, liberando citoquinas que reclutan células inmunes hacia la mucosa⁹. Los enterocitos pueden también actuar como células presentadoras de antígenos^{11, 12}. Este mecanismo, ejercido en condiciones normales, da origen al fenómeno de inmuno-tolerancia.

Las células del epitelio intestinal están organizadas en una monocapa polarizada, con un polo apical y otro baso lateral, debido a que sus membranas están conectadas mediante complejos de unión intercelulares: unión adherente, los desmosomas y la unión estrecha (UE). La UE regula la permeabilidad paracelular, al comportarse como una barrera semi-permable que bloquea la entrada de patógenos y controla la absorción de solutos, agua e iones¹³. El complejo de UE está constituido por las proteínas transmembranas: claudinas y ocludinas; y por las proteínas periféricas: zónula ocludens 1 (ZO-1), 2 (ZO-2) y 3 (ZO-3). Los dominios intracelulares de claudinas y ocludinas interaccionan con los dominios PDZ de ZO-1, permitiendo anclar estas proteínas transmembranas al citoesqueleto de actina miosina¹⁴. La interacción, expresión y localización celular de las proteínas de la UE, resultan fundamentales para mantener la integridad de la barrera epitelial¹⁵.

1.3 Permeabilidad paracelular aumentada en el SII.

El aumento de la permeabilidad paracelular constituye uno de los hallazgos más característicos del SII. Estudios realizados *in vivo*, mediante la excreción de sondas ingeridas oralmente (lactulosa/manitol), demostraron una aumentada permeabilidad intestinal en pacientes con SII¹⁶. Además, se han reportado para el SII alteraciones en la

expresión y distribución de las proteínas que constituyen el complejo de UE. El grupo de Piche, T. *et al.*, reportó una disminución de la expresión del ARNm de ZO-1 en biopsias de colon de pacientes con SII¹⁷, hallazgos que también fueron observados en muestras de mucosa de yeyuno de pacientes con SII-D¹⁸. Con el fin de reproducir estas observaciones, diversos investigadores han estudiado las alteraciones de UE mediante el uso de cultivos *in vitro* de células DLD-1 o Caco-2 (monocapas de células derivadas de intestino), estimuladas con sobrenadantes (SN) de cultivo de mucosa colónica de pacientes con SII-D, observando una disminución de ZO-1 a nivel de transcrito y una disminución de la resistencia eléctrica trans-epitelial (TEER)¹⁷. En otros estudios, pese a no detectar diferencias en el contenido de ARNm de ocludina, se demostró una menor expresión de esta proteína en mucosa colónica de pacientes con SII, como consecuencia de una mayor actividad proteosomal¹⁹. Así mismo, Bertiaux-Vandaele, N. *et al.*, reportaron una expresión disminuida de claudina-1 en pacientes SII-D y una distribución sub-celular alterada en pacientes SII-C y SII-D²⁰. Recientemente, se ha descrito la capacidad regulatoria de los micro ARN (miARN) sobre la expresión de genes responsables de la modulación de la barrera epitelial en pacientes con SII-D^{21, 22}. Por otro lado, se ha visto que citoquinas pro-inflamatorias, tales como TNF- α e IL-6, pueden afectar la permeabilidad paracelular de células Caco-2, mediante alteraciones de la distribución de proteínas TJ^{23, 24}.

1.4 Papel del factor nuclear κ B (NF- κ B) en la función de barrera del epitelio intestinal en Inflamación.

El complejo NF- κ B comprende a una familia de factores de transcripción que regulan la expresión y transcripción de genes involucrados en proliferación e inflamación entre otros, así como la expresión de las proteínas que participan en la reorganización de la UE²⁵. En mamíferos, las proteínas del complejo NF- κ B están constituidas por las subunidades p65 (RelA), c-Rel, RelB y las proteínas p105 (p50/NF- κ B1) y p100 (p52/NF- κ B2). Cada subunidad posee un dominio de homología Rel, que permite la dimerización de estas a través de interacciones aminoacídicas, formando heterodímeros (p50/p65) o homodímeros (p50/p50) de NF- κ B. En estado de reposo celular, gran parte de los dímeros de NF- κ B se encuentran inactivos en el citoplasma, asociados a proteínas inhibitorias de la familia κ B (I κ B). Frente a un estímulo inflamatorio, se induce una cascada de señalización intracelular que lleva a la fosforilación de las proteínas I κ B, mecanismo mediado por la acción de quinasas de I κ B (IKKs, NEMO). Como consecuencia, se induce la ubiquitinación

y degradación de I κ B, vía proteosoma permitiendo la translocación de los dímeros de NF- κ B al núcleo, lo que activa la transcripción de genes blanco al unirse a secuencias específicas del ADN conocidas como sitios κ B^{26,27}.

Respecto al papel de NF- κ B en la regulación de la inflamación del epitelio intestinal, se ha visto que su activación, es inducida por la unión de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) a receptores de tipo Toll (TLRs) en las células epiteliales intestinales, el cual promueve la producción de citoquinas inflamatorias que contribuyen a la respuesta inmune contra la invasión de bacterias patógenas. A su vez, NF- κ B cumple un rol relevante en la mantención de la integridad del epitelio intestinal, asociado a los mecanismos de control de la distribución y expresión de las proteínas UE^{23, 28}. Por lo tanto, los mecanismos de regulación de esta vía de señalización son necesarios para mantener una correcta función de la barrera intestinal. Estudios realizados con ratones carentes del factor NEMO, revelan la presencia de inflamación y desarrollo de colitis espontánea²⁹, lo que demuestra que defectos en la vía de señalización NF- κ B en células intestinales promueven el desarrollo de enfermedades inflamatorias intestinales (EII)³⁰. En modelos murinos de colitis se ha visto que el uso de péptidos inhibidores de intermediarios de la vía de activación de NF- κ B logran disminuir la gravedad de la inflamación intestinal³¹. Es así como la vía de señalización comandada por NF- κ B ejerce funciones cruciales en la regulación de la integridad de la barrera epitelial y en la patogénesis de enfermedades inflamatorias crónicas.

1.5 El factor B cell leukaemia/lymphoma 3 (Bcl-3) como regulador de la vía de activación de NF- κ B

La proteína Bcl-3, originalmente identificada como un proto-oncogen, pertenece a la familia de inhibidores I κ B (I κ B). Esta proteína es capaz de asociarse, mediante dominios de anquirina, a homodímeros de las subunidades p50 y p52 que son considerados transcripcionalmente inactivos, generando un complejo ternario [Bcl-3(p50)₂; Bcl-3(p52)₂]³² En función de un estímulo, Bcl-3 puede translocar al núcleo, modulando la transcripción mediante su unión a elementos regulatorios κ B en el ADN. Dos los posibles mecanismos de modulación han sido descritos para este proceso: Uno de ellos postula que la formación de este complejo ternario estabiliza la unión de los homodímeros de p50 o p52 al ADN. Al respecto, Carmody, RJ. *et al.*, describieron que la unión de Bcl-3 a p50

disminuye la ubiquitinación y posterior degradación de esta subunidad³³. El segundo mecanismo propone que la unión del complejo ternario genera una competencia con los dímeros activos de NF- κ B (RelA [p65]/p50) por la unión a los elementos regulatorios en el ADN, limitando los procesos de transcripción de esta vía. En este sentido, estudios realizados en macrófagos deficientes en la proteína Bcl-3 describen un aumento de la sensibilidad a estimulación con LPS y un incremento en la producción de citoquinas pro-inflamatorias, sugiriendo a Bcl-3 como un factor represor de la respuesta inflamatoria³³. Kuwata, H. *et. al.*, similarmente logró demostrar que la inducción de Bcl-3 por IL-10 es capaz de inhibir la producción de TNF- α , inducida por LPS, en macrófagos³⁴. Se ha observado que la expresión de Bcl-3 es inducida luego de 6 a 12 horas posterior a la activación la vía NF- κ B, siendo este mecanismo reconocido como un loop de auto-regulación de esta vía³⁶. Estudios posteriores realizados por Walker, T. *et al.*, lograron demostrar que esta inducción de Bcl-3 es tardía, debido a que el promotor experimenta un proceso conocido como remodelamiento de la cromatina, requerido para la unión de NF- κ B³⁷. Pese a estos hallazgos, la actividad de represión de la transcripción génica ejercida por Bcl-3 es controversial, debido a que existen estudios donde se ha demostrado su comportamiento como activador transcripcional, debido a la presencia de dominios de transactivación en su estructura³⁵.

La inducción de la expresión de Bcl-3 es inducida por citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, TNF- α , IL-9), como anti-inflamatorias (IL-10)^{34, 36, 38, 39}. Entre los mecanismos de señalización intracelular responsables de su expresión se describen la activación de los factores de transcripción STAT-3, AP-1 y el complejo heterodimerico p65-p50⁴⁰. Además, recientemente se ha descrito que la fosforilación de Bcl-3, en sitios específicos, modula su actividad transcripcional⁴¹. En resumen, la regulación génica ejercida por la proteína Bcl-3 es compleja y multifactorial, actuando como trans-represor o trans-activador de la transcripción, dependiendo del estímulo y el contexto celular en el que se encuentre.

En el epitelio intestinal se ha identificado la expresión de Bcl-3 en EII⁴². Sin embargo, se desconoce el papel que ejerce Bcl-3 en el epitelio intestinal y en la regulación de los factores que afectan el estado de la UE. Estudios preliminares, obtenidos por nuestro grupo de investigación, han descrito un aumento en la expresión génica de Bcl-3 en mucosa intestinal de pacientes irlandeses con SII (Anexo 1). Además, la estimulación *in vitro* de células DLD-1 con SN de cultivo de biopsias de pacientes con SII, indujo un aumento de la

expresión del transcrito y de la proteína de Bcl-3 en comparación a la estimulación proveniente de sujetos controles (SC). Efecto similar fue observado al estimular DLD-1 con citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, TNF- α e IFN- γ). Si bien estos resultados sugieren que una inflamación de bajo grado en el SII puede inducir la expresión de Bcl-3 en el epitelio intestinal, se desconoce si este factor contribuiría, de manera recíproca, a la mayor activación inmune de la mucosa causada por una alteración de la estructura de la UE.

1.6 Activación inmune en el SII, el papel de mastocitos en el intestino.

En el SII se ha descrito la presencia de una leve inflamación sistémica a consecuencia de un mayor grado de activación de células inmune y una mayor infiltración inmune en mucosa. El incremento en el número de mastocitos en mucosa ha sido frecuentemente observado en el SII⁴³⁻⁴⁵, así como un elevado grado de activación^{8, 43}. Los mastocitos son células efectoras descritas en la respuesta alérgica y anti-parasitaria, residentes comunes en la interfaz lumen-hospedero. Se caracterizan por poseer gránulos citoplasmáticos con abundantes mediadores químicos, tanto inflamatorios como anti-inflamatorios, entre ellos prostaglandinas, leucotrienos, TNF- α , IL-3, IL-4, IL-6, IL-10; y proteasas tales como triptasa, quimasa y carboxipeptidasas⁴⁶. En pacientes con SII se destaca una aumentada cercanía de los mastocitos a las terminaciones nerviosas sensoriales en el colon⁸, asociada a un aumento de sintomatología intestinal, sugiriendo a este mecanismo como el responsable de la comunicación alterada del eje cerebro-intestino.

Es bien reconocido que en situaciones de estrés psicosocial agudo existe una alta secreción del factor liberador de corticotropina (CRF), mediada por la activación del eje hipotálamo-hipófisis. Los mastocitos poseen receptores (CRF1, CRF2) en su superficie que son capaces de responder al CRF, aumentando la actividad secretora de sus mediadores, estando en el SII aumentada esta respuesta, reflejada en el aumento de la expresión y liberación de triptasa^{18, 47}. La triptasa, la principal proteasa del mastocito en mucosa, es una serina-proteasa capaz de activar, a través de proteólisis, diversos receptores celulares acoplados a proteína G, que en conjunto se les identifica como receptores activados por proteasas (PARs). Se han descrito 4 tipos de receptores en esta familia: PAR-1, PAR-2, PAR-3 y PAR-4, los que se expresan casi de forma ubicua⁴⁸.

PAR-2 está presente a lo largo del tracto digestivo en células epiteliales intestinales, tanto a nivel basolateral, como apical⁴⁹. La sobre-expresión de PAR-2 ha sido identificada⁵⁰

y correlacionada positivamente con los altos niveles de triptasa y un aumento de la permeabilidad intestinal en biopsias de pacientes con SII⁵¹. Además, se ha visto que SN de cultivos de deposiciones fecales, provenientes de pacientes con SII-D, aumentan la permeabilidad intestinal de mucosa colónica de ratones silvestres (*wild type*), efecto no observado en mucosa intestinal de ratones deficientes del receptor PAR-2 o tratados con inhibidores de serinas-proteasas⁵². Estos trabajos sugieren un papel central de PAR-2 en la modulación de la permeabilidad del epitelio intestinal, activado a través de triptasa. Paralelamente, se ha reportado la acción de PAR-2 en la activación neuronas sensoriales activadas por SN de cultivos pacientes con SII-D, mecanismo relacionado a la hipersensibilidad visceral de estos pacientes⁵⁰.

1.7 Relevancia del proyecto

En resumen, el SII es un desorden funcional digestivo asociado a la presencia de factores psicosociales, tales como el estrés y la depresión⁵³, que inducen el aumento en la liberación de mediadores nerviosos que activan células inmunes, siendo los mastocitos los más estudiados. A consecuencia de su activación, estas células inducen inflamación de bajo grado, provocando el deterioro de la barrera epitelial debido a alteraciones en la estructura de la UE. Entre los mecanismos responsables de estas alteraciones se describe la activación de PAR-2 por proteasas del mastocito, destacándose a triptasa como la principal enzima involucrada. Por otro lado, mediadores inflamatorios afectan el estado del epitelio mediante la activación de receptores que conducen a la activación NF- κ B, el cual participa en la expresión de proteínas involucradas en la remodelación del citoesqueleto de la UE. Se infiere que una expresión aumentada de Bcl-3, en el epitelio de pacientes con SII, podría tener un papel relevante en la estructura de la UE y, como consecuencia, en el aumento de la permeabilidad intestinal de estos pacientes. Hasta ahora, se desconoce si la triptasa liberada por una aumentada activación de mastocitos, en el intestino de pacientes con SII, afecta la expresión de Bcl-3, mediado por la activación de PAR-2. Este proyecto busca evaluar si existe un aumento en la expresión de Bcl-3 en pacientes con SII y si triptasa, vía activación de PAR-2, induce la expresión de Bcl-3 y alteraciones en la distribución y expresión de las proteínas de la UE en líneas celulares epiteliales. Estos resultados nos permitirán dilucidar un mecanismo alternativo de regulación de la permeabilidad intestinal mediado por triptasa, a través de Bcl-3, unos de los factores reguladores la vía de señalización de NF- κ B.

2. HIPÓTESIS:

Hipótesis 1: En pacientes con síndrome de intestino irritable, existe una pérdida de la función de barrera intestinal asociada a un aumento en la expresión de Bcl-3, a una elevada activación de mastocitos y a alteraciones de la unión estrecha epitelial.

Hipótesis 2: La expresión de Bcl-3, es inducida por triptasa, mediante la activación de PAR-2, afectando el estado de la unión estrecha en líneas celulares de epitelio intestinal.

3. OBJETIVOS:

3.1 Objetivo General:

Demostrar que los pacientes con síndrome de intestino irritable, poseen elevados niveles de expresión de Bcl-3, mayor activación de mastocitos y alteraciones de la unión estrecha y dilucidar *in vitro* el mecanismo que conduce al aumento de Bcl-3 y a cambios en la expresión y distribución de proteínas de la unión estrecha .

3.2 Objetivos Específicos:

3.2.1 Objetivo específico 1: Caracterizar el estado de la unión estrecha epitelial, los niveles de activación de mastocitos intestinales y la expresión de Bcl-3 en mucosa intestinal de pacientes con SII y sujetos controles (SC).

3.2.2 Objetivo específico 2: Evaluar si la inducción de Bcl-3 y las alteraciones de la UE, son producidas por la estimulación con triptasa, mediante la activación de PAR-2, en líneas celulares de epitelio intestinal.

4. MATERIALES Y MÉTODOS:

4.1 Reactivos Generales:

Cultivos celulares:

- Gibco (Carlsbad,USA): Medio DMEM, alto en glucosa, GlutaMax (N° 10569010); Medio RPMI 1640 (N° 11875093).
- Hyclone (Utah,USA): Tripsina 0,25% EDTA (N° SH30042.01); Pencilina/Estreptomicina (Código SV30010); PBS 1X esteril (N° 30266.01).

Estimulación in vitro:

- Sigma (St.Louis,USA):Nafamostat Mesilato (N° N0289); Agonista de PAR-2 (SLIGKV-NH₂) (N°S9192).
- Tocris BioScience (Ellisville, USA): Antagonista de PAR-2 (FSLRLRY-NH₂) (N° 4741).
- Promega (Madison,USA): βII Triptasa Recombinante humana (N° G5631).
- Calbiochem (San Diego, USA): βII Triptasa humana extraída de pulmón (N° 650366).

Western blot:

- Winkler (Lampa,Chile): TBS; Tween 20 (N° 720300); Tris (N° 720010), Glicina (N° 708230); APS (N° 702510); TEMED (N° 719700); SDS (N° 716510).
- Biorad (California,USA): Acrilamida/Bis 30% (N° 1610158); Membranas PVDF (N° 1620177).
- ThermoScientific (Waltham,USA): Estándar peso molecular proteínas (N° 26616); Kit de determinación proteica BCA “Pierce BCA” (N° 23225); Kit de detección de quimioluminiscencia “Pierce ECL” (N°32106)
- Sigma (St.Louis, USA): Cocktail de inhibidores de proteasas (N° P8340).

Inmunofluorescencia indirecta:

- DAKO (Santa Clara, USA): Solución de bloqueo (N° X0909); Medio de montaje (N° S3023); Diluyente de anticuerpos (N° S3022).

PCR en tiempo real:

- Qiagen (Hilden,Alemania): Kit Extracción y purificación ARN “RNAeasy” (N° 74104).
- Promega (Madison,USA): Transcriptasa reversa M-MLV (N°M1701).
- ThermoScientific (Waltham,USA): SuperScript III Transcriptasa Reversa (N°18080093); Kit reacción PCR “PowerUp SybrGreen” (N°A25742).

4.2 Participantes del Estudio

4.2.1 Criterios de inclusión:

Pacientes con diagnóstico de SII con predominio de diarrea (SII-D), constipación (SII-C) y/o mixto (SII-M), mayores de 18 y menores de 80 años, de ambos sexos, reclutados desde la sección de gastroenterología, Hospital Clínico de la Universidad de Chile (HCUCH), previa firma de un consentimiento informado, aprobado por el comité de ética de este recinto (ver anexo 2). El diagnóstico de SII se realizó en base a los criterios de ROMA III, que incluye características clínicas, tales como la presencia de dolor o molestia abdominal recurrente, asociado a dos o más de las siguientes características: mejoría con la defecación; de comienzo asociado con un cambio en la frecuencia de las deposiciones; y/o de comienzo asociado con un cambio en la consistencia de las deposiciones. Estos síntomas deben presentarse al menos 3 días del mes, durante los últimos 3 meses y los síntomas deber haber comenzado al menos 6 meses antes del diagnóstico. Consideramos SII-D, si los síntomas se asocian a la presencia de deposiciones líquidas o blandas en más de 25% de las evacuaciones y deposiciones duras en menos del 25%; para SII-C, si presentó deposiciones duras en más del 25% de las evacuaciones y deposiciones blandas o líquidas en menos del 25%; y para SII-M, si se presentaron deposiciones duras en más del 25% y deposiciones líquidas en más del 25% de los movimientos defecatorios.

También se incluyeron sujetos sanos (SC) que cumplieran con las siguientes características: mayores de 18 y menores a 80 años, de ambos sexos, que acudían al gastroenterólogo para colonoscopia de control, por antecedente de pólipos colónicos o por ser familiares de pacientes con cáncer de colon; o que debían realizarse una colonoscopia por causa no inflamatoria; sin antecedentes de enfermedad gastrointestinales orgánicas o funcionales previas, libres de episodios recientes de infección intestinal; o sujetos sanos controles pagados, para este estudio, pareados por sexo y edad.

4.2.2 Criterios de exclusión:

Fueron excluidos del estudio mujeres embarazadas y aquellos pacientes que presentaron historial clínico de: atopia, alergia alimentaria, enfermedad autoinmune, asma, diabetes tipo I y II, cáncer de cualquier origen, enfermedad inflamatoria intestinal, cuadros de diverticulitis aguda reciente (últimos 3 meses), historia de colitis infecciosa en los últimos 12 meses, sujetos con desórdenes psiquiátricos o sometidos a intervenciones

quirúrgicas gastrointestinales mayores, aquellos que han usado fármacos estabilizadores de mastocitos (montelukast) y antialérgicos (durante un mes antes del estudio), sujetos que han usado inmunosupresores incluyendo terapia esteroidal y sometidos a radioterapia o quimioterapia (durante 6 meses antes del estudio).

4.2.3 Registro clínico y demográfico de los pacientes:

Dentro de los antecedentes de los pacientes se registró: identificación, edad, género, índice masa corporal (IMC), historia médica y quirúrgica, edad de diagnóstico, subtipo de SII, severidad y comorbilidades, condición psicosocial, calidad de vida, registros colonoscópicos y patológicos, tratamiento y hospitalizaciones. Se archivó la firma de consentimientos informados para todos los sujetos incluidos en el estudio.

4.2.4 Evaluación psicosocial, calidad de vida, severidad en SII:

Todos los participantes completaron el cuestionario de salud SF-36 (QOL; quality of life) que consta de una evaluación mental y física del sujeto y la escala de ansiedad y depresión (HADS). Además los pacientes completaron el cuestionario de severidad de síntomas para pacientes con SII (SII-SS). Todas las encuestas aplicadas se encontraban previamente validadas (anexo 3).

4.2.5 Toma de muestras

Durante la colonoscopia a cada paciente con SII y SC se le tomaron muestras para biopsias obtenidas de mucosa intestinal, tanto de íleon terminal como colon distal. Una vez obtenidas se procesaron y almacenaron según las condiciones indicadas (tabla 1).

Tabla 1: Esquema de recolección y almacenamiento de muestras

Nº de muestra	Medio de Obtención	Procesamiento	Propósito	Condiciones de almacenamiento
1	Aceite crioprotector (OCT)	Congelación directa N ₂ líquido	IHC/IF	Congelación a -80°C
2	Tubo vacío	Congelación directa N ₂ líquido	Proteína	Congelación a -80°C
3	RNA later	En hielo	RNA	Congelación a -80°C
5	HBSS Sin estímulo	Incubación 20min, 37°C, 5%CO ₂ /95%O ₂	Factores solubles en el sobrenadante	Congelación a -80°C
6	HBSS Estimuladas con compuesto 48/80	Incubación 20min, 37°C, 5%CO ₂ /95%O ₂	Factores solubles en el sobrenadante	Congelación a -80°C
7	Glutaraldehído	En hielo	TEM	Almacenadas a 4°C

4.2.6 Evaluación de los tejidos obtenidos

Las muestras procedentes de colon distal e íleon terminal, fueron cortadas con un espesor de 5 μm y teñidas con hematoxilina-eosina. La Dra. Laura Carreño del Departamento de Anatomía Patológica del HCUCH, evaluó la presencia de alteraciones histológicas correspondientes a otras patologías intestinales.

4.2.7 Tamaño muestral:

Los métodos de cálculo de tamaño de muestra fueron asistidos por Ariel Castro QF. Ms, de la Dirección de Investigación Clínica de HCUCH.

El cálculo del tamaño muestral se realizó utilizando el programa Calculadora de Tamaño muestral GRANMO Versión 7.11 (Marzo 2011) y, en base a estudios realizados por Guilarte, M. *et al.*, el cual logró obtener diferencias en el número y actividad de mastocitos intestinales entre controles y SII-D, de 12,3 unidades y 0,36 mg/l, respectivamente.

Aceptando un riesgo alfa de 0.05 y un riesgo beta de 0.2 en un contraste bilateral, se precisan 27 sujetos en el primer grupo y 27 en el segundo para detectar una diferencia igual o superior al 0.36 unidades. Se asume que la desviación estándar común es de 0.42. Se ha estimado una tasa de pérdidas de seguimiento del 20%. En resumen a este estudio se incorporaron: 27 pacientes con SII los que incluirán los subtipos: predominio diarrea (SII-D), constipación (SII-C) y Mixto/alternante (SII-M/A) y 27 individuos controles.

4.3 Diseño y método de trabajo experimental

Para la realización de este estudio, las muestras intestinales obtenidas de colon e íleon en pacientes con SII o SC fueron sometidas a distintas técnicas según los objetivos planteados. Estudios *in vitro* permitieron complementar estos resultados.

Objetivo específico 1: Caracterizar el estado de la unión estrecha epitelial, los niveles de activación de mastocitos intestinales y la expresión de Bcl-3 en mucosa intestinal de pacientes con SII y sujetos controles (SC).

La evaluación de los niveles de Bcl-3 se realizó mediante las técnicas de inmunoblot, inmunofluorescencia indirecta y qPCR. Los niveles de triptasa fueron obtenidos por inmunoblot y ELISA comercial. Los niveles de las proteínas de unión

estrecha, ZO-1, Claudina-2, Ocludina, fueron obtenidos por inmunoblot e inmunofluorescencia. A continuación se describen los protocolos de las técnicas mencionadas anteriormente.

4.3.1 Evaluación por Western Blot

Las biopsias de mucosa de íleon y colon obtenidas por colonoscopia fueron homogeneizadas por agitación durante 10 a 20 segundos mediante el equipo “mini bead beater” (BiospecProducts), en presencia de 300 μ l de solución amortiguadora de lisis (10mM HEPES, 100 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 10% Igepal, 5% Sodio deoxicolato, 1%SDS, 25mM CHAPS, cocktail inhibidor de proteasas, Na₃VO₄ y PMSF) seguido de una incubación en hielo por tres minutos. Este ciclo de agitación e incubación se repitió hasta asegurar una lisis eficiente del tejido. Posteriormente, las muestras fueron incubadas 30 minutos en hielo y centrifugadas a 14000 rpm por 10 minutos para ser guardadas a -80°C.

Para la obtención de muestras de los cultivos se procedió a lavar las células con solución fosfato salino (PBS 1X) por tres veces, añadiéndose luego Tripsina/EDTA 0,25% para despegar las células de las placas. El SN obtenido se mantuvo a 4°C y se centrifugó a 1500 RPM para eliminar excesos de tripsina. Se repite este paso de centrifugación lavando con PBS 1X frío dos veces. El pellet se re-suspendió en 70 μ l de solución amortiguadora de lisis y se guardó a -80°C hasta que fue descongelado para ser centrifugado a 14000 RPM y 4°C. Posteriormente, las muestras se almacenan en refrigerador a -80°C hasta su uso. La cuantificación de proteínas de las muestras de pacientes y células se realizó mediante el método de ácido bicinonínico (Pierce BCA ProteinAssay Kit Thermo). Se cargó un volumen equivalente a 30 μ g de proteínas por carril, previa mezcla con solución amortiguadora de carga 5X y desnaturalización de las proteínas a 95°C por 5 minutos, en geles SDS-PAGE al 8% o 10% de poliacrilamida. La electroforesis vertical fue realizada a 50 V durante media hora y luego a 80-100 V hasta migración completa. La transferencia se realizó con membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) 0,2 μ m de tamaño de poro, previamente activadas con metanol por 10 minutos. El proceso de transferencia se realizó durante una hora a 250 mA constantes. La membrana fue bloqueada con 5% leche descremada-TBS Tween 0,1% (TTBS 0,1%) por una hora a temperatura ambiente. La incubación con los anticuerpos primarios se realizó durante toda la noche a 4°C en las diluciones detalladas en la tabla subyacente (ver tabla 2). Luego, las membranas son lavadas tres veces por 5 minutos con TTBS 0,1% e incubadas con anticuerpo secundario

IgG de cabra anti-conejo conjugado a HRP (ThermoScientific) 1:5000 por una hora. Posteriormente, se repite el lavado con TTBS 0,1% tres veces por 10 minutos. Se incubó con beta-actina conjugada a HRP (peroxidasa de rábano) 1:10000 para obtener el control interno de carga. El proceso de detección de proteínas fue realizado por quimioluminiscencia empleando el equipo Amersham Imager 600 series. El análisis de densitometría fue realizado con el programa Gel-Pro 3.1.

Tabla 2: Datos técnicos de los anticuerpos usados en Western Blot

Anticuerpo	Marca	N° de catálogo	Dilución	Hospedero
Bcl-3	Santa Cruz	C-14:sc-185	1:200	Rabbit policlonal
βII-Triptasa	Abcam	EPR9522	1:1000	Rabbit
Ocludina	Invitrogen	71-1500	2 µg/mL	Rabbit policlonal
ZO-1	Invitrogen	61-7300	2 µg/mL	Rabbit policlonal
Beta Actina-HRP	Sigma	A3854	1:10000	Monoclonal
IKKα	CellSignaling	11930	1:1000	Mouse monoclonal
p-IKKα/β	CellSignaling	2697	1:1000	Rabbit monoclonal

4.3.2 Determinación por ELISA (*Ensayo inmuno-enzimático en fase sólida*)

El contenido de triptasa fue determinado a partir de los SN recolectados de las biopsias. Estos fueron descongelados y centrifugados a 2000g por 10 minutos y 4°C para remover detritos celulares. Los niveles de triptasa fueron evaluados mediante la técnica de ELISA en Eve Technologies (Calgary, Alberta, Canadá).

4.3.3 Determinación por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

Los cortes de mucosa intestinal almacenados a -80°C fueron descongelados por dos horas a -20°C y 15 minutos a temperatura ambiente. La fijación se realizó con paraformaldehído 1% durante 10 minutos seguido de tres lavados con PBS 1X de 5 minutos cada uno. La recuperación antigénica de las muestras, se realizó con solución precalentada de citrato de sodio pH=6 por cinco minutos a 100°C e incubados cinco minutos a temperatura ambiente. Se lavó dos veces con agua bi-destilada por cinco minutos antes de circunscribir con lápiz hidrófobo las muestras. Se procedió a permeabilizar el tejido con PBS-Tritón 0,3% diez minutos y bloquear con solución de bloqueo DAKO por el mismo tiempo. La incubación de los anticuerpos primarios fue durante toda la noche en humedad a 4°C, usándose las diluciones descritas en la tabla adjunta (ver tabla 3). Como

control negativo se incubó en lugar de anticuerpo primario una solución de diluyente de anticuerpo. Se procedió a lavar las muestras tres veces con PBS-Tritón 0,3% por cinco minutos y a incubar por una hora en oscuridad y a temperatura ambiente con anticuerpo secundario de conejo o ratón 1:5000 (Alexa Fluor488, alexafluor 594). Se repitió el lavado con PBS-Tritón 0,3% y se incubó con solución DAPI (sigma) 1:100 (substock 1:500) durante un minuto. Se realizaron los últimos lavados con PBS 1X y se procedió a montar los cubre objetos con medio de montaje DAKO. El proceso de inmunofluorescencia realizado en células Caco-2 sigue los mismos pasos a excepción de la descongelación y el uso del lápiz hidrófobo. Las imágenes fueron obtenidas a través de microscopía de epifluorescencia (Nikon) o microscopía confocal (Carl Zeiss, LSM700), se analizaron a través del software ImageJ 6.0. Para la cuantificación de los distintos marcajes, se seleccionaron tres campos distintos por foto en triplicado.

Tabla 3: Datos técnicos de los anticuerpos usados en Inmunofluorescencia

Anticuerpo	Marca	Nº de catálogo	Dilución	Hospedero
Bcl-3	Abcam	Ab49470	1:50	Rabbit policlonal
βII-Triptasa	Abcam	EPR9522	1:300	Rabbit monoclonal
Ocludina	Invitrogen	71-1500	4 µg/mL	Rabbit policlonal
ZO-1	Invitrogen	61-7300	4µg/mL	Rabbit policlonal
Claudina-2	Invitrogen	51-6100	2 µg/mL	Rabbit policlonal

4.3.4 Extracción de ARN y síntesis de ADN complementario

Las muestras almacenadas a -80°C en RNAlater, se descongelaron en hielo y fueron homogeneizadas por agitación durante 15 segundos mediante el equipo “mini bead beater” (BiospecProducts), en presencia de solución amortiguadora de lisis RLT. Luego las muestras homogeneizadas fueron centrifugadas por 5 minutos a 4°C y 200 g. Los SN se guardaron a -80°C hasta su posterior uso. El ARN total de las muestras fue extraído y purificado mediante el kit comercial de extracción Rneasy (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ADN complementario se obtuvo mezclando, en un tubo libre de nucleasas, 1-5 µg de RNA total en presencia de 1 µl (500µg/mL) de oligos dT y 1 µl de dNTP 10 mM que fueron incubados por 5 minutos a 65°C, para luego ser enfriados rápidamente. Después se agregaron 4µl de la solución amortiguadora 5X First-Strand (Kit

SuperScript III) y 2 µl de DTT 0,1M, incubándose 2 minutos a 37°C. Posteriormente, se añadió 1 µl (200 unidades) de la enzima transcriptasa reversa M-MLV. Se mezcla, y se incuba por 50 minutos a 37°C. La última etapa consiste en la inactivación de la reacción, mediante una incubación de 15 minutos a 70°C.

4.3.5 Determinación por reacción en cadena de polimerasa cuantitativa en tiempo real (RTQ-PCR)

Para esta determinación se usaron los partidores descritos en la tabla 4, los que fueron diseñados previamente en IDT (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA). La determinación del transcrito de Bcl-3 fue realizada mediante el uso del kit PowerUp Sybr Green (Thermo Scientific). El ciclo de amplificación consistió en las siguientes etapas: desnaturación inicial de 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de desnaturación por 15 segundos a 95°C, alineamiento de 60 segundos a 60°C y extensión por 60 segundos a 60°C. El equipo utilizado fue un ABI PRISM 7900 (Applied Biosystems) y cada reacción fue en triplicado. Para comprobar la especificidad de los partidores se realizaron las respectivas curvas de fusión. Se utilizó como control interno la amplificación del gen de la subunidad ribosomal humana 18S. El número de veces de cambio se calculó con respecto al grupo control usando el método del $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Tabla 4: Datos técnicos de los partidores usados en la reacción de PCR en tiempo real

Gen Blanco	Partidor Antisentido	Partidor Sentido	Tamaño (pares de bases)
BCL-3	GTGAGCCCGTCATAATTGCG	ACATTACCGTCTGTGGTCCG	185
18S	CGCTCCACCAACTAAGAACG	CTAAACACGGGAAACCTCAC	516

4.3.6 Determinación por microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Las biopsias obtenidas por colonoscopia y almacenadas a 4°C en glutaraldehído, fueron procesadas y leídas por la Unidad de Microscopía avanzada de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Las muestras de tejido fueron fijadas con glutaraldehído 2,5% en solución amortiguadora de cacodilato de sodio 0,1M pH 7,0 durante toda la noche. Luego de un lavado con solución cacodilato durante 1 hora se post-fijó con tetróxido de osmio al 1% acuoso durante 1 hora. Se lavó durante 30 minutos con agua destilada y se tiñó en bloque con acetato de uranilo acuoso al 1% durante 1 hora. Se deshidrató con una batería de acetona de 50, 70, 95 y 100, 100% durante 20

minutos cada una. Se pre-incluyó con epon-acetona 1:1 durante toda la noche y se incluyó en resina pura durante 4 horas. Luego se polimerizó en estufa a 60°C durante 24 horas. Cortes finos (80nm) fueron obtenidos en ultramicrotomo Leica Ultracut R, teñidos con acetato de uranilo al 4% en metanol durante 1 minuto y citrato de plomo según Reynolds durante 5 minutos, los que fueron observados en un microscopio electrónico de transmisión Philips Tecnai 12 Biotwin a 80 kV. El software de captura de imágenes es el iTEM (Olympus Soft Imaging Solutions). La activación de los mastocitos fue evaluada a través del porcentaje de degranulación. Esto se obtuvo, contando el número de gránulos vacíos y número de gránulos llenos o semi-llenos por mastocito. Las distancias de las aperturas intercelulares del epitelio solo se evaluaron en las secciones con micro vellosidades orientadas longitudinalmente, midiendo a través del programa computacional ImageJ 6.0 el ancho de los espacios intercelulares en las zonas apicales.

Objetivo 2: Evaluar si la inducción de Bcl-3 y las alteraciones de la UE, son producidas por la estimulación con triptasa, mediante la activación de PAR-2, en líneas celulares de epitelio intestinal.

Líneas celulares epiteliales de colon Caco2 y/o DLD-1 fueron cultivadas y estimuladas con extracto de triptasa humana de pulmón (Calbiochem) y/o con proteína recombinante de triptasa humana (Promega). Se utilizó el péptido agonista de PAR-2 (SLYGKV-NH₂), el péptido antagonista de PAR-2 (FSLRLRY-NH₂) y el inhibidor Namafostat® como controles específicos de activación del receptor. La expresión de BCL-3 y de las proteínas UE fue evaluada mediante las técnicas de Inmunoblot e IFI descritas anteriormente. Se describe a continuación la mantención y características de los cultivos celulares establecidos.

4.3.7 Cultivos celulares

Líneas de células epiteliales humanas derivadas de carcinoma colorectal, DLD-1 y Caco-2, obtenidas de ATCC (Manassas, VA, USA); fueron cultivadas y mantenidas en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 y medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) respectivamente. Ambos medios fueron suplementados con 10% de Suero Fetal Bovino y 1% Penicilina/Estreptomina. Las células fueron cultivadas en estufa a 37°C, con concentraciones de 95%O₂ y 5%CO₂ en ambiente húmedo y fueron sub cultivadas por digestión parcial con Tripsina/EDTA 0,25% cada dos días. Los ensayos de estimulación con Triptasa, Nafamostat Mesilato, Agonista de PAR-2 (SLIGKV-NH₂) y

Antagonista de PAR-2 (FSLLRY-NH₂) se realizaron con 4×10^5 células/ml, un pasaje celular entre 21- 30 y una confluencia del 70 al 80%.

4.4 Análisis Estadístico:

Todos los experimentos fueron realizados en triplicado, y los resultados se muestran como la mediana \pm desviación estándar. Las diferencias entre el grupo de sujetos controles y el de pacientes con SII fue determinada usando la prueba no pareada t Student. Se consideran significativos valores $P > 0,05$. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prisma 6.0 (GraphPad, Software, Inc, USA).

5. RESULTADOS:

5.1 Características clínicas y demográficas de los participantes de estudio

En la **tabla 5** se muestran las características demográficas de los participantes incluidos en el estudio: sujetos controles (SC) y pacientes con SII con predominio diarreico (SII-D), predominio de constipación o estreñimiento (SII-C), mixtos (SII-M) e indeterminado (SII-I). No se observaron diferencias significativas en cuanto al sexo, edad ($p=0,06$), estatura ($p=0,7852$), peso ($p=0,5563$) e índice de masa corporal (IMC) ($p=0,5063$), entre ambos grupos de estudio.

Tabla 5: Características clínicas y demográficas de los participantes

	SC	SII total	SII-D	SII-C	SII-A	SII-I
N	20	33	15	9	7	2
M:F	5:15	3:30	1:14	1:8	1:6	0:2
Edad (años)	55,20 ± 11,31	48,88 ± 14,40	43,40 ± 13,60	54,56 ± 13,44	54,43 ± 15,55	45,00 ± 12,73
Rango de edad	29-71	23-80	23-66	34-75	28-80	36-54
Peso (X ± DS) (kg)	69,41 ± 11,14	67,56 ± 12,34	65,14 ± 11,72	66,89 ± 12,80	73,57 ± 12,39	66,50 ± 19,09
Rango peso	50-90	48-90	48-90	51-87	56-90	53-80
Estatura (X ± DS) (m)	1,59 ± 0,08	1,59 ± 0,09	1,61 ± 0,06	1,59 ± 0,1	1,57 ± 0,1	1,60 ± 0,05
Rango Estatura	1,50-1,75	1,35-1,76	1,50-1,75	1,46-1,76	1,35-1,68	1,56-1,64
IMC (X ± DS) (kg/m ²)	27,37 ± 3,450	26,48 ± 5,010	26,12 ± 5,155	27,31 ± 3,252	27,27 ± 6,446	19,71 ± 0,00
Rango IMC	21,93-32,46	17,63-36,76	17,63-35,16	23,44-32,00	19,84-36,76	19,71-19,71

Los datos se expresan como promedio ± desviación estándar (DS). F, femenino; M, masculino.

El análisis de la gravedad de síntomas de los pacientes SII se evaluó mediante una escala SII-SSS (en inglés: *symptoms severity scale*), validada y traducida al español. Los valores obtenidos fueron tabulados en la **tabla 6**. Se registraron en pacientes SII niveles aumentados de: dolor abdominal (SII: 2.485 ± 1.06), frecuencia del dolor abdominal (SII: 7.273 ± 3.02) e hinchazón (SII: 2.538 ± 0.87) con respecto al grupo control ($p < 0,0001$), no observando diferencias en los niveles de satisfacción del hábito intestinal ($p = 0,1695$). No se observaron cambios significativos de estos parámetros entre los distintos fenotipos de SII.

Las características psicosociales de los participantes del estudio fueron obtenidas mediante encuestas que evaluaron la presencia de síntomas de ansiedad y depresión (cuestionario HADs), y los niveles de calidad de vida (cuestionario SF-36), tanto física

(CSF) como mental (CSM). En la **tabla 6** se muestra que los pacientes con SII poseen mayores niveles de ansiedad (SC: 4.68 ± 4.30 ; SII: 9.21 ± 5.67 ; $p=0,0019$) y depresión (SC: 2.765 ± 3.06 ; SII: 4.72 ± 3.92 ; $p=0,0723$) en comparación a los SC, así como una disminuida CSF (SC: 74.86 ± 16.58 ; SII: 49.64 ± 21.93 ; $p=0,0004$) y CSM (SC: 68.27 ± 22.36 ; SII: 43.88 ± 21.68 ; $p=0,0012$).

Tabla 6: Aumento de comorbilidad psicosocial y sintomatología clínica en pacientes con SII

	SC	SII total	SII-D	SII-C	SII-A	SII-U
Severidad de dolor	nc	$2,48 \pm 1,06$	$2,73 \pm 1,10$	$2,33 \pm 0,98$	$2,20 \pm 1,30$	$1,50 \pm 0,70$
Frecuencia del dolor	nc	$7,273 \pm 3,02$	$8,33 \pm 2,554$	$6,41 \pm 2,81$	$5,60 \pm 4,09$	$9,50 \pm 0,71$
Hinchazón	nc	$2,538 \pm 0,87$	$2,867 \pm 0,83$	$2,42 \pm 0,67$	$2,14 \pm 0,69$	1 ± 0
Satisfacc. Hábito intestinal	nc	$2,515 \pm 0,83$	$2,60 \pm 0,98$	$2,33 \pm 0,65$	$2,60 \pm 0,89$	$2,50 \pm 0,70$
Ansiedad	$4,68 \pm 4,304$	$9,214 \pm 5,679$	n.s	n.s	n.s	n.s
Depresión	$2,76 \pm 3,06$	$4,72 \pm 3,92$	n.s	n.s	n.s	n.s
CSF	$74,86 \pm 16,58$	$49,64 \pm 21,93$	n.s	n.s	n.s	n.s
CSM	$68,27 \pm 22,36$	$43,88 \pm 21,68$	n.s	n.s	n.s	n.s

Resultados expresados como mediana \pm DS; ns: no significativo; nc: no corresponde.

5.2 Caracterización y comparación en los niveles de expresión de Bcl-3 en pacientes chilenos con SII y sujetos controles

Se procesaron muestras de mucosa intestinal, de íleon y colon, para determinar los niveles de transcrito y la expresión proteica de Bcl-3 mediante q-PCR y western blot respectivamente, siguiendo protocolos específicos indicados en la sección metodología para cada técnica.

En la **figura 1** se muestra en el gráfico que representa el número de veces de cambio de los niveles de transcrito de Bcl-3, tanto en íleon (**Figura 1A y 1B**), como colon (**Figura 1C y 1D**), entre los SC y pacientes con SII. Se observó un aumento significativo de 2,6 veces en la expresión de Bcl-3 en mucosa colónica para los pacientes con SII respecto al grupo SC (SC: $1,000 \pm 0,8624$; SII: $2,645 \pm 2,877$, $p=0,0344$). El análisis de los subtipos otorgó diferencias significativas de 3,6 veces en los niveles de Bcl-3 entre el grupo de pacientes SII-C con respecto al grupo SC (SII-C: $3,662 \pm 3,535$, $p=0,0236$), no encontrándose diferencias para el resto de los subtipos analizados. En mucosa ileal, se observó una tendencia de aumento de 1,4 veces en los niveles de Bcl-3 en pacientes con SII

(SC: $1,000 \pm 0,447$; SII: $1,401 \pm 0,732$, $p=0,0922$), sin cambios significativos entre los subtipos de SII (SC: $1,000 \pm 0,8624$; SII-D: $2,645 \pm 2,877$, $p=0,0344$).

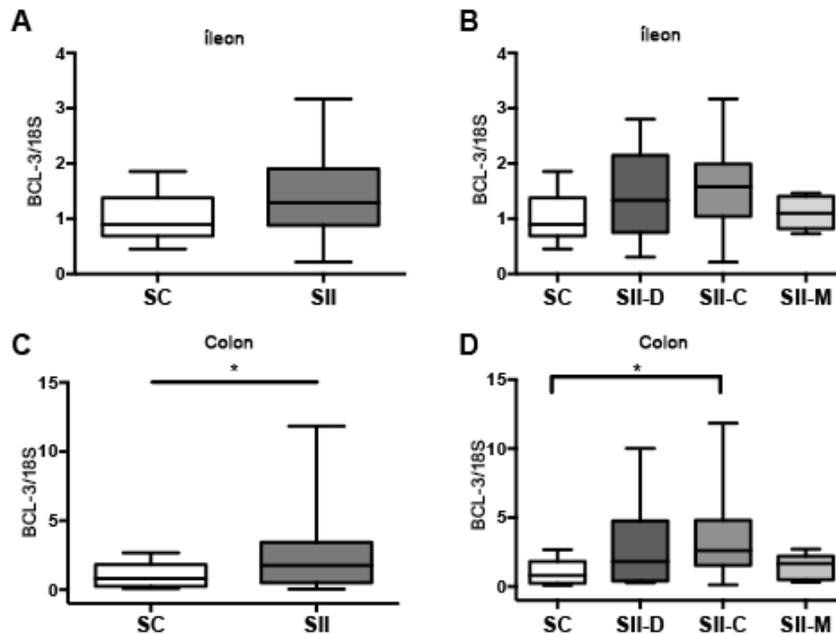


Figura 1: Aumento del número de veces de cambio de Bcl-3 en mucosa intestinal de colon de pacientes con SII. Gráfico que muestra las veces de cambio del transcrito de Bcl-3 para ileon (A) y colon (C) con sus respectivos fenotipos (B y D). El número de veces de cambio fue obtenido mediante la proporción de los niveles de transcrito correspondientes a la expresión del gen blanco Bcl-3 con respecto a la expresión del gen constitutivo 18S, normalizados con respecto al valor promedio del grupo control. Resultados expresados como mediana \pm D.S. Controles ileon (n=11), pacientes SII ileon (n=27), Controles colon (n=16), pacientes SII colon (n=27) * $p < 0,005$ vs control.

En cuanto a la expresión de la proteína de Bcl-3, el patrón de migración electroforética obtenido por western blot, a partir del extracto proteico total de mucosa intestinal, otorgó una banda principal equivalente a 60 kDa, correspondiente al peso molecular de Bcl-3 según lo indicado en la hoja informativa del anticuerpo (**Figura 2A**). Además, se observaron 2 bandas secundarias, de menor y mayor peso molecular, alrededor de la banda principal. El análisis semicuantitativo de la densidad óptica de la banda principal (Bcl-3) respecto a la densidad óptica de la banda β -actina (47 kDa), dio como resultado una expresión de Bcl-3 en mucosa ileal significativamente aumentada en 1,7 veces para los pacientes con SII respecto al grupo de SC (SC: $1,000 \pm 0,7929$; SII: $1,680 \pm 1$, $p=0,0470$) (**Figura 2B**), sin cambios significativos en colon entre ambos grupos de estudio (SC: $1,000 \pm 1,007$; SII: $1,057 \pm 1,128$, $p=0,8198$) (**Figura 2C**). El análisis de expresión de Bcl-3 por subtipos de SII, para ambos segmentos intestinales no otorgó

diferencias significativas. Sin embargo, se observó una tendencia de aumento de 2,1 veces de la expresión de Bcl-3 en íleon entre los pacientes con SII-C y SC (SII-C: $2,105 \pm 1,233$, $p=0,1358$) (**Figura 2D y 2E**).

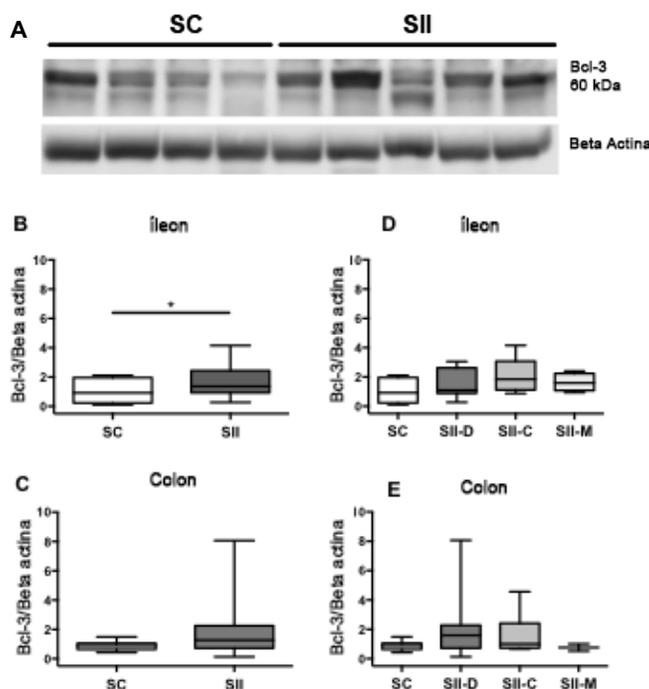


Figura 2: Aumento de la expresión de la proteína de Bcl-3 en mucosa ileal de pacientes con SII. En A) imagen representativa de las bandas obtenidas para Bcl-3 (60 kDa) y β actina (47 kDa). Se muestran en B) y C) los niveles de expresión proteica para Bcl-3 en íleon y colon respectivamente. En (D) se observan los gráficos obtenidos según subtipo de los pacientes SII para íleon y en (E) para colon. El número de veces de cambio fue obtenido mediante la proporción de los niveles de transcrito correspondientes a la expresión proteica de Bcl-3 con respecto a la expresión de β actina, normalizados con respecto al valor promedio del grupo control. Resultados expresados como mediana \pm D.S. Controles íleon (n=13), pacientes SII íleon (n=20), Controles colon (n=12), pacientes SII colon (n=29). * $p<0,005$ vs control.

Debido al aumento de Bcl-3 observado a nivel intestinal en pacientes con SII en comparación con SC, quisimos evaluar si existían diferencias en su distribución en la mucosa a través de la técnica de IFI y el uso de microscopía confocal.

En la **figura 3** se muestran imágenes representativas de la inmuno detección de Bcl-3 en mucosa intestinal de íleon (**Figura 3A y 3B**) y colon (**Figura 3C y 3D**). En base a las características histológicas de la mucosa intestinal, es posible distinguir en azul los núcleos de células epiteliales que delimitan áreas correspondiente al lumen del intestino, y los núcleos distribuidos en áreas de la lámina propia. Se ha reportado que la distribución intracelular, ya sea en núcleo o citoplasma, de Bcl-3 varía de acuerdo a la función que este

factor ejerza en cada tipo celular. En pacientes con SII y SC, tanto en íleon como en colon, observamos que Bcl-3 se distribuyó predominantemente en el núcleo de las células epiteliales, siendo la intensidad de la detección mayor para los pacientes. Además, en muestras ileales y colónicas de SC se observó un inmunomarcaje elevado de Bcl-3 en el citoplasma de algunas células del área epitelial (**inserto Figura 3A y 3C**). Además, pudimos observar una marca positiva para Bcl-3 principalmente en los núcleos de células de la lámina propia, para ambos segmentos intestinales, sin diferencias cualitativas entre SC y pacientes con SII.

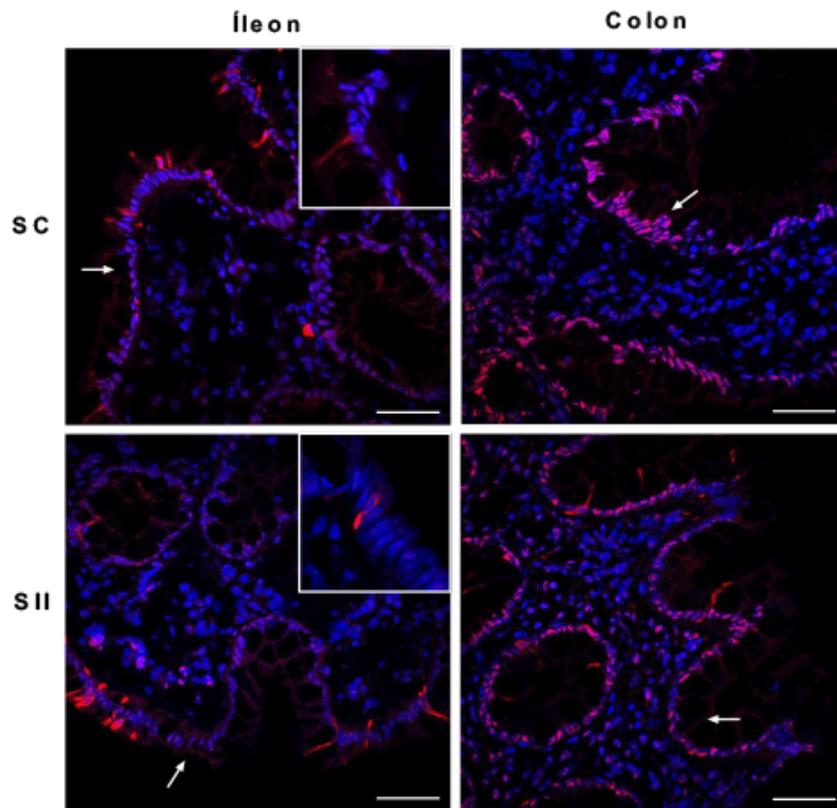


Figura 3: Inmunotinción para Bcl-3 en mucosa intestinal de pacientes con SII y SC. Imágenes representativas de inmunotinción de Bcl-3 en mucosa ileal (A y C) y mucosa colónica (B y D) para SC y pacientes con SII. Se observa una inmunoreactividad positiva, tinción en rojo, para Bcl-3 y una tinción nuclear azul (DAPI). Las flechas indican la distribución de Bcl-3 en epitelio. Los insertos en las figuras A y C, corresponden a células epiteliales con alta expresión y distribución citoplasmática de Bcl-3. Imágenes obtenidas con un aumento 40X por microscopia confocal. Las barras de escala representan 50 μ m.

Mediante una semi-cuantificación de la intensidad de la marca de la expresión de Bcl-3 por área de superficie analizada, y posterior normalización de los datos, se observó una expresión significativa de Bcl-3 dos veces mayor en mucosa de íleon (SC: 1,000 \pm

0,688; SII: $2,041 \pm 1,260$, $p=0,0347$) y 2,1 veces mayor en mucosa de colon (SC: $1,000 \pm 0,610$; SII: $2,098 \pm 1,544$, $p=0,0104$), en pacientes con SII respecto a SC (**Figura 4A y 4D**).

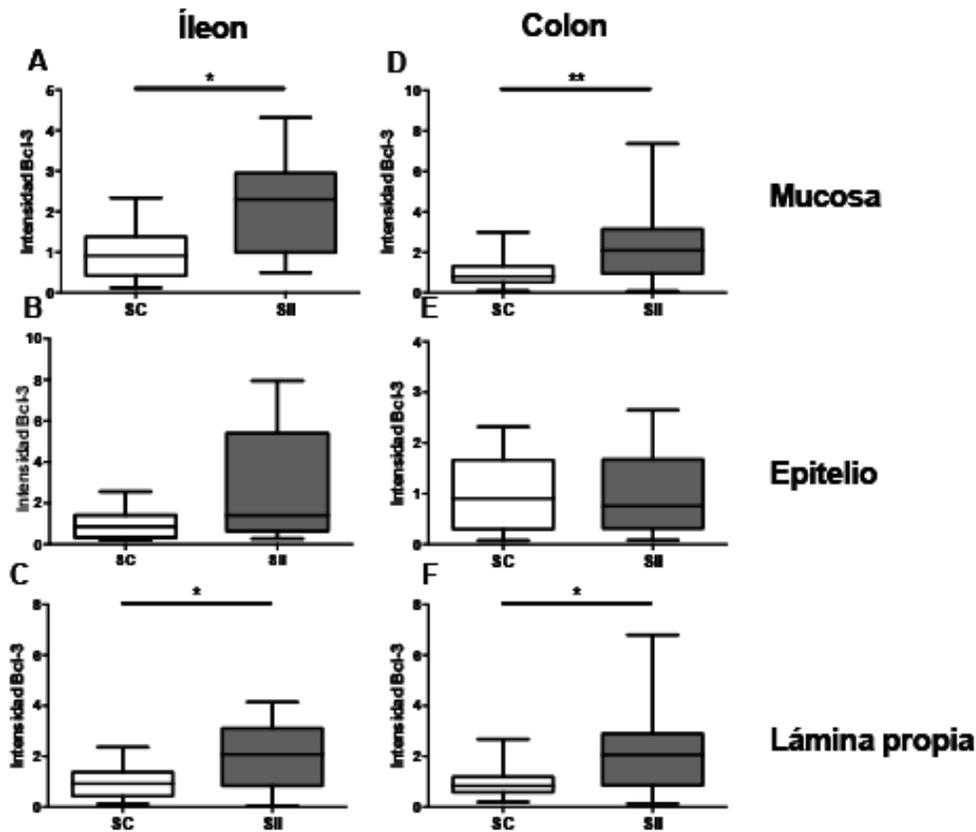


Figura 4: Aumento de la expresión relativa de Bcl-3 en epitelio de mucosa intestinal de pacientes con SII. Se observa en el panel izquierdo la expresión de Bcl-3 en mucosa (epitelio + lámina propia) (A), epitelio (B) y lámina propia (C) en íleon. En el panel derecho se muestra la expresión de Bcl-3 en mucosa (D), epitelio (E) y lámina propia (F) en colon. El número de veces de cambio muestra la razón entre intensidad de fluorescencia y área de superficie, normalizado con respecto al valor promedio del grupo control. Análisis realizados utilizando 3 campos de observación por sujeto. Resultados expresados como mediana \pm D.S. Controles íleon (n=7), pacientes SII íleon (n=8), Controles colon (n=15), pacientes SII colon (n=20). * $p<0,005$ vs control, ** $p<0,001$ vs control.

El análisis semicuantitativo de la expresión de Bcl-3 en áreas correspondientes al epitelio y a la lámina propia otorgó una expresión significativamente aumentada de 2,1 veces en epitelio intestinal de íleon (SC: $1,000 \pm 0,684$; SII: $2,154 \pm 1,159$, $p=0,0147$) y 2,2 veces en epitelio intestinal de colon (SC: $1,000 \pm 0,7248$; SII: $2,221 \pm 1,687$, $p=0,0094$) en pacientes SII, en relación al grupo SC (**Figura 4B y 4E**). Pese a que no observamos diferencias significativas en la expresión de Bcl-3 en lámina propia entre ambos grupos de estudio, se observó una tendencia de intensidad relativa de 2,7 veces mayor en íleon de pacientes SII en comparación con el grupo SC (SC: $1,000 \pm 0,7712$; SII: $2,745 \pm 2,622$

p=0,1368) (**Figura 4C**). En colon no hubo cambios significativos en la expresión de Bcl-3 en lámina propia, entre los grupos experimentales (SC: $1,000 \pm 0,7530$; SII: $0,9673 \pm 0,7395$ p=0,9037) (**Figura 4F**).

Los resultados obtenidos en la sección 5.2 revelan, por medio de tres técnicas distintas, que los niveles de expresión de Bcl-3 en mucosa intestinal se encuentran elevados y que su localización sería principalmente en el núcleo de las células epiteliales en pacientes chilenos con SII en comparación a SC.

5.3 Caracterización y comparación en los niveles de expresión de Triptasa en pacientes chilenos con SII y sujetos controles

Las diferencias en el nivel de triptasa, principal proteasa secretada por el mastocito en mucosa, fueron determinadas a partir del extracto total de mucosa intestinal mediante western blot y en los SN de cultivo de mucosa intestinal, a través de ELISA.

Las **figura 5A y 5B** corresponden a imágenes representativas del patrón de migración electroforética obtenido mediante western blot, para extractos provenientes de íleon y colon respectivamente, en los cuales se detectó una banda principal de 37 kDa, equivalente al peso molecular de triptasa. Además, se observaron bandas secundarias en torno a la banda principal, para algunos extractos proteicos de mucosa intestinal provenientes tanto de SC como pacientes con SII. La cuantificación relativa de la densidad óptica de la banda principal con respecto a la densidad óptica de β -actina, no otorgó diferencias significativas en el contenido de triptasa en mucosa de íleon de pacientes con SII respecto a los SC (SC: $0,9449 \pm 0,1984$; SII: $1,027 \pm 0,1964$, p=0,2856) (**Figura 5C**). Similares resultados fueron observados para el colon (SC: $0,9494 \pm 0,4941$; SII: $0,8005 \pm 0,5645$, p=0,5394). El análisis del comportamiento de la expresión de triptasa por subtipos de pacientes con SII, evidenció un significativo aumento de triptasa en los pacientes con SII-C respecto a pacientes con SII-D, en mucosa colónica (SII-C: $2,068 \pm 0,5854$; SII-D: $1,129 \pm 0,4105$ p=0,0072) (**Figura 5D**), sin cambios en íleon.

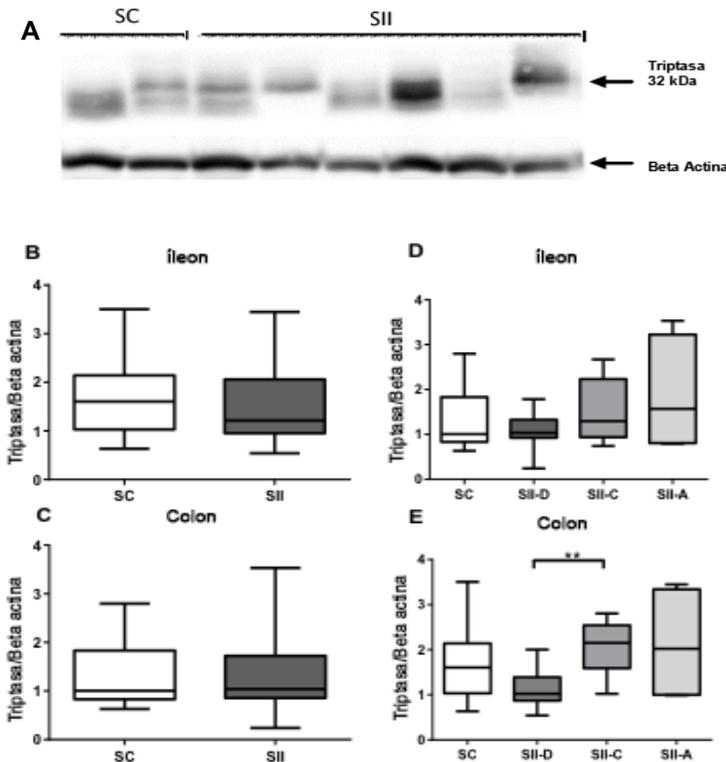


Figura 5: Determinación en el contenido de Triptasa en mucosa intestinal de pacientes con SII. En A) se muestra la imagen representativa de las bandas correspondientes a triptasa (37 kDa) y β actina (47 kDa). La cuantificación de la proporción triptasa/ β actina (unidad relativa), se observa en (B) y (C) para íleon y colon. El análisis de subtipos en pacientes SII para íleon se muestra en (D) y en (E) para colon. Controles íleon (n=14), pacientes SII íleon (n=20), Controles colon (n=16), pacientes SII colon (n=31). Resultados expresados como mediana \pm D.S.*p<0,005 vs control.

La determinación de los niveles de triptasa en los SN de cultivo de mucosa ileal y colónica, demostró que no existieron diferencias significativas entre SC y pacientes con SII, siendo los niveles de esta proteína sub-detectados, para la mayoría de las muestras, bajo la metodología empleada.

5.4 Caracterización y comparación en los niveles de expresión de proteínas de unión estrecha: ZO-1, Ocludina y Claudina-2 en pacientes con SII y SC

La expresión y organización de las proteínas UE es fundamental en la mantención de la integridad de la barrera epitelial. Previamente, se ha reportado la presencia de alteraciones en la expresión de estas proteínas en mucosa intestinal de pacientes con SII¹⁷. En este trabajo se determinó, mediante western blot, las diferencias en los niveles de las proteínas UE (ZO-1, Ocludina y Claudina-2) entre pacientes con SII y SC. Además se

comparó la distribución celular de una de las proteínas UE, ZO-1, mediante IFI, y microscopía confocal, en ambos grupos de estudio.

5.4.1 Determinación de ZO-1, mediante western e IFI, en muestras intestinales de pacientes con SII y SC

En la **figura 6** se muestran imágenes representativas del inmunomarcaje de ZO-1 en mucosa de íleon para un SC y un paciente con SII. Se observó una marca positiva para ZO-1, distribuida entre las células epiteliales, restringida a la superficie luminal, para ambos grupos de estudio. En el grupo SC, ZO-1 se distingue como una marca puntual, distribuida a lo largo de la barrera epitelial, tanto en íleon como colon (**Figura 6A**). En pacientes con SII, la distribución de la marca en íleon, fue irregular a los largo de la epitelio y difusa hacia el citoplasma de las células epiteliales, observando una disminución de la intensidad de la señal en la zona apical (**Figura 6B**). No se observaron diferencias en el inmunomarcaje para el colon, entre los grupos de estudio.

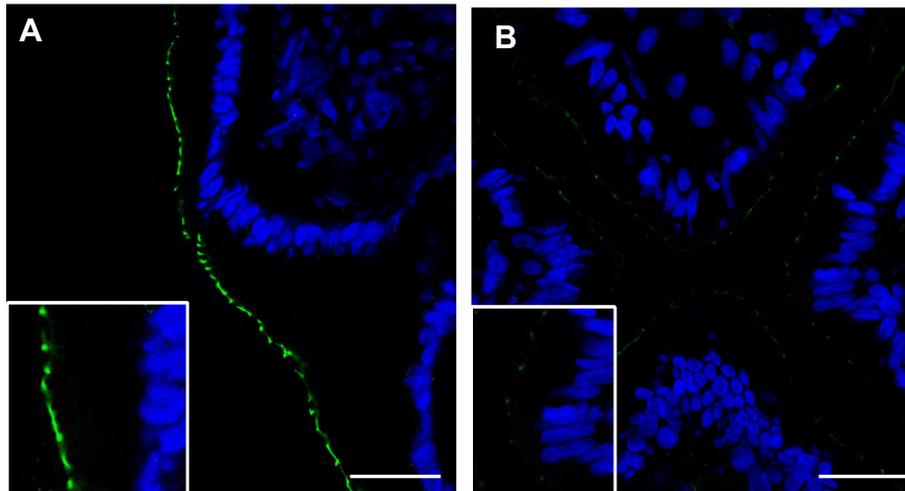


Figura 6: Distribución de la proteína ZO-1 en mucosa intestinal de pacientes con SII y SC. La inmunotinción se observa como una marca positiva verde para ZO-1 y una tinción azul para los núcleos (DAPI). En la imagen se observan micrografías representativas de mucosa ileal para SC (A) y pacientes SII (B) con sus respectivas áreas de aumento (insertos). Imágenes obtenidas con un aumento 40X por microscopía confocal. Las barras equivalen a 50 μ m.

El análisis de la semi-cuantificación de la intensidad de fluorescencia de ZO-1 respecto al área epitelial seleccionada (**Figura 7A y 7B**), demostró una reducción significativa en los niveles de ZO-1 en mucosa ileal de pacientes SII (SC: $0,4614 \pm 0,3299$;

SII: $0,1467 \pm 0,1510$, $p=0,0025$) en comparación al grupo SC, mientras que en colon no se observaron cambios significativos (SC: $0,222 \pm 0,06846$; SII: $0,2333 \pm 0,08663$, $p=0,8054$).

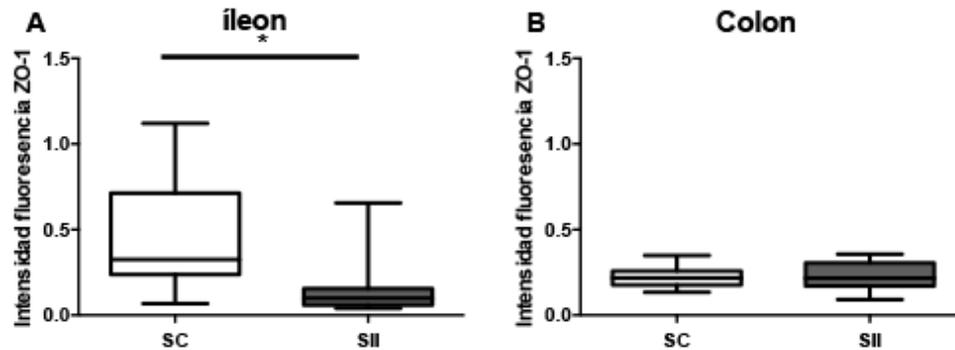


Figura 7: Disminución en los niveles de ZO-1 en mucosa ileal de pacientes con SII. Se observan los gráficos la semicuantificación de ZO-1 en íleon (A) y colon (B). Resultados expresados como mediana \pm D.S. Los datos muestran la proporción entre la intensidad de la fluorescencia para ZO-1 con respecto a DAPI en una longitud dada de la superficie. Controles íleon (n=10), pacientes SII íleon (n=18), Controles colon (n=15), pacientes SII colon (n=20). * $p < 0,005$ vs control.

5.4.2 Determinación de ZO-1, mediante western blot, en muestras intestinales de pacientes con SII y SC.

A partir del extracto total de biopsias se evaluó la expresión de ZO-1 mediante western blot. En la **figura 8A** se muestra la imagen representativa del patrón de corrida electroforética de ZO-1, en mucosa intestinal para el grupo SC y pacientes SII, correspondiente a una banda de peso molecular de 220 kDa.

Como resultado de la semicuantificación de la D.O. de ZO-1 normalizado respecto a la D.O. de β -actina (**Figura 8B**), no se observaron diferencias significativas en la expresión relativa de ZO-1 en íleon (SC: $1,046 \pm 0,7667$; SII: $1,448 \pm 0,6936$, $p=0,4857$) ni en colon (**Figura 8C**), (SC: $0,5760 \pm 0,4377$; SII: $0,8336 \pm 0,6121$, $p=0,2760$) para ambos grupos de estudio.

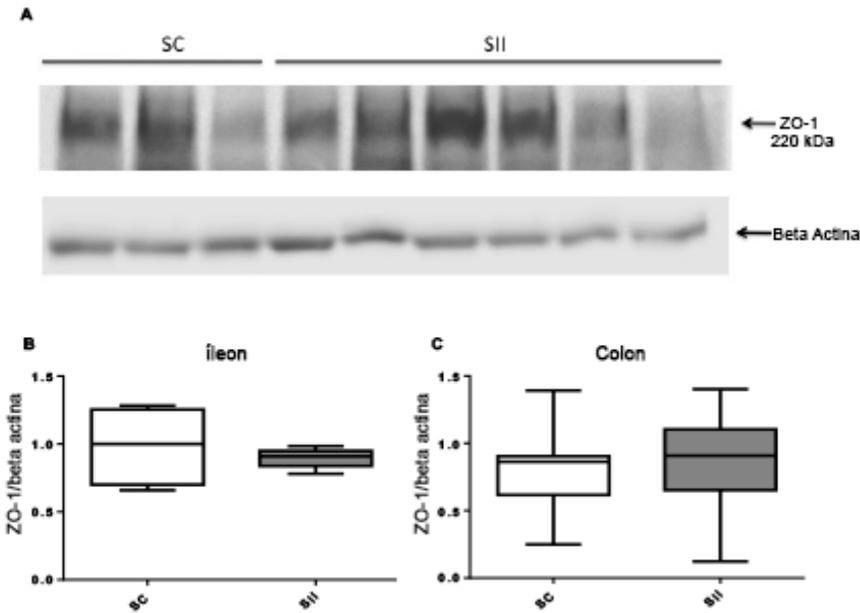


Figura 8: Determinación en los niveles de ZO-1 en mucosa intestinal de pacientes con SII. En (A) la flecha indica las bandas representativas obtenidas por western blot para ZO-1 (220 kDa) en muestras intestinales para pacientes con SII y SC. La cuantificación de la proporción ZO-1/ β actina (unidad relativa), se observa en (B) para íleon y (C) colon. Controles íleon (n=4), pacientes SII íleon (n=4), Controles colon (n=13), pacientes SII colon (n=23). Resultados expresados como mediana \pm D.S.*p<0,005 vs control.

5.4.3 Determinación de ocludina, mediante western blot, en muestras intestinales de pacientes con SII y SC.

En la **figura 9A** se observa la imagen representativa del patrón de migración electroforética para ocludina, en la que se observa una banda de un peso molecular correspondiente a 65 kDa. Los resultados obtenidos de la cuantificación de la expresión relativa de ocludina respecto a β -actina (**Figura 9B**) no otorgaron diferencias, tanto para íleon (SC: $0,3523 \pm 0,2225$; SII: $0,1744 \pm 0,2060$ p=0,1302) como colon (SC: $0,4470 \pm 0,2864$; SII: $0,3292 \pm 0,2667$ p=0,1586), entre pacientes con SII y SC (**Figura 9B-9C**).

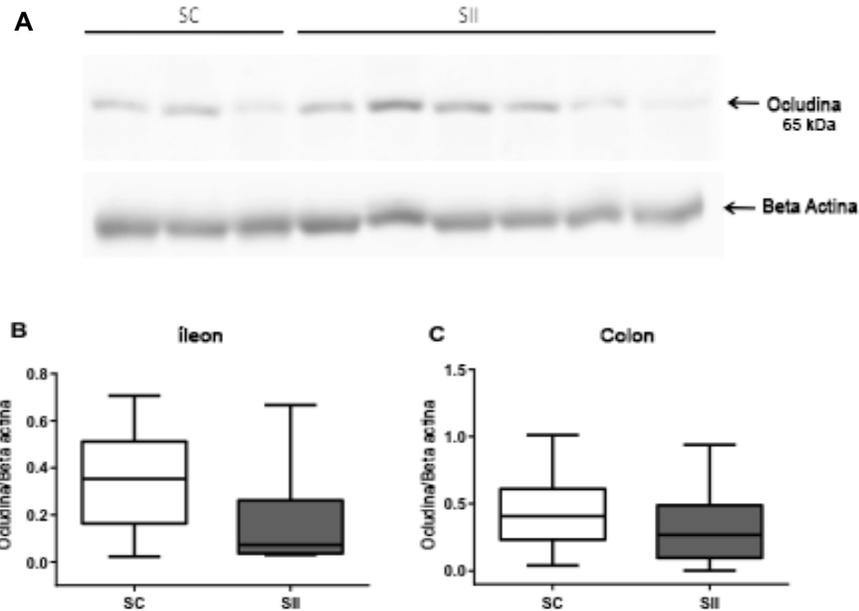


Figura 9: Determinación en los niveles de occludina en mucosa intestinal de pacientes con SII. En (A) la flecha indica las bandas representativas obtenida para Occludina (65 kDa) obtenidas por western blot en muestras intestinales para pacientes SII y SC. La cuantificación de la proporción Occludina/ β actina (Unidad relativa), se observa en (B) para íleon y (C) colon. Controles íleon (n=9), pacientes SII íleon (n=11), Controles colon (n=13), pacientes SII colon (n=23). Resultados expresados como mediana \pm D.S. * $p < 0,005$ vs control.

5.4.4 Determinación de Claudina-2, mediante western blot e IFI, en muestras intestinales de pacientes con SII y SC.

La determinación de Claudina-2 mediante WB no fue lograda, pese a los numerosos intentos con diferentes protocolos de extracción y corridas. Debido a estas dificultades se procedió a evaluar su expresión mediante IFI y microscopía confocal. En la **figura 10** se muestran las imágenes representativas de la inmunomarcación de Claudina-2 en mucosa ileal de pacientes con SII y SC, en donde se observó una señal positiva para Claudina-2 en la superficie apical de las células epiteliales (**Figura 10A**). Mientras que para SC el inmunomarcaje en íleon se observó principalmente a nivel apical, en pacientes con SII se detectó una distribución mayor en el citoplasma de las células epiteliales (**Figura 10B**). Por otro lado, en mucosa colónica, la localización de la proteína fue registrada de manera inversa, siendo observada principalmente en el citoplasmática de SC (**Figura 10C**) a diferencia de una distribución apical epitelial en pacientes con SII (**Figura 10D**).

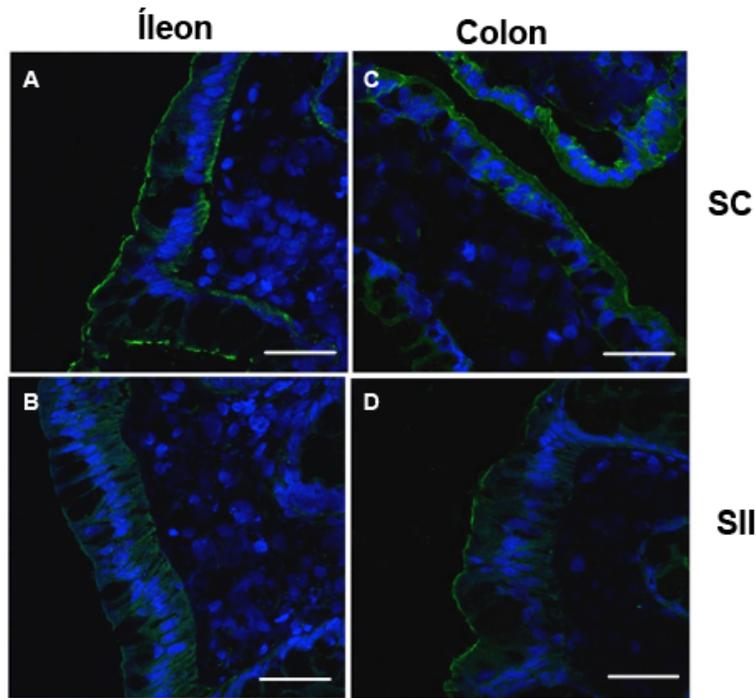


Figura 10: Distribución de la proteína Claudina-2 en mucosa intestinal de pacientes con SII y SC. La inmunotinción se observa como una marca positiva verde para Claudina-2 y una tinción azul para los núcleos (DAPI). En el panel superior se observan las micrografías representativas de mucosa ileal para SC (A) y pacientes SII (B). En el panel inferior se muestran las micrografías representativas de mucosa colónica para el grupo control (C) y pacientes SII (D) respectivamente. Imágenes obtenidas con un aumento 40X por microscopía confocal. Las barras equivalen a 50 μ m.

5.5 Evaluar la integridad del epitelio intestinal en pacientes chilenos con SII y sujetos controles.

El aumento de la permeabilidad epitelial intestinal es una de las características fisiopatológicas más descritas para el SII, relacionadas a alteraciones de la estructura de la UE. Para evaluar el estado de las UE en la mucosa intestinal de sujetos controles y pacientes con SII realizamos un análisis ultraestructural del epitelio, tanto de íleon como colon, a través de TEM.

En la **figura 11** se muestra una micrografía representativa de la barrera epitelial observándose, tanto en íleon como colon, células caliciformes, enterocitos, núcleos celulares y mitocondrias. La mucosa colónica (**Figura 11B**) se caracteriza por poseer vellosidades cortas, anchas y criptas pequeñas en comparación a mucosa ileal (**Figura 11A**). No se observan cambios histológicos (anatómicos) en muestras intestinales entre pacientes con SII y SC.

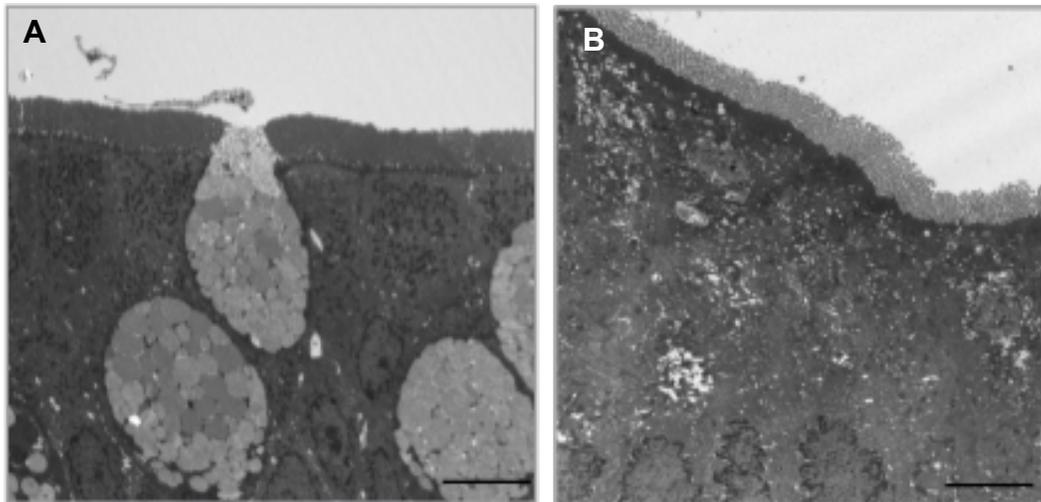


Figura 11: Ultraestructura de la barrera epitelial intestinal. Micrografías representativas de mucosa ileal (A) y mucosa colónica (B). Imágenes obtenidas con un aumento 2550X por microscopía electrónica de transmisión. Las barras equivalen a 5 μm .

En epitelio intestinal, se observan zonas de fusión de las membranas celulares de enterocitos adyacentes, ubicadas en el área más luminal, correspondientes al complejo de UE (**Figura 12A y 12B**). Para evaluar el estado de la UE, se procedió a medir la distancia intercelular, a nivel luminal, a partir de las micrografías obtenidas por TEM (**Figura 13A y 13B**).

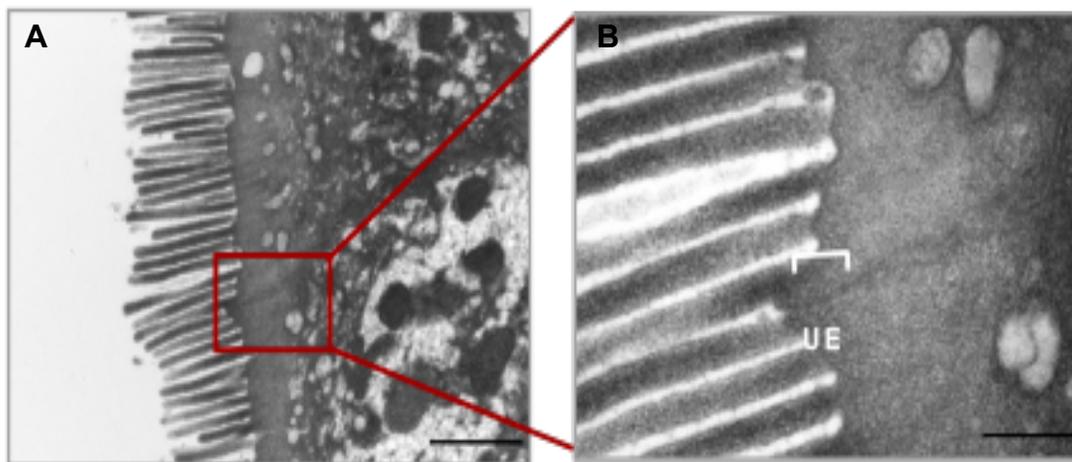


Figura 12: Ultraestructura del complejo de unión estrecha en mucosa intestinal. Micrografía representativa obtenida por TEM, que muestra dos enterocitos adyacentes en mucosa colónica. Las membranas plasmáticas de las células adyacentes, en la base de las vellosidades, se encuentran en íntimo contacto en la zona de la UE. Imágenes obtenidas con un aumento de 16500X (A); barra equivalente a 1 μm y de 60000X (B) en el área amplificada de la imagen; barra equivalente a 200 nm.

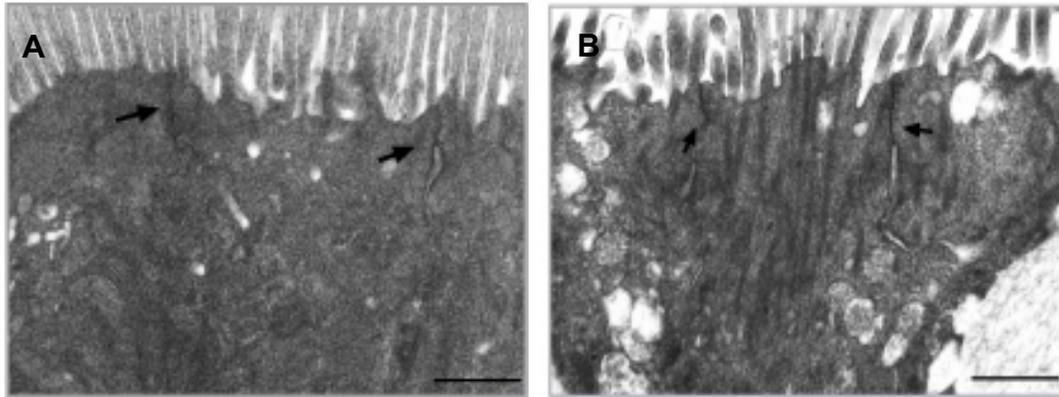


Figura 13: Ultraestructura del complejo apical en mucosa de pacientes con SII y SC. Imagen representativa, obtenida por TEM, en mucosa ileal de SC (A) y de pacientes con SII (B). Las zonas indicadas con flechas corresponden a los lugares donde se midió la distancia intercelular. Imágenes obtenidas con un aumento de 20500X (A); barra equivalente a 1µm y de 26500X (B); barra equivalente a 500 nm.

En pacientes con SII se observó un aumento significativo de la distancia de la UE con respecto al grupo SC en el epitelio de íleon (SC: $7,148 \pm 1,194$; SII: $11,98 \pm 2,387$ $p=0,0010$), sin diferencias significativas para el colon (SC: $14,47 \pm 2,329$; SII: $13,81 \pm 3,043$ $p=0,4389$) (Figura 14A y 14B).

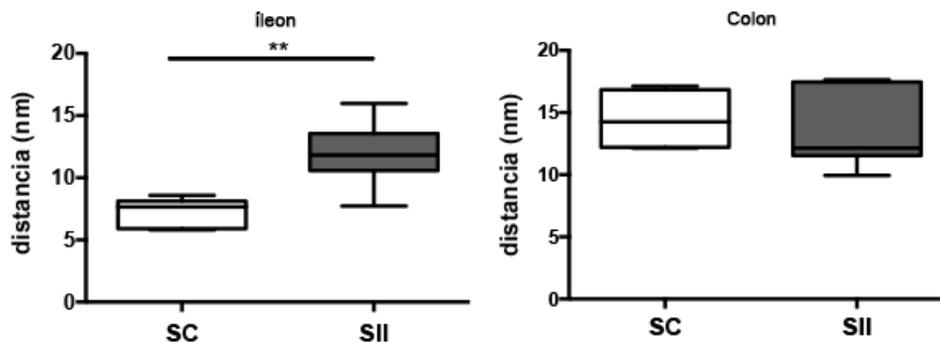


Figura 14: Aumento de la distancia intercelular (nm) en mucosa intestinal de íleon de pacientes con SII. En A) la cuantificación corresponde a mucosa ileal y en B) a mucosa colónica. La distancia intercelular se midió en tres puntos distintos de la zona luminal. Resultados expresados como mediana \pm D.S. Controles íleon (n=10), pacientes SII íleon (n=18), Controles colon (n=15), pacientes SII colon (n=20) * $p<0,005$ vs control.

5.6 Comparar el número y actividad de mastocitos intestinales en pacientes chilenos con SII y sujetos controles.

5.6.1 Determinación del número de mastocitos en muestras intestinales de pacientes con SII y SC.

El número de mastocitos se determinó por IFI y microscopía de epi-fluorescencia, utilizando un anticuerpo específico para triptasa. Aquellas células que presentaron una inmunomarcación positiva, distribuida en torno al núcleo celular fueron consideradas como mastocitos. En la **figura 15** se muestran imágenes representativas, donde se distinguen mastocitos distribuidos en áreas peri-epiteliales y en la lámina propia. Una mayor densidad de mastocitos fue observado en pacientes con SII, en mucosa ileal y colónica con respecto a los SC (**Figura 15A y 15B**).

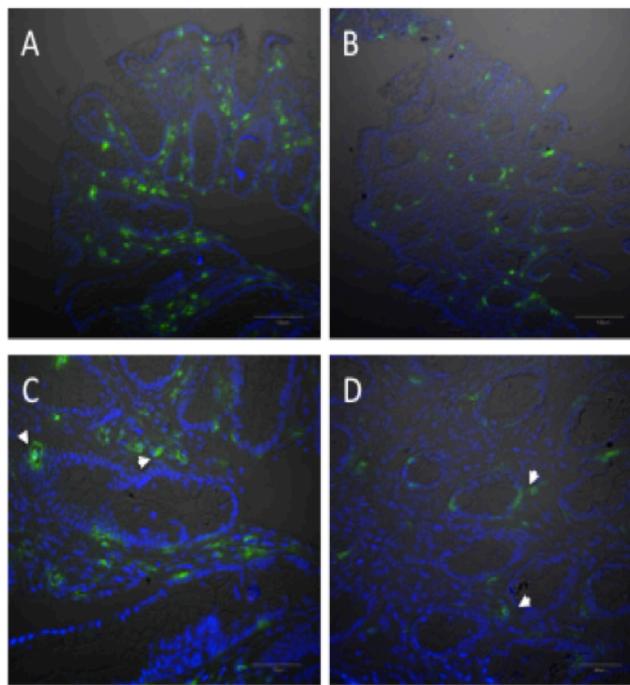


Figura 15: Mayor distribución de mastocitos en lámina propia de pacientes con SII. La señal se observa como una marca positiva verde para Triptasa y una tinción nuclear azul (DAPI). En el panel superior se observa el inmunomarcaje en mucosa ileal para grupo control (A) y pacientes SII (B). En el panel inferior se muestra la tinción en mucosa colónica para el grupo control (C) y pacientes SII (D). Imágenes obtenidas con un aumento 200X y 400X por microscopía de epifluorescencia.

Mediante la cuantificación del número de células positivas para triptasa por área de tejido, se obtuvo un aumento significativo en el número de mastocitos en mucosa ileal (SC: $14,64 \pm 8,10$; SII: $26,00 \pm 14,82$ $p=0,0050$) y en mucosa colónica (SC: $11,94 \pm 6,54$; SII: $17,40 \pm 10,39$ $p=0,0474$), en pacientes con SII en comparación con el grupo SC (**Figura 16A y 16B**).

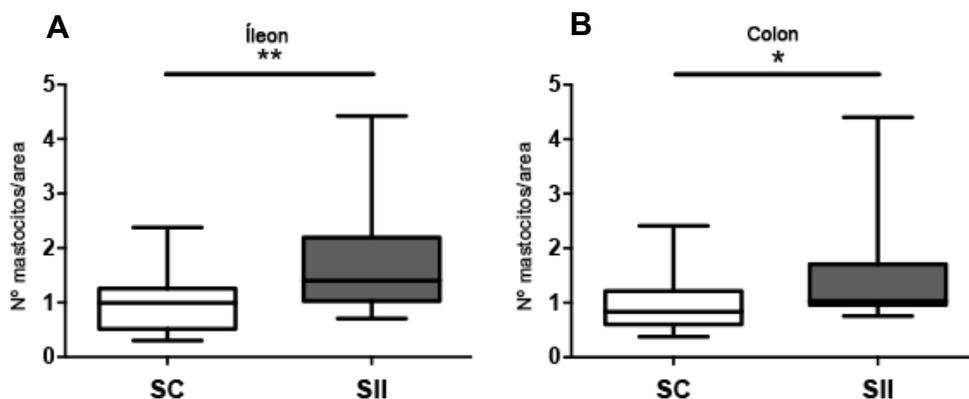


Figura 16: Aumento en el número de mastocitos en mucosa intestinal de pacientes con SII. Análisis de los valores obtenidos por IFI del número de células inmunoreactivas para triptasa en un área determinada. En (A) se muestra el gráfico que indica el número de mastocitos en íleon (A) y en (B) a nivel de colon. Resultados expresados como mediana \pm D.S. Controles íleon (n=14), pacientes SII íleon (n=23), Controles colon (n=12), pacientes SII colon (n=19). * $p<0,005$ vs control, ** $p<0,001$

5.6.2 Determinación de la actividad de los mastocitos en muestras intestinales de pacientes con SII y SC.

Para evaluar las diferencias del grado de actividad de los mastocitos infiltrados en mucosa, entre pacientes con SII y SC, se procedió a calcular el porcentaje de degranulación de cada mastocito, a partir de microfotografías obtenidas mediante TEM de mucosa ileal y colónica. Se consideró como porcentaje de degranulación la proporción entre el número de gránulos vacíos o parcialmente llenos, con respecto el número total de gránulos por mastocito. Los resultados indicados en la **figura 17**, evidenciaron un aumento significativo del porcentaje de degranulación de mastocitos en muestras de íleon de pacientes con SII (SC: $60,73 \pm 6,983$; SII: $78,22 \pm 9,075$, $p=0,0190$) con respecto a SC. No se observaron diferencias significativas en muestras de colon (SC: $84,01 \pm 14,66$; SII: $63,53 \pm 23,28$, $p=0,1375$) entre los grupos de estudio.

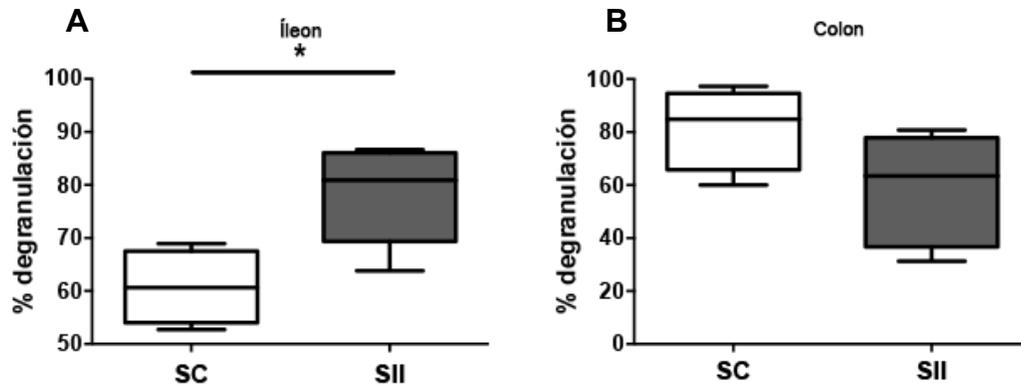


Figura 17: Aumento del porcentaje de degranulación de mastocitos en íleon de pacientes con SII. En A) se presenta el gráfico de los datos para íleon y en B) para colon. Controles íleon (n=4), pacientes SII íleon (n=6), Controles colon (n=12), pacientes SII colon (n=19). *p<0,005 vs control, **p<0,001 Resultados expresados como mediana ± D.S.

5.6.3 Características ultraestructurales de los mastocitos intestinales en pacientes con SII y SC.

El análisis de la ultraestructura de los mastocitos de mucosa intestinal ileal y colónica fue realizado mediante TEM. La **figura 18**, representa las observaciones realizadas en donde se distinguen las características pleiomórficas de mastocitos, mononucleares, de núcleos de tamaño grande, centrado, con cromatina descondensada y condensada en el área perilaminar; y citoplasma irregular, con pliegues ondulados, de contenido granular denso. La localización de las mitocondrias varía, observándose una distribución perinuclear, en mastocitos en reposo o con bajo grado de activación (**Figura 18A**), y una distribución cercana a los sitios de exocitosis, en la superficie celular, para mastocitos activados (**Figura 18B y 18C**). Los mastocitos provenientes de pacientes SII presentaron: mitocondrias fuera del perímetro celular (**Figura 18D**), predominantemente una membrana plasmática irregular, y gránulos de distintos tamaños y rugosidad, que han liberado su contenido de forma parcial o total (observado como una disminución de la electrodensidad), respecto a SC.

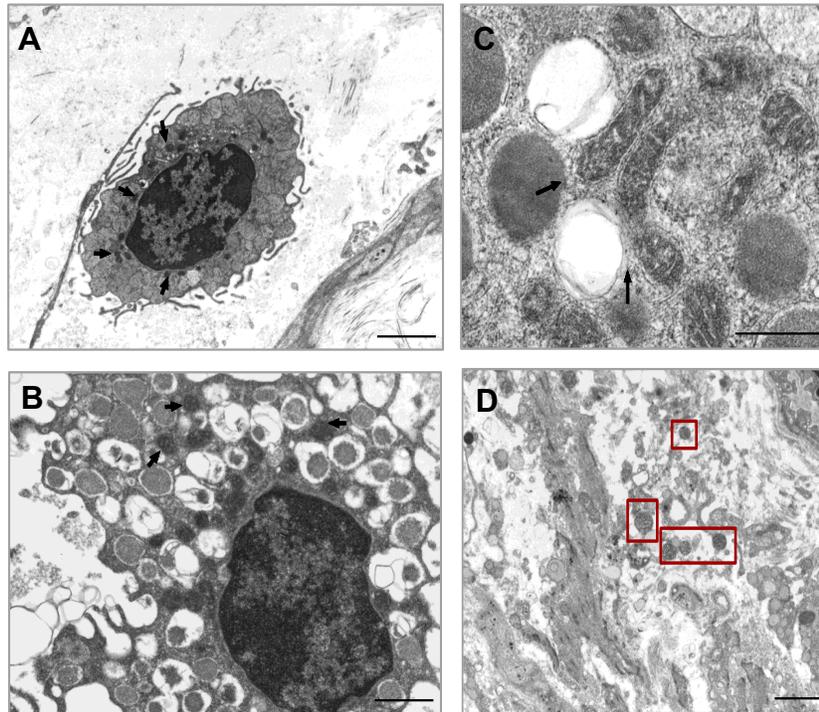


Figura 18: Características ultraestructurales de mastocitos intestinales humanos. Imagen representativa de mastocito con bajo grado de activación (A) y alto porcentaje de degranulación, proveniente de pacientes con SII (B). Las flechas indican la ubicación de las mitocondrias. En C) se muestra un área aumentada, donde se observa que las mitocondrias se localizan cercanas a los sitios de exocitosis. En D) se observa, marcado con cuadrados rojos, mitocondrias extracelulares, lejanas al perímetro celular. Imágenes obtenidas por TEM con un aumento de 6000X (A); barra equivalente a 2 μm , aumento de 11500X (B); barra equivalente a 2 μm ., aumento de 43000X (C); barra equivalente a 500 nm y aumento de 6000X (D); barra equivalente a 2 μm .

Además en pacientes SII, se observaron gránulos que conservaron sus membranas plasmáticas intactas, sin fusión inter-granular, y con mayor contenido del tipo cristalóide, siendo menor los del tipo enrollado (*scroll*) (**Figura 19A y 19B**). Los mastocitos en la mucosa provenientes del grupo SC fueron principalmente observados en estado de reposo (**Figura 20A**).

Respecto a la proximidad de mastocitos a otros tipos celulares de la mucosa, se distinguieron interacciones con linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos. Además en pacientes con SII se observó una distribución cercana de los mastocitos a las terminaciones nerviosas del intestino (**Figura 20B y 20C**).

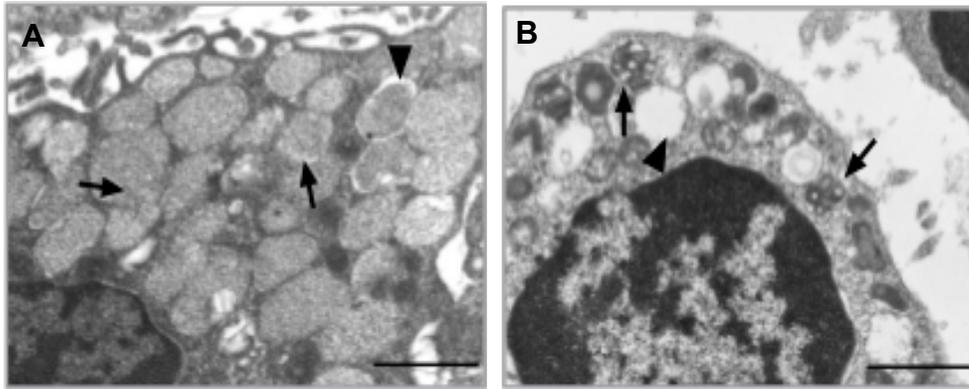


Figura 19: Contenido de gránulos citoplasmáticos en mastocitos de mucosa intestinal. Micrografías representativas del contenido granular, observándose en (A) gránulos del tipo cristaloides y en (B) del tipo enrollado. Las puntas de flecha muestran gránulos vacíos o parcialmente llenos. Imágenes obtenidas por TEM con aumento de 20500X. Las barras de escala equivalen a 1 μ m.

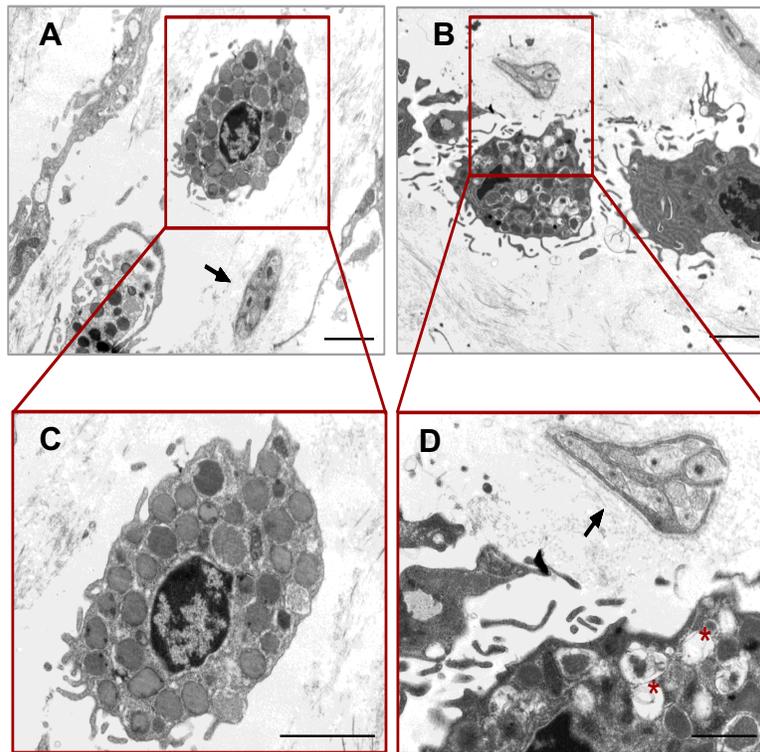


Figura 20: Cercanía de mastocitos a terminaciones nerviosas en mucosa intestinal de pacientes con SII. Imagen representativa de grupo control (A) y pacientes con SII (B). La flecha indica la cercanía del mastocito a las terminaciones nerviosas. Los asteriscos señalan gránulos vacíos, debido a la degranulación. Imágenes obtenidas por microscopía de transmisión electrónica con un aumento de 6000 X (A); barras equivalente a 2 μ m, aumento de 11500X (B); barra equivalente a 2 μ m, aumento de 6000X (C); barra equivalente a 2 μ m y un aumento de 16500X (D); barra equivalente a 1 μ m.

5.7 Evaluar in vitro si la activación del receptor PAR-2, mediante triptasa, induce un aumento en la expresión de Bcl-3 en líneas celulares de epitelio de colon.

5.7.1 Expresión de Bcl-3 frente a una estimulación dosis y tiempo respuesta con triptasa.

Como se mencionó previamente, muestras intestinales de pacientes con SII presentaron un aumento de la expresión de Bcl-3 y un elevado número de mastocitos en comparación con el grupo SC. Pese a que no se observaron diferencias en el contenido de triptasa en mucosa intestinal entre ambos grupos de estudio, bajo la metodología utilizada, un mayor grado de activación de los mastocitos de mucosa fue observado para los pacientes con SII. Debido a esto, nos preguntamos si la triptasa secretada por estos mastocitos activados es capaz de inducir la expresión de Bcl-3 en el epitelio intestinal. Para ello, líneas celulares epiteliales intestinales (DLD-1 y Caco-2) fueron estimuladas *in vitro* con Triptasa, a diferentes dosis y tiempos, mediante western blot, para evaluar la expresión de Bcl-3. La **figura 21** muestra una imagen representativa del patrón de migración electroforética para Bcl-3, en donde se observan dos bandas alrededor de 60 kDa, equivalentes al peso molecular de Bcl-3, y la banda del control de carga β -actina (47kDa). Debido a que el anticuerpo de Bcl-3 utilizado permitió observar más de una señal, comprobamos la banda específica de esta proteína a través de un cultivo de células DLD-1 transfectadas con ARN interferente contra el transcrito de Bcl-3 (siRNA Bcl3) o con un vector de sobreexpresión de esta proteína (pcDNA3.1-Bcl-3).

En la **figura 21**, se observó una disminución de la expresión de la proteína en células transfectadas con siRNA Bcl3 (banda 2), contrario a lo observado para la transfección con pcDNA3.1-Bcl-3, en donde se observa un aumento de la expresión de Bcl-3 (banda 2), en relación a la condición basal y la de estimulación con el vehículo de transfección. Se concluye que en el patrón de migración electroforética la segunda banda es la correspondiente a la proteína Bcl-3.

Respecto a la expresión de Bcl-3 en células epiteliales intestinales, en respuesta a la estimulación con triptasa, la **figura 22A** muestra una imagen representativa de las corrida electroforética para Bcl-3 en extracto de células DLD-1, en donde se observa el aumento de expresión de esta proteína frente a una estimulación, por 12 horas, en una curva dosis respuesta (triptasa rango 0,01 - 1 μ g/ml), siendo máxima la expresión para la dosis de 0,5

µg/ml. En la **figura 22B**, se muestra la respuesta cinética (rango 0 a 24h) de expresión de Bcl-3 frente a estimulación con triptasa a concentración de 0,5 µg/ml, en donde podemos observar un aumento en el nivel de expresión de la proteína de Bcl-3 a las 6, 12 y 24 horas, siendo máxima para las 24h.

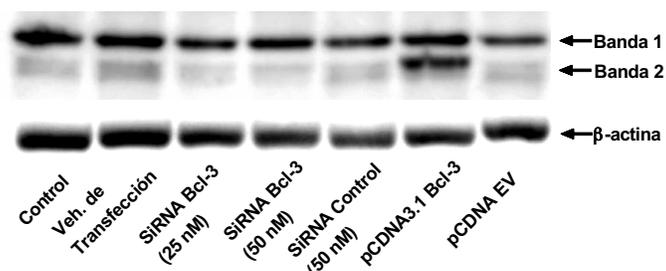


Figura 21: Ensayo de transfección en línea celular DLD-1 con SiRNA Bcl-3 y pCDNA Bcl-3. Imagen representativa, obtenida por western blot (A), donde se observan las bandas representativas de Bcl-3 (60 kDa) y β actina (47 kDa). Existe una disminución en la intensidad de la segunda banda observada para Bcl-3 al utilizar el SiRNA (carril 3 y 4) y un aumento de la intensidad de esta misma banda al emplear el pCDNA (carril 6) con respecto a los controles. N=2.

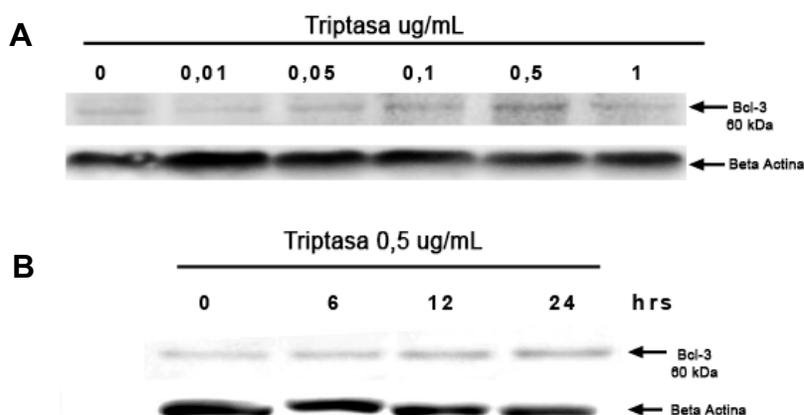


Figura 22: Ensayos de estimulación con triptasa en células DLD-1. En A) se muestra la estandarización dosis respuesta de triptasa a las 12 hrs. Se observa un mayor efecto en los niveles de Bcl-3 a la concentración de 0,5 µg/ml. En B) se observa una imagen representativa de western blot, donde se observan los niveles de Bcl-3 (60 kDa) y β actina (47 kDa) a las 0,6,12 y 24 hrs en células DLD-1 estimuladas con Triptasa 0,5 µg/ml. N=3.

Los gráficos de la semicuantificación de los niveles de Bcl-3 en células DLD-1 estimuladas con triptasa se observan en la **figura 24A**. Existe un aumento significativo de 1,76 veces en la expresión de Bcl-3 a las 6 horas (Bcl-3: $0,6235 \pm 0,1113$ $p=0,0409$), de 1,88 veces a las 12 horas (Bcl-3: $0,6647 \pm 0,1449$ $p=0,0210$), y de 2,5 veces a las 24 horas

(Bcl-3: $0,8868 \pm 0,01060$ $p=0,0009$) con respecto a las células en estado basal (Control: $0,3535 \pm 0,1208$).

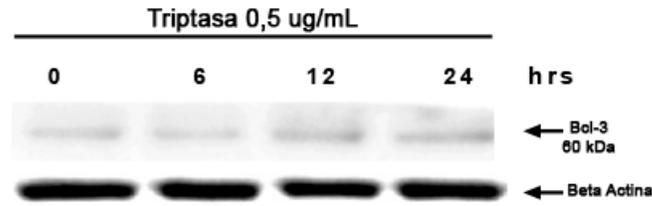


Figura 23: Niveles de expresión de Bcl-3, en células Caco-2 estimuladas con 0,5 µg/mL de Triptasa, a las 0, 6, 12 y 24 horas. Imagen representativa de western blot, donde se observan los niveles de Bcl-3 (60 kDa) y β actina (47 kDa) con respecto al tiempo. N=3

La respuesta cinética de estimulación con triptasa fue similarmente realizada para la línea celular epitelial Caco-2 (**Figura 23**), observándose un aumento de Bcl-3 a las 12h y 24h. La semicuantificación de los niveles de Bcl-3 (**Figura 24B**) otorgó un aumento significativo a las 6 horas (Bcl-3: $0,9615 \pm 0,3215$ $p=0,0393$), 12 horas (Bcl-3: $0,9576 \pm 0,08992$ $p=0,0409$) y 24 horas (Bcl-3: $0,9917 \pm 0,03160$ $p=0,0290$) comparado a la expresión de los controles (Control: $0,5226 \pm 0,116$). Sin embargo, no se observan diferencias estadísticas entre las 6, 12 y 24 horas de estimulación.

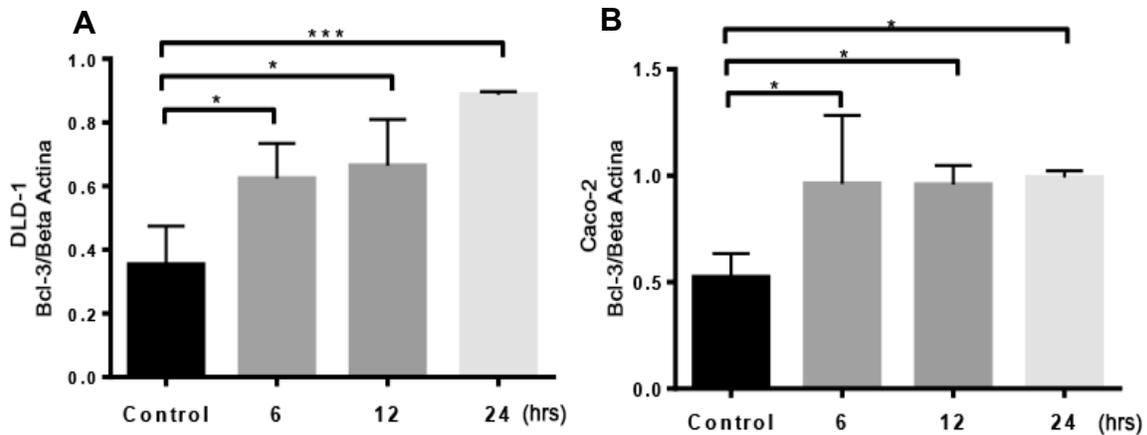


Figura 24: Aumento de la expresión relativa de Bcl-3 en células DLD-1 y Caco-2 estimuladas con Triptasa. Se observan los gráficos correspondientes a los niveles de Bcl-3 en células DLD-1 (A) y Caco-2 (B) estimuladas con triptasa 0,5 µg/ml a las 0, 6, 12 y 24 horas. La unidad relativa representa la proporción Bcl-3/β actina. Resultados expresados como mediana ± D.S. N=3 * $p<0,005$ vs control, ** $p<0,001$, *** $p<0,0001$.

Para comprobar que el efecto inductor de triptasa sobre la expresión de Bcl-3 fue específico, se procedió a estimular *in vitro* células DLD-1 en presencia o ausencia de

Nafamostat mesilato (Fut), un potente inhibidor de serinas proteasas. En la figura 25 se muestra la corrida electroforética obtenida por western blot a las 12 horas de estimulación en presencia de Fut y Triptasa, observándose una disminución de la intensidad de la banda de Bcl-3 a una concentración de 1,2 nM de Fut. Sin embargo, estos resultados no fueron significativos.

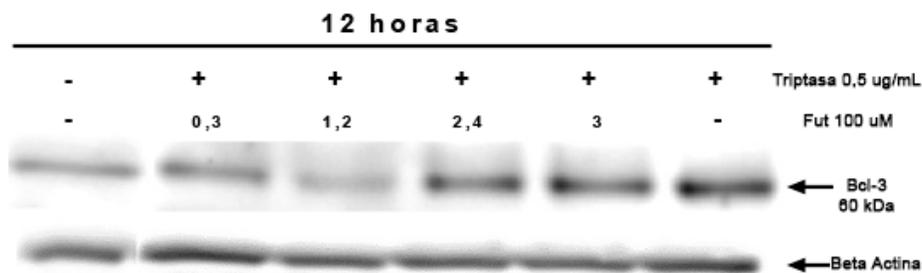


Figura 25: Estimulación con Fut en presencia de Triptasa en células DLD-1 a las 12 horas. Imagen representativa de las bandas obtenidas por western blot, donde se observan los niveles de Bcl-3 (60 kDa) y β actina (47 kDa) en función de distintas concentraciones de Fut.

5.7.2 Determinar si la inducción de Bcl-3, por Triptasa, es mediante la activación del receptor PAR2 en línea celular Caco-2.

Diversos trabajos han reportado que las membranas de las células epiteliales en el intestino expresan PAR-2, receptor que es activado mediante proteólisis por proteasas, entre ellas triptasa. Para comprobar la hipótesis de que triptasa, a través de la activación de PAR-2, induce la expresión de Bcl-3 en el epitelio, se incubaron líneas celulares Caco-2 por 24 horas con un agonista (SLIGKV-NH₂ 100 μ M) y un antagonista selectivo del receptor PAR-2 (FSLRLY-NH₂ 100 μ M) (**Figura 26**).

La **figura 27** muestra la semicuantificación de la densidad óptica de las bandas obtenidas para Bcl-3, resultando en un aumento de la expresión relativa de esta proteína, al estimular con triptasa (Control: $0,01487 \pm 0,005230$; Bcl-3: $0,03812 \pm 0,005760$ $p=0,0075$) y con el agonista de PAR-2 (Bcl-3: $0,03463 \pm 0,009988$ $p=0,0209$) con respecto a la condición control. Se observó una reducción significativa de Bcl-3 tanto al emplear el antagonista de PAR-2 con respecto a triptasa (Bcl-3: $0,008724 \pm 0,00388$ $^{ff}p=0,0014$) y al tratamiento con triptasa sola y triptasa más antagonista (Bcl-3: $0,01320 \pm 0,004561$ $^{ff}p=0,0046$). También se obtuvieron diferencias significativas entre el tratamiento con el antagonista de PAR-2 y triptasa más antagonista de PAR-2 ($^{##}p=0,0127$).

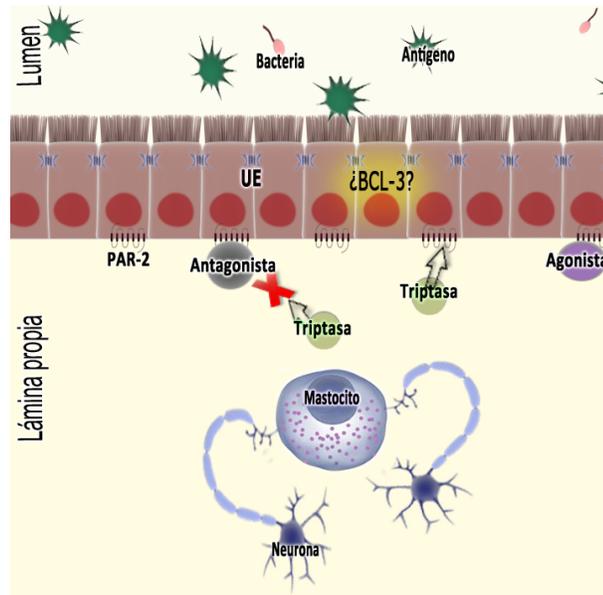


Figura 26: Representación del experimento realizado en células Caco-2. Esquema representativo de la monocapa de células epiteliales que conforman la barrera intestinal. Ante la presencia de un estímulo neuronal, los mastocitos residentes de la lámina propia se activan, secretando diversos mediadores químicos, entre ellos triptasa. Esta proteasa es capaz de activar mediante proteólisis al receptor PAR-2 a nivel basolateral. Se desconoce el efecto de la activación y/o inhibición de PAR-2 sobre la expresión de Bcl-3, por lo que se añadirá Triptasa, agonista y antagonista de PAR-2 a un cultivo celular Caco-2.

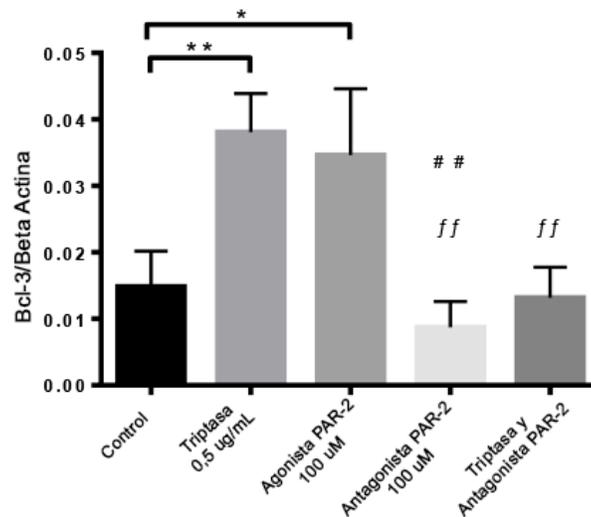


Figura 27: Niveles de Bcl-3, en células Caco-2 estimuladas con Triptasa 0,5 µg/mL, agonista de PAR-2 100 µM (SLIGKV-NH₂) y antagonista de PAR-2 100 µM (FSLRLRY-NH₂) a las 24 horas. Imagen representativa de western blot (A), donde se observan los niveles de Bcl-3 (60 kDa) y β actina (47 kDa). En B) se muestra la cuantificación respectiva. La unidad relativa representa la proporción Bcl-3/β actina. Resultados expresados como mediana ± D.S. N=3. * p<0,05 vs control, **p<0,001.

5.8 Determinar in vitro la alteración de las proteínas de unión estrecha, mediada por estimulación con triptasa, en líneas celulares de epitelio de colon.

La activación del receptor PAR-2 provoca diversas respuestas a nivel intestinal asociadas a la disrupción de la barrera epitelial, tales como, el aumento de la permeabilidad paracelular y el desensamblaje del complejo de proteínas UE. Habiendo demostrado que triptasa induce un aumento en la expresión de Bcl-3 vía PAR-2, se quiso evaluar, mediante IFI, el efecto de la estimulación con triptasa y agonista de PAR-2 sobre la distribución de las proteínas UE, en la línea celular Caco-2.

En la **figura 28** se observan imágenes representativas, obtenidas por microscopía de epifluorescencia, de la inmunodetección de las proteínas UE: ZO-1, Claudina-2 y Ocludina en línea celular Caco-2, al estimular con triptasa y agonista de PAR-2. Las imágenes obtenidas muestran un cambio en el patrón de distribución de las proteínas UE. Para ZO-1 existe una leve disminución en la intensidad de su señal con respecto al control cuando se agrega triptasa y esta diferencia se hace mayor al agregar agonista de PAR-2 (**Figura 28 A-C**). Al evaluar la marca de Claudina-2 se observa un aumento en la intensidad de la señal al agregar triptasa o el agonista, siendo más intenso en esta última (**Figura 28 D-F**). Ocludina, parece comportarse de forma similar a Claudina-2 en cuanto a intensidad de la señal, sin embargo al agregar agonista de PAR-2, se observa una redistribución de la señal a las zonas del núcleo celular que contienen cromatina condensada con respecto a las otras condiciones (**Figura 28 G-I**).

Para confirmar los cambios en la distribución de las proteínas UE, se realizó el mismo experimento de estimulación con triptasa y agonista de PAR-2, registro por microscopía confocal, observándose una disminución de la intensidad de ZO-1 en presencia de triptasa (**Figura 29B**) y una distribución irregular en el borde celular, al agregar agonista de PAR-2 (**Figura 29C**). Además del aumento en la intensidad de la marca de Claudina-2 (**Figura 29E y Figura 29F**), al agregar triptasa y en mayor medida con el agonista de PAR-2, existe una redistribución de la proteína desde el citoplasma a las uniones intercelulares, como también se observa una disminución de la detección de Claudina-2 a nivel nuclear con respecto al control.

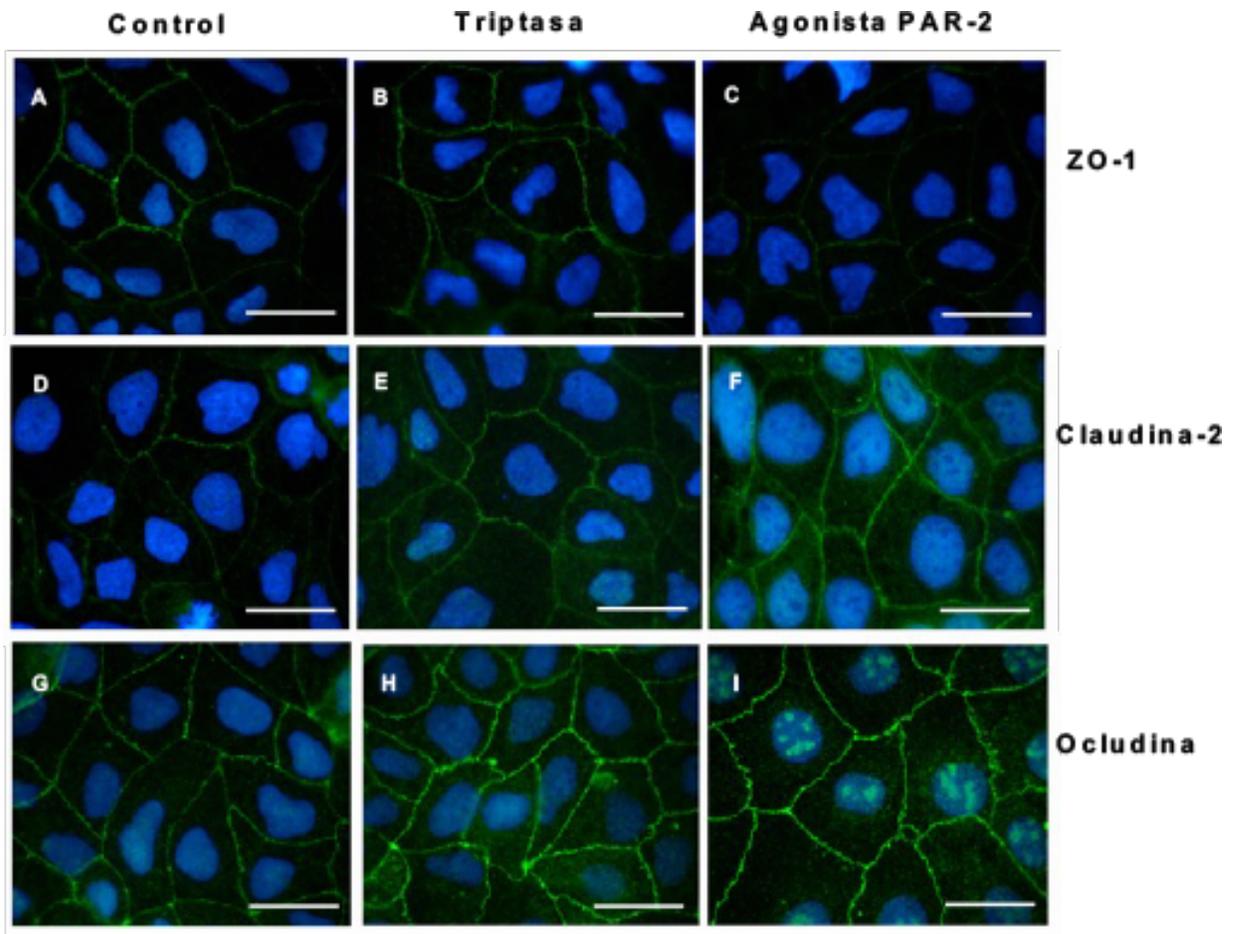


Figura 28: Detección de proteínas UE en línea celular Caco-2 estimuladas con Triptasa 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y agonista de PAR-2 100 μM (SLIGKV-NH₂) por 12 horas. Imagen representativa, donde la señal positiva se observa como una marca verde para ZO-1 (A, B, C), Claudina 2 (D, E, F) y Ocludina (G, H, I) y una tinción azul para los núcleos (DAPI). La primera columna corresponde a las células que no recibieron tratamiento, la siguiente a las que recibieron 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Triptasa y la tercera a células estimuladas con el agonista de PAR-2 (SLIGKV-NH₂). Imágenes obtenidas con un aumento 100X por microscopia de epifluorescencia. Las barras equivalen a 10 μm .

Por último, se utilizó un control positivo de re-localización de proteínas UE. Al emplear un estímulo inflamatorio como TNF- α en células Caco-2 durante 24 horas, se observó una redistribución de las tres proteínas UE a nivel citoplasmático luego de recibir el estímulo inicial (**Figura 30**).

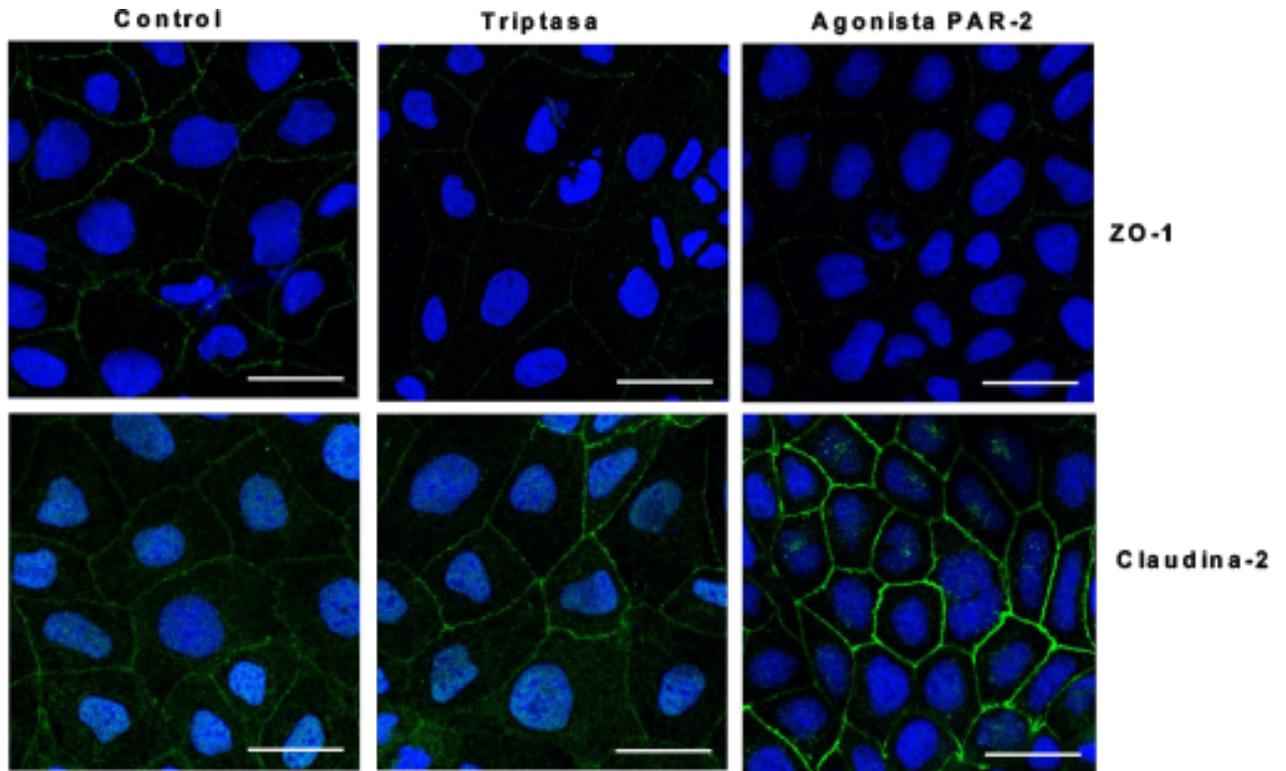


Figura 29: Detección de proteínas UE en línea celular Caco-2 estimuladas con Triptasa 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y agonista de PAR-2 100 μM (SLIGKV-NH2) por 12 horas. Imágenes representativas, donde la señal se observa como una marca positiva verde para ZO-1(A, B, C), Claudina 2 (D, E, F) y una tinción nuclear azul (DAPI). Imágenes obtenidas con un aumento 40X por microscopia confocal. Las barras equivalen a 10 μm .

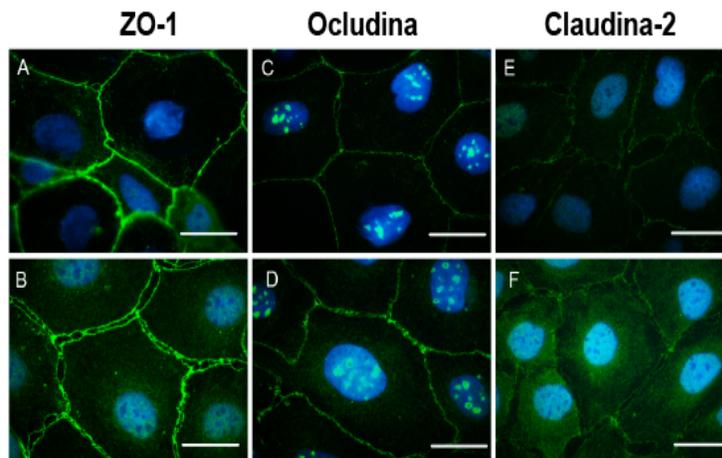


Figura 30: Detección de proteínas de unión estrecha en línea celular Caco-2 estimuladas con TNF- α 50 ng/mL por 24 horas. Imagen representativa de inmunomarcaje, donde la señal se observa como una marca positiva verde para ZO-1 (A-B), Ocludina (C-D), Claudina-2 (E-F) y una tinción nuclear azul (DAPI). En el panel superior (A,C,E) se observan las células sin tratamiento, y en el panel inferior (B,D,F) células estimuladas con TNF- α 50 ng/mL. Imágenes obtenidas con un aumento 100X por microscopia de epifluorescencia. Las barras equivalen a 10 μm .

6. DISCUSIÓN:

El SII se caracteriza por presentar alteraciones de la función de barrera epitelial intestinal asociada a un aumento de la permeabilidad paracelular y a una elevada activación de mastocitos, que conducen a un estado de inflamación de bajo grado en los pacientes. La proteína Bcl-3 es un regulador transcripcional de genes inducidos por la activación de NF- κ B. Factores que participan en la estructura de la UE son regulados por esta vía. En este trabajo se propuso caracterizar el estado de la UE epitelial, los niveles de activación de mastocitos intestinales y la expresión de Bcl-3 en mucosa intestinal de pacientes con SII y SC. Se observó que los pacientes con SII, poseen niveles aumentados de Bcl-3, alteraciones en la estructura de la UE y un mayor número y grado de activación de mastocitos en el intestino. Además, con el fin de profundizar en los mecanismos responsables de los hallazgos observados se propuso evaluar en líneas celulares de epitelio intestinal, si la inducción de Bcl-3 y las alteraciones de la UE, eran producidas por la estimulación con triptasa, mediante la activación de PAR-2. Los resultados de la estimulación *in vitro* indicaron que la expresión de Bcl-3 es inducida por activación específica de triptasa a través de PAR-2, estimulación que indujo además cambios en la expresión de proteínas de la UE. Estos resultados sugieren que el aumento de expresión de Bcl3 en el epitelio en el SII corresponde a un mecanismo de respuesta frente a la alta activación de mastocitos, y que esta respuesta es asociada a cambios en la UE.

Con el propósito de discutir de manera detallada de todos los resultados obtenidos en cada objetivo en este trabajo, la discusión se estructurará siguiendo los siguientes capítulos:

6.1 Niveles aumentados de Bcl-3 en epitelio intestinal de pacientes con SII.

En la patogenia del SII se ha descrito una inflamación de bajo grado evidenciada por un aumento en la activación de células inmunes y niveles elevados de citoquinas pro-inflamatorias^{44, 54, 55}, indicando la existencia de algún mecanismo regulatorio de estos genes inflamatorios.

Bcl-3 es una proteína inmuno-reguladora que actúa como trans-activador o trans-represor de genes dependientes del factor NF- κ B, dependiendo del tipo celular y estímulo

recibido⁵⁶. Los resultados de esta tesis demuestran un aumento en la expresión, tanto del transcrito, como de la proteína de Bcl-3 en mucosa ileal y colónica de pacientes con SII en comparación a SC. Estos hallazgos concuerdan con observaciones previas, en donde niveles aumentados del ARNm de Bcl-3 fueron observados en muestras de mucosa colónica de pacientes con SII irlandeses (anexo 1). Al realizar el análisis de acuerdo a subtipos de SII, se evidenció que el aumento del transcrito de Bcl-3 fue significativamente mayor en mucosa colónica para pacientes con SII-C; con una tendencia de aumento en los niveles proteicos de Bcl-3 en muestras de íleon para SII-C. Estos resultados sugieren que Bcl-3 podría participar diferencialmente en el desarrollo de fenotipos clínicos de los pacientes con SII. Si bien se ha descrito un aumento en los niveles de Bcl-3 en mucosa de colon en pacientes con EII^{42, 57}, se desconoce la función que Bcl-3 estaría ejerciendo en estas condiciones, existiendo diversas evidencias que le atribuyen un rol antiinflamatorio. Estos hallazgos han sido corroborados por un estudio realizado por Haihua L. *et al.*, en el que la administración de *Escherichia coli* enterotoxigénica, en conjunto con *Lactobacillus acidophilus* en un modelo animal, redujo la producción de las citoquinas pro-inflamatorias, debido a la inhibición de las vías de señalización NFκB y MAPK asociada a un aumento de la expresión del transcrito de Bcl-3⁵⁸. Basados en esta evidencia, Collins *et al.*, desarrollaron un péptido antagonista de Bcl-3, capaz de disminuir la expresión de genes que codifican citoquinas pro-inflamatorias en un modelo animal *in vivo*⁵⁹.

La distribución tisular y celular de Bcl-3 fue observada principalmente en el núcleo de las células del epitelio intestinal, en íleon y colon de pacientes con SII. Estudios realizados en macrófagos han descrito, además, una localización nuclear de Bcl-3, asociada a la inhibición de la síntesis de TNF-α inducida por LPS³⁴. Esto sugiere que Bcl-3, en el núcleo de las células epiteliales, podría estar ejerciendo un papel activo en la regulación de la transcripción, activando o reprimiendo genes que están probablemente asociados a la inflamación. Cabe destacar que en nuestras muestras también se observó una alta intensidad de la marca de Bcl-3 en el citoplasma de algunas células epiteliales, de las cuales desconocemos el tipo. El rol de Bcl-3 en este tipo de células, así como su identificación debe ser abordado por futuras aproximaciones experimentales. A su vez, nuestros resultados muestran que no hay cambios significativos en la expresión y distribución nuclear de Bcl-3 en lámina propia de pacientes con SII respecto a SC. Estos resultados se contradicen con lo observado por Reibig S. *et al.*, quienes reportaron una

mayor expresión y distribución de Bcl-3 en el núcleo de las células de la lámina propia de pacientes con EII, siendo identificadas como linfocitos T CD4⁺⁴².

Considerando que la activación de la vía de NF-κB regula la expresión génica de proteínas estructurales de la UE y que Bcl-3 es un regulador de esta vía, el impacto que tiene su aumento sobre la integridad del epitelio intestinal es una pregunta que debe ser resuelta. Los pacientes con SII presentan un aumento de permeabilidad paracelular intestinal asociado a cambios en la estructura de la UE, relacionada a una aumentada expresión, así como a una mayor actividad de la quinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK). Debido a que la expresión de MLCK es inducida por la activación de la vía de NF-κB, el papel regulador de Bcl-3 sobre este mecanismo queda por ser resuelto^{60, 61}.

Durante el desarrollo de esta tesis se emplearon diversas técnicas de análisis para determinar las diferencias de expresión de Bcl-3. Resulta interesante que todas ellas concuerdan en que existieron mayores niveles de esta proteína en mucosa colónica respecto a íleon. Esto sugiere que Bcl-3 cumple roles distintos en cada segmento intestinal en el SII. A nivel del intestino delgado, podría estar ejerciendo un mecanismo de regulación de la inflamación inducida por una alta presencia y activación de células inmunes, mientras que su mayor expresión en colon podría asociarse a mecanismos de reparación tisular, debido a su rol pro-proliferativo^{62,63}

Respecto a la determinación de Bcl-3 mediante western blot, ésta se realizó utilizando un anticuerpo policlonal que identificó tres bandas de distinto peso molecular: una banda principal (60 kDa), seleccionada para la cuantificación de Bcl-3; una banda de mayor y otra de menor peso molecular. Estas últimas bandas podrían corresponder a posibles modificaciones post-traduccionales de la proteína, entre ellas fosforilaciones⁶⁴ y ubiquitinaciones⁶⁵. La importancia de estas modificaciones ha sido evidenciada en estudios realizados por el grupo de Wang V. *et. al.*, quienes describieron que la fosforilación de Bcl-3 por Akt, Erk2 e IKK influye en el metabolismo, estabilidad y la localización de esta proteína en la célula⁴¹. Igualmente, la hipo-fosforilación de Bcl-3 repercute en su actividad al aumentar la interacción con proteínas remodeladoras de la cromatina, entre ellas HDAC-1, HDAC-3 y HDAC-6, lo que sugiere un mecanismo de regulación epigenética ejercido por Bcl-3⁶⁶. Además, la ubiquitinación de Bcl-3 contribuye a la localización intracelular de la proteína. Considerando que el patrón de bandas obtenidas por western blot para Bcl-3, para cada uno de los sujetos estudiados, se comportó de manera heterogénea, con perfiles

de bandas con distintas migraciones, sería interesante caracterizar el patrón de modificaciones post traduccionales para cada paciente y asociar las características clínicas que estos presentan.

En base a los resultados anteriormente expuestos, si bien existe un aumento en la expresión de Bcl-3 en SII, aún es necesario identificar cuales son los estímulos que conducen a este incremento. Entre los mecanismos propuestos está la presencia de abundante factores solubles inflamatorios en la mucosa intestinal de pacientes con SII. El aumento del contenido de triptasa debido a la activación de mastocitos es uno de ellos.

6.2 Aumento del número de mastocitos en pacientes con SII.

El SII se caracteriza por presentar una alteración en la comunicación bidireccional del eje cerebro-intestino, que afecta el grado de activación de las células inmunes en mucosa intestinal. Hasta ahora han existido controversias respecto a la presencia de un mayor número de mastocitos en mucosa de pacientes con SII; sin embargo, se ha llegado a un consenso de que existe un mayor grado de actividad de estas células en el intestino. Nuestros resultados evidenciaron un aumento significativo en el número de mastocitos en pacientes con SII respecto a SC, siendo estas diferencias mayormente significativas en íleon que en colon. Estos hallazgos concuerdan con diversas investigaciones que reportan un aumento en el número de mastocitos en mucosa de pacientes con SII en duodeno⁶⁷, yeyuno⁶⁸, íleon terminal^{43, 69}, colon ascendente⁷⁰, colon distal⁷¹, ciego⁷² y recto⁷³. A diferencia de estos hallazgos, otros investigadores no lograron observar diferencias en el número de mastocitos, incluso evidencian una disminución de estos para los mismos segmentos intestinales analizados^{50, 74}. Además, se han reportado diferencias en la densidad de mastocitos intestinales en función del sexo analizado, siendo las mujeres las que registran mayor número en comparación a hombres⁷⁵. En nuestra población de estudio la gran mayoría de los participantes son del sexo femenino, lo que concuerda con la alta densidad de mastocitos observados en mucosa.

Respecto a la actividad de los mastocitos, nuestros resultados demostraron que los pacientes con SII presentaron un aumento en el porcentaje de degranulación, reflejando un proceso activo de secreción. Similares hallazgos han sido descritos en muestras de yeyuno⁶⁸ y colon⁸. En esta línea, el uso de estabilizadores de mastocitos ha demostrado reducir la sintomatología clínica y mejorar la calidad de vida en pacientes con SII⁷⁶, confirmando el

papel central de esta célula inmune en este desorden. Es preciso señalar que el aumento de la actividad de los mastocitos observado en nuestros pacientes pertenece a mucosa ileal y no colónica. Estos hallazgos pueden ser explicados considerando los antecedentes de la regionalización del sistema inmune en la mucosa intestinal. Esta distribución diferencial respondería a factores ambientales y fisiológicos propios de cada segmento gastrointestinal⁷⁷.

Por otra parte, el análisis de las características ultra estructurales de los mastocitos permitió reconocer la presencia de un patrón típico de una secreción selectiva o *Piece meal degranulation*, en el que se destacan características tales como la presencia de vesículas con pérdida de densidad intragranular, que no presentan fusión entre ellas, conservando sus membranas intactas. Este tipo de degranulación ha sido descrita en respuesta a estimulación nerviosa⁷⁸. Al respecto Bárbara G. *et. al.*, evidenciaron una alta cercanía entre mastocitos y terminaciones nerviosas en muestras de colon distal de pacientes con SII⁸, lo que también fue observado en nuestras muestras de pacientes mediante TEM. Otra característica de los mastocitos que observamos fue la heterogeneidad de su contenido granular, destacándose en mayor cantidad gránulos del tipo cristalóide que, según lo descrito por Whitaker-Menezes D. *et. al.*, contendrían triptasa⁷⁹. La localización cercana de las mitocondrias a los sitios de exocitosis es un signo que evidencia procesos activos de secreción celular. En las muestras de pacientes con SII analizadas fue observado este hallazgo, además de localizar algunas de las mitocondrias en el medio extracelular. El rol de la mitocondria es fundamental en la dinámica de esta célula, ya que el proceso de degranulación es altamente energético⁸⁰. Zhang B. *et. al.*, 2012, de igual forma describieron la presencia de mitocondrias cercanas a mastocitos, detectando que estas células pueden liberar al medio contenidos intra-mitocondriales, capaces de desencadenar un proceso de degranulación y liberación de citoquinas inflamatorias con acción paracrina⁸¹.

En resumen, los pacientes con SII presentaron una mayor infiltración de mastocitos, los cuales se encuentran cercanos a terminaciones nerviosas y que poseen características ultra estructurales de un proceso de degranulación activo, principalmente en mucosa ileal. Al ser triptasa uno de los principales contenidos almacenados en sus gránulos, se procedió a determinar sus niveles en muestras de mucosa intestinal de nuestros sujetos de estudio.

6.3 Contenido de triptasa en mucosa intestinal de pacientes con SII.

Con el propósito de confirmar el aumento del grado de actividad de mastocitos, se determinaron los niveles de triptasa en mucosa intestinal. En este trabajo, no se observaron diferencias en el contenido de triptasa en mucosa intestinal de íleon y de colon, a través de western blot. Además, los niveles de triptasa en SN de cultivo de mucosa intestinal no fueron detectados mediante la técnica de cuantificación empleada, probablemente debido a su bajo límite de detección. Estos resultados están en oposición a lo descrito por diversos grupos de investigación, que reportan un aumento en el contenido y actividad de triptasa en mucosa intestinal para estos pacientes. Las posibles razones por las que creemos que no se observaron cambios entre SC y pacientes con SII son: 1) la mayoría de los estudios que reportan un aumento en la liberación de triptasa, han cuantificado su actividad enzimática en lugar de sus niveles de expresión; 2) debido a que la triptasa es una enzima que posee varias isoformas y glicosilaciones⁸², la cuantificación de ella necesita considerar la especificidad del anticuerpo que se utilice en su detección, siendo heterogénea su determinación en gran parte de los trabajos. Nuestros resultados han sido obtenidos mediante el uso de un anticuerpo monoclonal que reconoce la isoforma β II de triptasa, la principal variante encontrada en los gránulos secretores de los mastocitos. Se observó, por western blot, una alta heterogeneidad de esta isoforma entre las muestras, lo que se tradujo en variaciones en la presentación de patrones de corridas entre las distintas muestras de pacientes. En algunas se detectó una sola banda alrededor de los 30 kDa, intensa y ancha, y en otras muestras dos bandas de distinta intensidad, por lo que cada paciente presentó perfiles distintos. Esta evidencia se suma a lo descrito por Camilieri M. *et. al.*, que afirman que las dificultades en la obtención de marcadores para el SII se debe principalmente a el comportamiento heterogéneo de la respuesta inmune de los pacientes⁸³.

A pesar de que nuestros resultados no fueron concluyentes en el registro de los cambios en el contenido de triptasa, la mayor activación de los mastocitos en nuestros pacientes con SII nos condujo a indagar si el aumento observado de Bcl-3 en el epitelio intestinal podría ser consecuencia de la acción de triptasa en estos pacientes.

6.4 Inducción de Bcl-3 en líneas celulares de epitelio de colon

Para conocer el efecto de triptasa en la expresión de Bcl-3 en el epitelio intestinal, desarrollamos un ensayo *in vitro* utilizando líneas celulares intestinales de colon DLD-1 y

Caco-2, estimuladas con tripsasa. Nuestros resultados muestran un aumento de la expresión proteica de Bcl-3 en ambas líneas celulares de aproximadamente dos veces en un curso temporal de estimulación. Llamó la atención que la respuesta de DLD-1 frente a la estimulación fue mayor que la observada para Caco-2. Este efecto probablemente se deba a diferencias en el origen de estas líneas celulares, siendo DLD-1 un adenocarcinoma colorectal, caracterizado por su estadio tumoral avanzado, metastásico, en comparación a la línea Caco-2, adenocarcinoma colorectal de estadio más temprano, de localización circunscrita a mucosa⁸⁴. Se ha descrito a Bcl-3 como una proteína oncogénica, relacionada con una alta expresión en distintos tipos de cáncer⁸⁵, siendo postulado como marcador de cáncer colorectal⁶³, por lo que diferencias en su niveles de expresión responderían a diferentes estadios proliferativos de estos tipos celulares. Resultados preliminares de nuestro laboratorio detectaron además la expresión de Bcl-3 para otras líneas epiteliales celulares, tanto a nivel basal como después de una estimulación inflamatoria (IL-6) (anexo 4), siendo esta respuesta notoriamente mayor para las células DLD-1. Pese a que estos hallazgos sugieren un grado de susceptibilidad mayor para este tipo celular frente a estímulos inflamatorios, se desconoce el papel que cumpliría Bcl-3 en este contexto.

Un aspecto relevante a destacar en nuestro diseño experimental *in vitro*, es el uso de tripsasa humana recombinante para estimular las líneas celulares. La tripsasa secretada desde los gránulos de los mastocitos se caracteriza por estar almacenada en forma activa, acoplada a heparina. Se ha descrito que la actividad enzimática de tripsasa es dependiente de la presencia de esta glicoproteína⁸⁷. La estabilidad de la tripsasa sin heparina depende de la concentración de NaCl contenido en el vehículo de disolución (prospecto del fabricante), siendo concentraciones superiores a 0,5 M las requeridas⁸⁸. La tripsasa utilizada en este ensayo viene disuelta en una solución de NaCl 2M. Según lo anterior, realizamos ensayos de estimulación con tripsasa en presencia y ausencia de heparina. Nuestros resultados no demostraron diferencias en la inducción de Bcl-3 entre ninguna de las dos condiciones (anexo 5). A partir de esto, los experimentos realizados posteriormente fueron hechos en ausencia de heparina

Si bien hemos observado que tripsasa aumenta la expresión de Bcl-3, desconocemos los mecanismos o receptores involucrados que median esta acción. Entre los receptores que son activados por proteasas destaca PAR-2 en el SII, el que podría estar participando en este mecanismo de inducción.

6.5 Inducción de Bcl-3, en modelos in vitro, mediada por el receptor PAR-2.

Numerosos estudios han demostrado que triptasa activa, mediante proteólisis, a PAR-2, receptor constitutivamente expresado en intestino delgado y colon en sujetos normales⁴⁸ y que en pacientes con SII y EII aumenta su expresión^{89, 90}. Su activación está relacionada con la aparición y desarrollo de manifestaciones clínicas en pacientes con SII, tales como, la hiperalgesia visceral⁹¹ y aumento de la permeabilidad paracelular⁹². En este trabajo, al estimular células Caco-2 con triptasa o agonista de PAR-2 (SLGKIV-NH₂), observamos un aumento significativo de los niveles de la proteína Bcl-3. Esta inducción, en respuesta a triptasa, fue revertida con el uso de un antagonista de PAR-2 (FSLRLY-NH₂) concomitantemente, observándose una disminución significativa de Bcl-3. Por otra parte, la estimulación con el antagonista de PAR-2 por sí mismo no afectó la expresión de Bcl-3, infiriéndose la ausencia de una estimulación basal de este receptor. Por lo tanto, sugerimos que el aumento de los niveles de Bcl-3 en nuestro ensayo son mediados por la activación de PAR-2.

Es preciso señalar que la activación de PAR-2 no es exclusiva de triptasa, existiendo otras proteasas contenidas en el intestino que podrían desencadenar su proteólisis⁹⁴. Recientemente se ha descubierto, que las células epiteliales intestinales poseen actividad proteolítica autóloga. Esta actividad proteolítica ha sido atribuida a tripsina-3, cuya expresión se ha visto aumentada en mucosa intestinal de pacientes con SII. La activación de PAR-2 por Tripsina-3, está asociada a hiperalgesia y a una disminución en la expresión de ZO-1⁹⁵. Otra enzima capaz de activar a PAR-2 es la matriptasa, una proteasa de serina transmembrana que se caracteriza por su disminuida expresión en EII, correlacionada a un aumento de permeabilidad intestinal⁹⁶. Teniendo en consideración las consecuencias de la activación de PAR-2 en epitelio intestinal, sería interesante identificar otros estímulos responsables de su activación y que se relacionen con el desarrollo del SII.

La distribución epitelial de PAR-2 es relevante en el tipo de función fisiológica que este desarrolle. Lau Chang *et. al.*, reportaron que la expresión de un grupo de receptores PAR-2, a nivel apical y basolateral en células epiteliales intestinales. La activación basolateral del receptor se asoció a funciones de reorganización de las proteínas UE, mientras que los efectos de la activación apical parecen estar relacionados con la inducción de genes asociados a proliferación celular⁴⁹. Nuestros ensayos *in vitro* fueron desarrollados en cultivos de monocapas de células Caco-2 que no abordan diferencias

relacionadas a la distribución diferencial del receptor PAR-2 en el epitelio. Por lo que sugerimos trabajar a futuro con cultivos polarizados mediante el uso de cámaras transwell. Por otro lado, si bien se ha reportado que la activación de PAR-2 desencadena una señalización mediada por MAP quinasas, es escasa la información respecto a su rol en la activación de la vía NF- κ B^{97,98}. Es por esto que, deberían realizarse futuras aproximaciones experimentales en las que podamos analizar cuales de las vías mencionadas son responsables del aumento descrito de Bcl-3.

6.6. Evaluación del estado de las proteínas de UE en pacientes con SII.

En el SII se han descrito alteraciones de la barrera epitelial intestinal debido a cambios de la estructura y organización de la UE. Nuestros resultados evidenciaron un patrón de distribución de ZO-1 irregular y difuso en la zona apical del epitelio, principalmente en mucosa ileal de pacientes con SII, a diferencia de los SC en los que se observó una distribución definida de características reticulares, sugerentes de una anormal distribución de esta proteína de anclaje relacionados a cambios en la organización de la UE. Estos hallazgos fueron confirmados con los resultados provenientes de la semi-cuantificación de ZO-1 el que demostró una reducción significativa de sus niveles en el íleon de pacientes con SII, lo que concuerda con lo descrito por otros grupos de investigación los que han observado la disminución de los niveles ZO-1 y una distribución alterada, asociado a una disminución de la resistencia transepitelial en mucosa de pacientes con SII^{17, 20}. Cabe destacar, que los estudios anteriormente mencionados corresponden a mucosa colónica en ausencia de evidencia respecto a íleon. En el presente trabajo no se encontraron diferencias en los niveles de expresión, ni en la distribución, de ZO-1 en muestras de mucosa colónica entre ambos grupos de estudio. Si bien se ha visto una disminución en los niveles de ZO-1 a nivel de yeyuno⁹⁹, este es el primer trabajo en reportar alteraciones de la distribución y expresión de ZO-1 en muestras de íleon de pacientes con SII. En esta misma línea, nuestros análisis de ultraestructura mediante TEM nos evidenciaron un aumento significativo en las distancias intercelulares apicales, correspondientes al complejo de UE, en muestras de mucosa ileal de pacientes con SII. Cabe destacar que nuestros hallazgos observados en íleon concuerdan con el registro de un aumento en el número y actividad de mastocitos en este mismo segmento intestinal, en estos mismos pacientes, lo que sugiere un papel relevante de los mastocitos sobre el estado de la UE del epitelio ileal. En este sentido, Jacob et al, describió que los mastocitos, afectan

la expresión y distribución de proteínas de la UE, entre ellas ZO-1, mediante la activación de PAR-2¹⁰⁰. Los resultados obtenidos en este trabajo, demuestran la presencia de alteraciones en la estructura del complejo de la UE a nivel de intestino delgado, por lo que futuros estudios dirigidos a evaluar la permeabilidad paracelular intestinal en el SII en este segmento intestinal deberían ser abordados.

Otra de las proteínas UE analizadas en este estudio fue ocludina, a través de western blot; sin embargo, no registramos diferencias entre pacientes y SC para ambas porciones intestinales. Una posible explicación a estos resultados podría ser el bajo número de muestras analizadas en este ensayo. Resultados similares fueron obtenidos por Piche T. *et. al.* y Coeffier M. *et.al.*, quienes no reportaron cambios en los niveles de transcrito de ocludina en muestras de colon^{17, 101}. Sin embargo, Coeffier M. *et.al.*, observaron una disminución en los niveles proteicos de esta proteína en mucosa colónica de pacientes con SII, debido a una mayor degradación proteosomal de esta proteína. Martínez C. *et. al.*, evaluaron las diferencias en el grado de fosforilación de ocludina en muestras de yeyuno de pacientes con SII, observando una disminución de los niveles de ocludina fosforilada, en comparación con SC. Esto es relevante ya que es la forma fosforilada de ocludina la que está asociada al complejo de UE, cuya unión determina la permeabilidad paracelular epitelial¹⁰². Los resultados obtenidos en nuestras determinaciones no fueron dirigidos a evaluar la presencia de ocludina fosforilada, por lo que se debería determinar en un futuro, el estado de esta y otras modificaciones post-traduccionales, así como su localización intracelular en mucosa intestinal de pacientes con SII.

Una proteína integral de membrana que participa en la estructura de la UE, es la claudina-2, la que a través de su interacción con otras claudinas forma un canal iónico en la UE, capaz de regular la permeabilidad de cationes y agua. Aumento de la expresión de claudina-2 en mucosa han sido observadas en el SII⁹⁹. En nuestras determinaciones no logramos detectar la expresión de claudina-2 mediante western blot, probablemente debido a dificultades técnicas relacionadas con los métodos de extracción proteica, condiciones de transferencia necesarias para la detección de su bajo peso molecular, entre otras. Debido a esto, evaluamos la expresión de claudina-2 mediante IFI, observándose una localización intracelular citoplasmática en el epitelio mucosa ileal de SII, en comparación con su presencia apical para los SC. En colon, el inmunomarcaje para claudina-2 evidenció un patrón inverso al observado en íleon, localizándose a nivel apical en pacientes con SII y

citoplasmático en SC. Cabe destacar que recientemente se reportó un aumento de la expresión de transcrito de claudina-2 en en íleon de pacientes con SII-D, sin visualizar cambios en la distribución epitelial entre pacientes y controles¹⁰³. Estudios *in vitro*, realizados en líneas celulares de epitelio intestinal confirman estos hallazgos, debido a que se observa un aumento en la expresión de claudina-2 en respuesta a estimulación con IL-6 asociada a una disminución de TER y aumento de la permeabilidad paracelular, respuesta dependiente de la acción y unión al promotor del gen del factor de transcripción Cdx2 (Caudal Type Homeo Box Transcription Factor 2) activado por la vía ERK y PI3K¹⁰⁴. Cabe destacar que nuestros resultados preliminares han demostrado que células epiteliales intestinales aumentan la expresión de Bcl-3 en respuesta IL-6. Experimentos posteriores que permitan determinar el rol de Bcl-3 en la modulación de la expresión de claudina-2 deberían ser abordados.

6.7 Evaluación del efecto de triptasa sobre las proteínas de UE

Al evaluar *in vitro* el efecto de triptasa sobre la expresión y distribución de las proteínas de UE, logramos evidenciar, de forma cualitativa, una disminución en la expresión de ZO-1, así como un aumento de claudina-2 y ocludina en la superficie de la células epiteliales intestinales. Estos hallazgos concuerdan con lo descrito en otras investigaciones, donde se ha reportado una disminución de ZO-1 en respuesta a la estimulación con triptasa, asociada a un aumento de la permeabilidad¹⁰⁵. Hasta ahora no existen otros trabajos que reporten el efecto de triptasa sobre la expresión de Claudina-2 y Ocludina. Con respecto a los cambios en la distribución de las proteínas de UE en el epitelio inducidos por triptasa, nosotros observamos una disminución de la localización de ZO-1 en la membrana (inmuno-tinción irregular y difusa) en Caco-2 sugerente de un cambio en su localización intracelular. Se destaca que esta forma de distribución se asemeja a lo observado en mucosa ileal de pacientes con SII. Similares cambios fueron evidenciados para claudina-2, detectándose una distribución desde el citoplasma hacia la membrana. Para la ocludina, se registró una intensidad de la señal aumentada en áreas de contacto entre células y células además de una distribución condensada en ciertas áreas del núcleo celular. Se ha descrito que ocludina es un regulador de la progresión del ciclo celular a nuclear, por lo que la localización observada frente a estimulación con triptasa podría evidenciar esta acción¹⁰⁶. Similar expresión y distribución de las proteínas de UE anteriormente descritas, fueron observados con el uso de agonista de PAR-2, siendo estos más pronunciados.

La participación de Bcl-3 en estos mecanismos de inducción o relocalización de las proteínas de UE en respuesta a triptasa es desconocido. Nuestros diseños experimentales sólo nos permitieron inferir un posible papel de Bcl-3 como regulador del complejo de la UE. Se deberían efectuar futuras determinaciones dirigidas a evaluar el mecanismo específico en el que Bcl-3 podría estar implicado en las alteraciones de las proteínas de UE.

En la tabla 7, se muestra un resumen comparativo de los resultados obtenidos entre pacientes con SII y SC. Se destaca que los principales cambios fueron observados para íleon en comparación al colon, lo que sugiere que los procesos fisiopatológicos de este trastorno funcional se presentan principalmente en intestino delgado. Considerando que este síndrome es conocido popularmente como “colon irritable”, cabe ahora la pregunta si deberíamos cambiar a “intestino delgado irritable”.

Tabla 7: Resumen de los resultados obtenidos en la caracterización de los pacientes con SII

Parámetro medido	Íleon	Colon
Expresión de Bcl-3	Aumento	Aumento
Expresión de Triptasa	Sin cambios	Sin cambios
Expresión ZO-1	Diminución	Sin cambios
Expresión Ocludina	Sin cambios	Sin cambios
Distancia intercelular de la UE	Aumento	Sin cambios
Número de mastocitos	Aumento	Aumento
Activación de mastocitos	Aumento	Sin cambios

7. CONCLUSIÓN:

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo podemos concluir que:

Se confirma la hipótesis de que los pacientes con SII presentan aumento de Bcl-3, un mayor número y actividad de mastocitos, y alteraciones en la estructura de la UE, en comparación a los SC. En pacientes con SII el aumento de la expresión de Bcl-3 fue observado en el epitelio intestinal, cuyas alteraciones al estado de la UE fue evidenciado con un aumento en el grado de apertura del complejo de UE y disminuida expresión, así como una distribución intracelular difusa, con pérdida de localización apical, de ZO-1. Cabe destacar que estos cambios se observaron principalmente en íleon y no en colon.

El aumento de actividad de mastocitos en el SII condujo a evaluar *in vitro* el efecto de la triptasa sobre la inducción de la expresión Bcl-3 en líneas celulares. Se pudo comprobar que la segunda hipótesis fue verdadera, ya que la expresión de Bcl-3 fue inducida por la activación de PAR-2 mediante la triptasa, efecto revertido al emplear un antagonista de este receptor. Además triptasa, mediante PAR2, indujo alteraciones de la UE evidenciada en una distribución alterada de ZO-1, Claudina-2 y Ocludina. Estas aproximaciones realizadas *in vitro* conducen a evaluar, en estudios futuros, los posibles mecanismos que relacionen el aumento de la expresión de Bcl-3 con alteraciones en la estructura de la UE epitelial.

8. REFERENCIAS:

1. Enck P, Aziz Q, Barbara G, Farmer AD, Fukudo S, Mayer EA, Niesler B, Quigley EM, Rajilić-Stojanović M, Schemann M, Schwiller-Kiuntke J, Simren M, Zipfel S, Spiller RC. Irritable bowel syndrome. *Nat Rev Dis Primers*. 2016 Mar 24;2:16014.
2. Madrid AM, Defilippi C, Landskron G, Olgún F, Reyes A, Castro A, Larraín S, Martínez N, Cortés J. Prevalencia del síndrome de intestino irritable en población chilena: Estudio preliminar. *Gastr Latinoam* 2005;392.
3. Mearin F, Lacy BE, Chang L, Chey WD, Lembo AJ, Simren M, Spiller R. Bowel Disorders. *Gastroenterology*. 2016 Feb 18.
4. Masion-Bergemann S, Thielecke F, Abel F, Bergemann R. Costs of irritable bowel syndrome in the UK and US. *Pharmacoeconomics*. 2006;24(1):21-37.
5. Barbara G, Stanghellini V. Biomarkers in IBS: when will they replace symptoms for diagnosis and management? *Gut* 2009;58:1571-5.
6. Vork L WZ, Mujagic Z, Kruimel JW, Hesselink MAM, Muris JWM, Keszthelyi D, Jonkers DMAE, Masclee AAM. Rome III vs Rome IV criteria for irritable bowel syndrome: A comparison of clinical characteristics in a large cohort study. *Neurogastroenterol Motil*. 2017.
7. Ohman L, Simren M. Pathogenesis of IBS: role of inflammation, immunity and neuroimmune interactions. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;7:163-73.
8. Barbara G, Stanghellini V, De Giorgio R, Cremon C, Cottrell GS, Santini D, Pasquinelli G, Morselli-Labate AM, Grady EF, Bunnett NW, Collins SM, Corinaldesi R. Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*. 2004 Mar;126(3):693-702.
9. Martínez C, González-Castro A, Vicario M, Santos J. Cellular and molecular basis of intestinal barrier dysfunction in the irritable bowel syndrome. *Gut Liver*. 2012 Jul;6(3):305-15.
10. Camilleri M, Madsen K, Spiller R, Greenwood-Van Meerveld B, Verne GN. Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. *Neurogastroenterol Motil*. 2012 Jun;24(6):503-12.
11. Miron N CV. Enterocytes: active cells in tolerance to food and microbial antigens in the gut. *Clin Exp Immunol*. 2012;167:405-12.
12. Blumberg RS LW, Zhu X, Kim HS, Claypool S, Balk SP, Saubermann LJ, SP. C. Antigen presentation by intestinal epithelial cells. *Immunol Lett*. 1999;15:7-11.
13. Kunisawa J, Kiyono H. Immune regulation and monitoring at the epithelial surface of the intestine. *Drug Discov Today* 2013;18:87-92.
14. Suzuki T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell Mol Life Sci* 2013;70:631-59.
15. Ménard S C-BN, Heyman M. Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of dietary antigens. *Mucosal Immunol* 2010;3:247-59.
16. Zhou Q, Verne GN. New insights into visceral hypersensitivity--clinical implications in IBS. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011;8:349-55.
17. Piche T, Barbara G, Aubert P, Bruley des Varannes S, Dainese R, Nano JL, Cremon C, Stanghellini V, De Giorgio R, Galmiche JP, Neunlist M. Impaired intestinal barrier integrity in the colon of patients with irritable bowel syndrome: involvement of soluble mediators. *Gut*. 2009 Feb;58(2):196-201.
18. Martínez C, Vicario M, Ramos L, Lobo B, Mosquera JL, Alonso C, Sánchez A, Guilarte M, Antolín M, de Torres I, González-Castro AM, Pigrau M, Saperas E, Azpiroz F, Santos J. The jejunum of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome shows molecular alterations in the tight junction signaling pathway that are associated with mucosal pathobiology and clinical manifestations. *Am J Gastroenterol*. 2012 May;107(5):736-46.

19. Coëffier M, Gloro R, Boukhattala N, Aziz M, Lecleire S, Vandaele N, Antonietti M, Savoye G, Bôle-Feysot C, Déchelotte P, Reimund JM, Ducrotté P. Increased proteasome-mediated degradation of occludin in irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol.* 2010 May;105(5):1181-8.
20. Bertiaux-Vandaële N, Youmba SB, Belmonte L, Lecleire S, Antonietti M, Gourcerol G, Leroi AM, Déchelotte P, Ménard JF, Ducrotté P, Coëffier M. The expression and the cellular distribution of the tight junction proteins are altered in irritable bowel syndrome patients with differences according to the disease subtype. *Am J Gastroenterol.* 2011 Dec;106(12):2165-73.
21. Zhou Q SW, Croce CM, Verne GN. MicroRNA-29a regulates intestinal membrane permeability in patients with irritable bowel syndrome. *Gut.* 2010;59:775-84.
22. Martínez C R-JB, Lobo B, Stanifer ML, Klaus B, Granzow M,, González-Castro AM S-RE, Alonso-Cotoner C, Pigrau M, Roeth R, Rappold , G HW, González-Silos R, Lorenzo J, de Torres I, Azpiroz F, Boulant S,, et al. miR-16 and miR-125b are involved in barrier function dysregulation through the modulation of claudin-2 and cingulin expression in the jejunum in IBS with diarrhoea. *Gut.* 2017;66:1537-1538.
23. Ma TY, Iwamoto GK, Hoa NT, Akotia V, Pedram A, Boivin MA, Said HM. TNF-alpha-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF-kappa B activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004 Mar;286(3):G367-76.
24. Suzuki T, Yoshinaga N, Tanabe S. Interleukin-6 (IL-6) regulates claudin-2 expression and tight junction permeability in intestinal epithelium. *J Biol Chem* 2011;286:31263-71.
25. TD G. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene.* 2006;25:6680-4.
26. Zheng C YQ, Wu H. Structural studies of NF-κB signaling. *Cell Research* 2011;21:183-195.
27. Wullaert A, Bonnet MC, Pasparakis M. NF-kappaB in the regulation of epithelial homeostasis and inflammation. *Cell Res* 2011;21:146-58.
28. Tang Y, Clayburgh DR, Mittal N, Goretsky T, Dirisina R, Zhang Z, Kron M, Ivancic D, Katzman RB, Grimm G, Lee G, Fryer J, Nusrat A, Turner JR, Barrett TA. Epithelial NF-kappaB enhances transmucosal fluid movement by altering tight junction protein composition after T cell activation. *Am J Pathol.* 2010 Jan;176(1):158-67.
29. Nenci A, Becker C, Wullaert A, Gareus R, van Loo G, Danese S, Huth M, Nikolaev A, Neufert C, Madison B, Gumucio D, Neurath MF, Pasparakis M. Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. *Nature.* 2007 Mar 29;446(7135):557-61.
30. Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J. Activation of nuclear factor kappa B in inflammatory bowel disease. *Gut* 1998;42:477-84.
31. Shibata W, Maeda S, Hikiba Y, Yanai A, Ohmae T, Sakamoto K, Nakagawa H, Ogura K, Omata M. Cutting edge: The IkappaB kinase (IKK) inhibitor, NEMO-binding domain peptide, blocks inflammatory injury in murine colitis. *J Immunol* 2007;179:2681-5.
32. Inoue J TT, Akizawa T, Hino O. Bcl-3, a member of the I kappa B proteins, has distinct specificity towards the Rel family of proteins. *Oncogene* 1993;8:2067-73.
33. Carmody RJ, Ruan Q, Palmer S, Hilliard B, Chen YH. Negative regulation of toll-like receptor signaling by NF-kappaB p50 ubiquitination blockade. *Science.* 2007 Aug 3;317(5838):675-8.
34. Kuwata H, Watanabe Y, Miyoshi H, Yamamoto M, Kaisho T, Takeda K, Akira S. IL-1 inducible Bcl-3 negatively regulates LPS-induced TNF-alpha production in macrophages. *Blood.* 2003 Dec 1;102(12):4123-9.

35. Bours V, Franzoso G, Azarenko V, Park S, Kanno T, Brown K, Siebenlist U. The oncoprotein Bcl-3 directly transactivates through kappa B motifs via association with DNA-binding p50B homodimers. *Cell*. 1993 Mar 12;72(5):729-39.
36. Brasier AR, Lu M, Hai T, Lu Y, Boldogh I. NF-kappa B-inducible BCL-3 expression is an autoregulatory loop controlling nuclear p50/NF-kappa B1 residence. *J Biol Chem*. 2001 Aug 24;276(34):32080-93.
37. Walker T, Adamson A, Jackson DA. BCL-3 attenuation of TNFA expression involves an incoherent feed-forward loop regulated by chromatin structure. *PLoS One* 2013;8:e77015.
38. Brocke-Heidrich K, Ge B, Cvijic H, Pfeifer G, Löffler D, Henze C, McKeithan TW, Horn F. BCL3 is induced by IL-6 via Stat3 binding to intronic enhancer HS4 and represses its own transcription. *Oncogene*. 2006 Nov 23;25(55):7297-304.
39. Richard M, Louahed J, Demoulin JB, Renaud JC. Interleukin-9 regulates NF-kappaB activity through BCL3 gene induction. *Blood*. 1999 Jun 15;93(12):4318-27.
40. Palmer S, Chen YH. Bcl-3, a multifaceted modulator of NF-kappaB-mediated gene transcription. *Immunol Res* 2008;42:210-8.
41. Wang VY LY, Kim D, Zhong X, Du Q, Ghassemian M, Ghosh G Bcl3 Phosphorylation by Akt, Erk2, and IKK Is Required for Its Transcriptional Activity. *Moll Cell* 2017;67:484-497.
42. Reißig S TY, Nikolaev A, Gerlach K, Wolf C, Davari K, Gallus C, Masri J, , Mufazalov IA NM, Wunderlich FT, Schattenberg JM, Galle PR, Weigmann B,, Waisman A GE, Hövelmeyer N. . Elevated levels of Bcl-3 inhibits Treg development and function resulting in spontaneous colitis. *Nat Commun* 2017;28:15069.
43. O'Sullivan M, Clayton N, Breslin NP, Harman I, Bountra C, McLaren A, O'Morain CA. Increased mast cells in the irritable bowel syndrome. *Neurogastroentero Motil*. 2000 Oct;12(5):449-57.
44. Ohman L, Isaksson S, Lindmark AC, Posserud I, Stotzer PO, Strid H, Sjövall H, Simrén M. T-cell activation in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol*. 2009 May;104(5):1205-12.
45. Liebrechts T, Adam B, Bredack C, Röth A, Heinzl S, Lester S, Downie-Doyle S, Smith E, Drew P, Talley NJ, Holtmann G. Immune activation in patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*. 2007 Mar;132(3):913-20.
46. Galli SJ, Grimaldeston M, Tsai M. Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nat Rev Immunol* 2008;8:478-86.
47. Overman EL, Rivier JE, Moeser AJ. CRF induces intestinal epithelial barrier injury via the release of mast cell proteases and TNF-alpha. *PLoS One* 2012;7:e39935.
48. Vergnolle N. Clinical relevance of proteinase activated receptors (par) in the gut. *Gut* 2005;54:867-74.
49. Lau C LC, Straus DS, DeFea KA. Apical and basolateral pools of proteinase-activated receptor-2 direct distinct signaling events in the intestinal epithelium. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 2011;300:C113-C123.
50. Cenac N, Andrews CN, Holzhausen M, Chapman K, Cottrell G, Andrade-Gordon P, Steinhoff M, Barbara G, Beck P, Bunnett NW, Sharkey KA, Ferraz JG, Shaffer E, Vergnolle N. Role for protease activity in visceral pain in irritable bowel syndrome. *J Clin Invest*. 2007 Mar;117(3):636-47.
51. Lee JW, Park JH, Park DI, Park JH, Kim HJ, Cho YK, Sohn CI, Jeon WK, Kim BI. Subjects with diarrhea-predominant IBS have increased rectal permeability responsive to tryptase. *Dig Dis Sci*. 2010 Oct;55(10):2922-8.
52. Gecse K, Róka R, Ferrier L, Leveque M, Eutamene H, Cartier C, Ait-Belgnaoui A, Rosztóczy A, Izbéki F, Fioramonti J, Wittmann T, Bueno L. Increased faecal serine protease activity in diarrhoeic IBS patients: a colonic luminal factor impairing colonic permeability and sensitivity. *Gut*. 2008 May;57(5):591-9.

53. Chang L. The role of stress on physiologic responses and clinical symptoms in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2011;140:761-5.
54. Dinan TG, Quigley EM, Ahmed SM, Scully P, O'Brien S, O'Mahony L, O'Mahony S, Shanahan F, Keeling PW. Hypothalamic-pituitary-gut axis dysregulation in irritable bowel syndrome: plasma cytokines as a potential biomarker? *Gastroenterology*. 2006 Feb;130(2):304-11.
55. Dinan TG, Clarke G, Quigley EM, Scott LV, Shanahan F, Cryan J, Cooney J, Keeling PW. Enhanced cholinergic-mediated increase in the pro-inflammatory cytokine IL-6 in irritable bowel syndrome: role of muscarinic receptors. *Am J Gastroenterol*. 2008 Oct;103(10):2570-6.
56. Nolan GP FT, Bhatia K, Huppi C, Liou HC, Scott ML, Baltimore D. The bcl-3 proto-oncogene encodes a nuclear I kappa B-like molecule that preferentially interacts with NF-kappa B p50 and p52 in a phosphorylation-dependent manner. *Mol Cell Biol*. 1993;13:3557-66.
57. O'Carroll C, Moloney G, Hurley G, et al. Bcl-3 deficiency protects against dextran-sodium sulphate-induced colitis in the mouse. *Clinical and Experimental Immunology*. 2013;173(2):332-342.
58. Li H ZL, Chen L, Zhu Q, Wang W, Qiao J. *Lactobacillus acidophilus* alleviates the inflammatory response to enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 via inhibition of the NF- κ B and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways in piglets. *BMC Microbiol* 2016;16:273.
59. Collins PE GG, Colleran A, Kiely PA, Ialenti A, Maffia P, Carmody RJ. Mapping the Interaction of B Cell Leukemia 3 (BCL-3) and Nuclear Factor Kb (NF- κ B) p50 Identifies a BCL-3-mimetic Anti-inflammatory Peptide. *J Biol Chem* 2015;290:15687-96.
60. Ma TY BM, Ye D, Pedram A, Said HM. Mechanism of TNF- α modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier: role of myosin light-chain kinase protein expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;288:G422-30.
61. Ye D MI, Ma TY. Molecular mechanism of tumor necrosis factor- α modulation of intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G496-504.
62. Kashatus D CP, Baldwin AS. Expression of the Bcl-3 proto-oncogene suppresses p53 activation. *Genes & Development* 2006;20:225-235.
63. Saamarthy K BS, Johansson M, Landberg G, Massoumi R, Jirström K, Masoumi KC. Early diagnostic value of Bcl-3 localization in colorectal cancer. *BMC Cancer* 2015;1:341.
64. Viatour P, Dejardin E, Warnier M, Lair F, Claudio E, Bureau F, Marine JC, Merville MP, Maurer U, Green D, Piette J, Siebenlist U, Bours V, Chariot A. GSK3-mediated BCL-3 phosphorylation modulates its degradation and its oncogenicity. *Mol Cell*. 2004 Oct 8;16(1):35-45.
65. Massoumi R CK, Hennecke K, Pfeifer A, Fässler R. Cyld inhibits tumor cell proliferation by blocking Bcl-3-dependent NF-kappaB signaling. *Cell*. 2006;125:665-77.
66. Jamaluddin M CS, Wang S, Casola A, Huda R, Garofalo RP, Ray S, AR B. Respiratory syncytial virus-inducible BCL-3 expression antagonizes the STAT/IRF and NF-kappaB signaling pathways by inducing histone deacetylase 1 recruitment to the interleukin-8 promoter. *J Virol* 2005;79:15302-13.
67. Walker MM TN, Prabhakar M, Pennaneac'h CJ, Aro P, Ronkainen J, Storskrubb T HW, Zinsmeister AR, Agreus L. Duodenal mastocytosis, eosinophilia and intraepithelial lymphocytosis as possible disease markers in the irritable bowel syndrome and functional dyspepsia. *Aliment Pharmacol Ther* 2009;29:765-73.
68. Guilarte M, Santos J, de Torres I, et al. Diarrhoea-predominant IBS patients show mast cell activation and hyperplasia in the jejunum. *Gut*. 2007;56(2):203-209.

69. Wang SH DL, Luo JY, Gong J, Li L, Lu XL, Han SP. Decreased expression of serotonin in the jejunum and increased numbers of mast cells in the terminal ileum in patients with irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 2007;13:6041-7.
70. Park JH RP, Kim HS, Lee JH, Kim YH, Kim JJ, Rhee JC. Mucosal mast cell counts correlate with visceral hypersensitivity in patients with diarrhea predominant irritable bowel syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21:71-8.
71. Cremon C, Carini G, Wang B, Vasina V, Cogliandro RF, De Giorgio R, Stanghellini V, Grundy D, Tonini M, De Ponti F, Corinaldesi R, Barbara G. Intestinal serotonin release, sensory neuron activation, and abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol*. 2011 Jul;106(7):1290-8.
72. Vivinus-Nébot M, Dainese R, Anty R, Saint-Paul MC, Nano JL, Gonthier N, Marjoux S, Frin-Mathy G, Bernard G, Hébuterne X, Tran A, Theodorou V, Piche T. Combination of allergic factors can worsen diarrheic irritable bowel syndrome: role of barrier defects and mast cells. *Am J Gastroenterol*. 2012 Jan;107(1):75-81.
73. Dunlop SP, Jenkins D, Spiller RC. Distinctive clinical, psychological, and histological features of postinfective irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2003;98:1578-83.
74. Wang LH, Fang XC, Pan GZ. Bacillary dysentery as a causative factor of irritable bowel syndrome and its pathogenesis. *Gut* 2004;53:1096-101.
75. Cremon C, Gargano L, Morselli-Labate AM, Santini D, Cogliandro RF, De Giorgio R, Stanghellini V, Corinaldesi R, Barbara G. Mucosal immune activation in irritable bowel syndrome: gender-dependence and association with digestive symptoms. *Am J Gastroenterol*. 2009 Feb;104(2):392-400.
76. Klooker TK, Braak B, Koopman KE, Welting O, Wouters MM, van der Heide S, Schemann M, Bischoff SC, van den Wijngaard RM, Boeckxstaens GE. The mast cell stabiliser ketotifen decreases visceral hypersensitivity and improves intestinal symptoms in patients with irritable bowel syndrome. *Gut*. 2010 Sep;59(9):1213-21.
77. Mowat AM, Agace WW. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol* 2014;14:667-85.
78. Wouters MM, Vicario M, Santos J. The role of mast cells in functional GI disorders. *Gut* 2016;65:155-68.
79. Whitaker-Menezes D SN, Murphy GF. Serine proteinases are regionally segregated within mast cell granules. *Lab Invest* 1995;72:34-41.
80. Chen HY CD, Lin ZJ, Hsieh CC, Yin GC, Weng IC, Guttermann P, Werner S., Henzler K SG, Lai LJ, Liu FT. Nanoimaging granule dynamics and subcellular structures in activated mast cells using soft X-ray tomography. *Sci Rep* 2016;17:34879.
81. Zhang B AS, Weng Z, Sismanopoulos N, Theoharides TC. Stimulated human mast cells secrete mitochondrial components that have autocrine and paracrine inflammatory actions. *PLoS One* 2012;7:e49767.
82. Little SS JD. Human mast cell tryptase isoforms: separation and examination of substrate-specificity differences. *Biochem J* 1995;307:341-6.
83. Camilleri M HH, Oduyebo I. Biomarkers as a diagnostic tool for irritable bowel syndrome: where are we? . *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2017;11:303-316.
84. Machado Pineda M, Rodríguez Fernández, Zenén, González Tuero, Jaime Humberto, & Rodríguez Ramírez, Rafael. Relación diagnóstico y supervivencia en el cáncer de colon. *MEDISAN* 2011;15:1566.
85. Maldonado V M-ZJ. Role of Bcl-3 in solid tumors. *Mol Cancer* 2011;10:152.
86. Lu YX JH, Wang F, Chen LZ, Wu QN, Sheng H, Mo HY, Pan ZZ, Xie D, Kang TB, , Chen G YJ, Zeng ZL, Xu RH. Inhibition of the NF- κ B pathway by nafamostat mesilate suppresses colorectal cancer growth and metastasis. *Cancer Lett* 2016;380:87-97.

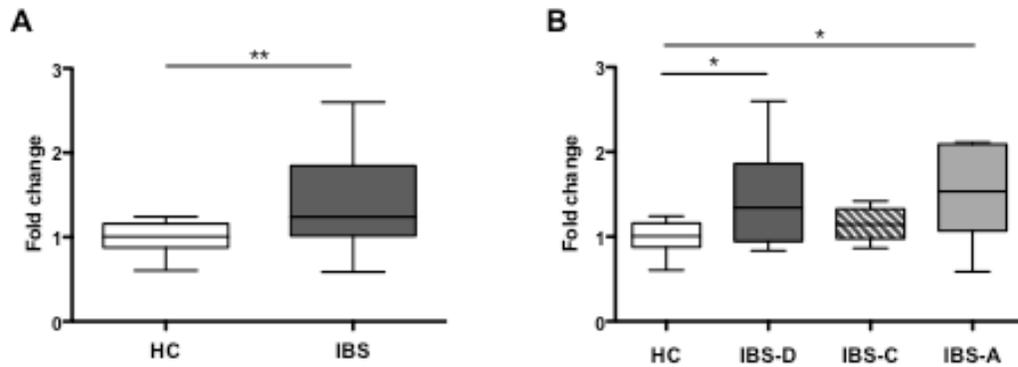
87. Hallgren J LS, Pejler G. Structural requirements and mechanism for heparin-dependent activation and tetramerization of human betaI- and betaII-tryptase. *J Mol Biol* 2005;345:129-39.
88. Alter SC MD, Bradford TR, Schwartz LB. Regulation of human mast cell tryptase. Effects of enzyme concentration, ionic strength and the structure and negative charge density of polysaccharides. *Biochem J* 1987;248:821-7.
89. Liang WJ ZG, Luo HS, Liang LX, Huang D, Zhang FC. Tryptase and Protease-Activated Receptor 2 Expression Levels in Irritable Bowel Syndrome. *Gut Liver* 2016;10:382-90.
90. Kim JA CS, Yun KJ, Kim DK, Han MK, Seo GS, Yeom JJ, Kim TH, Nah YH, Lee , YM. Expression of protease-activated receptor 2 in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2003;9:224-9.
91. Valdez-Morales EE OJ, Guerrero-Alba R, Ochoa-Cortes F, Ibeakanma, CO SI, Bunnett NW, Beyak M, Vanner SJ. Sensitization of peripheral sensory nerves by mediators from colonic biopsies of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome patients: a role for PAR2. *Am J Gastroenterol* 2013; 108:1634-43.
92. Cenac N CA, Garcia-Villar R, Salvador-Cartier C, Ferrier L, Vergnolle N,, Buret AG FJ, Bueno L. PAR2 activation alters colonic paracellular permeability in mice via IFN-gamma-dependent and -independent pathways. *J Physiol* 2004;558:913-25.
93. McLarty JL MG, Brower GL, Janicki JS, Levick SP. Tryptase/Protease-activated receptor 2 interactions induce selective mitogen-activated protein kinase signaling and collagen synthesis by cardiac fibroblasts. *Hypertension* 2011;58:264-70.
94. Compton SJ SS, Wijesuriya SJ, Hollenberg MD. Glycosylation of human proteinase-activated receptor-2 (hPAR2): role in cell surface expression and signalling. *Biochem J* 2002;368:495-505.
95. Rolland-Fourcade C D-SA, Cirillo C, Lopez C, Jaramillo JO,, Desormeaux C CN, Motta JP, Larauche M, Taché Y, Berghe PV, Neunlist M, Coron E KS, Portier G, Bonnet D, Alric L, Vanner S, Deraison C, Vergnolle , et al. Epithelial expression and function of trypsin-3 in irritable bowel syndrome. *Gut.* 2017 2017;66:1767-1778.
96. Buzza MS N-AS, Shea-Donohue T, Zhao A, Lin CY, List K, Szabo R, Fasano A BT, Antalis TM. Membrane-anchored serine protease matriptase regulates epithelial barrier formation and permeability in the intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:4200-5.
97. Fyfe M BM, Aspengren S, Peterson A. PAR-2 activation in intestinal epithelial cells potentiates interleukin-1beta-induced chemokine secretion via MAP kinase signaling pathways. *Cytokine* 2005;31:358-67.
98. Wang H MF, Hirota CL, MacNaughton WK. Proteinase-activated receptors induce interleukin-8 expression by intestinal epithelial cells through ERK/RSK90 activation and histone acetylation. *FASEB J* 2010;24:1971-80.
99. Martínez C, Lobo B, Pigrau M, Ramos L, González-Castro AM, Alonso C, Guilarte M, Guilá M, de Torres I, Azpiroz F, Santos J, Vicario M. Diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome: an organic disorder with structural abnormalities in the jejunal epithelial barrier. *Gut.* 2013 Aug;62(8):1160-8.
100. Jacob C, Yang PC, Darmoul D, Amadesi S, Saito T, Cottrell GS, Coelho AM, Singh P, Grady EF, Perdue M, Bunnett NW. Mast cell tryptase controls paracellular permeability of the intestine. Role of protease-activated receptor 2 and beta-arrestins. *J Biol Chem.* 2005 Sep 9;280(36):31936-48.
101. Coëffier M GR, Boukhattala N, Aziz M, Lecleire S, Vandaele N, Antonietti, M SG, Bôle-Feysot C, Déchelotte P, Reimund JM, Ducrotté P. Increased proteasome-mediated degradation of occludin in irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2010;105:1181-8.
102. Simonovic I RJ, Koutsouris A, Hecht G. Enteropathogenic *Escherichia coli* dephosphorylates and dissociates occludin from intestinal epithelial tight junctions. *Cell Microbiol* 2000;2:305-15.

103. Ishimoto H OT, Sei H, Yamasaki T, Kondo T, Tozawa K, Tomita T, Ohda Y, , Fukui H WJ, Miwa H. Claudin-2 expression is upregulated in the ileum of diarrhea predominant irritable bowel syndrome patients. *J Clin Biochem Nutr* 2017;60:146-150.
104. Suzuki T YN, Tanabe S. Interleukin-6 (IL-6) regulates claudin-2 expression and tight junction permeability in intestinal epithelium. *J Biol Chem* 2011;286:31263-71.
105. Wilcz-Villega EM, McClean S, O'Sullivan MA. Mast cell tryptase reduces junctional adhesion molecule-A (JAM-A) expression in intestinal epithelial cells: implications for the mechanisms of barrier dysfunction in irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2013;108:1140-51.
106. Runkle EA SJ, Runkle KB, Liu X, Antonetti DA. Occludin localizes to centrosomes and modifies mitotic entry. *J Biol Chem* 2011;286:30847-58.

9. ANEXOS

Anexo 1:

Resultados preliminares. Determinación de los niveles de transcrito de Bcl-3 en mucosa intestinal de pacientes irlandeses con SII.



Anexo 2:

Aprobación del comité ético del HCUCH.

UNIVERSIDAD DE CHILE
HOSPITAL CLINICO
Comité Ético o de Investigación



SANTIAGO, 04 de junio de 2014.

Dra.
Caroll Beltrán M.
Investigador Responsable
Servicio de Gastroenterología
Presente

Ref.: "Papel inmunorregulador de BCL3 en el epitelio intestinal de pacientes con síndrome de intestino irritable (SII)".

Estimada Dra.

Por la presente el Comité Ético Científico HCUCH, acusa recibo de su carta con fecha 26 de mayo de 2014 en la cual solicita extensión de la aprobación por un periodo de un año más al protocolo de la referencia.

No encontrándose objeciones éticas, el Comité otorga la aprobación ejecutiva a su solicitud en sesión del día 04 de junio de 2014.

Se recuerda a la investigadora que debe hacer llegar a este Comité el informe anual.

Le saluda atentamente

DR. ANTONIO MORALES B.

PRESIDENTE DEL COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO
HOSPITAL CLINICO DE LA UNIVERSIDAD DE CHILE



Nº 001
AMB/kbp
Distribución:
- Investigador principal
- Archivo CECI

Anexo 4: Encuesta de Calidad de vida SF-36 (Health Survey, SF 36):

Este cuestionario evalúa la percepción de un individuo del estado de salud general y los cambios, tanto físicos como psicológicos, durante el último año. A través de la medición de 8 diferentes aspectos, a través de 8 escalas: función física, rol físico, dolor corporal, salud general, vitalidad, función emocional, rol emocional y salud mental, con rangos de puntuación desde 0 (peor estado de salud) hasta 100 (mejor estado de salud)²

ENCUESTA SF 36 PARA CALIDAD DE VIDA							
Nombre:..... Edad:..... Fono:..... Actividad:..... Fecha:..... Peso:..... Estatura:..... Fuma:.....							
1	En general, usted podría decir que su salud es: (Por favor escoja una alternativa). Ejecelente – Muy buena – Buena – Regular – Mala –						
2	En comparación a un año atrás, como calificaría su salud en general ahora: (Por favor, escoja una alternativa). Mucho mejor – Algo mejor – Más o menos igual – Algo peor – Mucho peor –						
3	Las siguientes preguntas son sobre actividades que usted podría hacer en un día cualquiera. ¿Su salud lo limita en estas actividades? Si es así, ¿cuánto? (Por favor, marque con un círculo en cada línea).						
	Actividades	Si, me limita mucho	Si, me limita poco	No me limita para nada			
3.1	Actividades vigorosas, como correr, levantar objetos pesados, participar en deportes extremos.	1	2	3			
3.2	Actividades moderadas, como mover una mesa, usar una aspiradora, jugar fútbol u otra actividad deportiva.	1	2	3			
3.3	Levantar o cargar mercadería	1	2	3			
3.4	Subir varias escaleras	1	2	3			
3.5	Subir una escalera	1	2	3			
3.6	Agacharse, arrodillarse o gatear	1	2	3			
3.7	Caminar más de un kilómetro	1	2	3			
3.8	Caminar varias cuadras	1	2	3			
3.9	Caminar una cuadra	1	2	3			
3.10	Bañarse o vestirse solo (a)	1	2	3			
4	Durante las últimas 4 semanas, ¿ha tenido usted alguno de los siguientes problemas con su trabajo o en otras actividades diarias como resultado de su salud física? (Por favor, marque con un círculo en cada línea).						
		Si	No				
4.1	Disminuir la cantidad de tiempo dedicada al trabajo o otras actividades.	1	2				
4.2	Lograr menos de lo que le gustaría.	1	2				
4.3	Estar limitado en el tipo de trabajo o actividad.	1	2				
4.4	Tener dificultad para realizar su trabajo o otras actividades (por ej., que le cueste más)	1	2				
5	Durante las últimas 4 semanas, ¿ha tenido usted alguno de los siguientes problemas con su trabajo o en otras actividades diarias como resultado de algún problema emocional? (Por favor, marque con un círculo en cada línea).						
		Si	No				
5.1	Lograr menos de lo que le gustaría.	1	2				
5.2	Lograr menos de lo que le gustaría.	1	2				
5.3	No trabajar o hacer actividades de forma tan cuidadosa como siempre.	1	2				
6	Durante las últimas 4 semanas, ¿cuánto ha interferido su salud física o problemas emocionales con sus actividades sociales normales con familia, amigos, vecinos o grupos? (Por favor, escoja una alternativa). De ninguna forma – Escasamente – Moderadamente – Más que moderado – Extremadamente –						
7	¿Cuanto dolor físico ha tenido durante las últimas 4 semanas? (Por favor, escoja una alternativa). Nada – Muy leve – Leve – Moderado – Severo – Muy severo –						
8	Durante las últimas 4 semanas, ¿en cuanto ha interferido su dolor con su trabajo normal (incluyendo laboral y doméstico)? (Por favor, escoja una alternativa). En nada – Escasamente – Moderadamente – Más que moderado – Extremadamente –						
9	Estas preguntas son sobre cómo se siente usted y cómo ha estado su vida durante las últimas 4 semanas. Por favor responda lo más cercanamente a como se siente usted. (Por favor marque con un círculo en cada línea).						
		Siempre	Mayor parte	Gran parte	Algunas veces	Casi nunca	Nunca
9.1	¿Se siente usted lleno de vida?	1	2	3	4	5	6
9.2	¿Es usted una persona nerviosa?	1	2	3	4	5	6
9.3	¿Se ha sentido tan deprimido que nada podría animarlo?	1	2	3	4	5	6
9.4	¿Se ha sentido tranquilo y en paz?	1	2	3	4	5	6
9.5	¿Tiene mucha energía?	1	2	3	4	5	6
9.6	¿Se ha sentido triste y desconsolado?	1	2	3	4	5	6
9.7	¿Se ha sentido preocupado?	1	2	3	4	5	6
9.8	¿Es usted una persona feliz?	1	2	3	4	5	6
9.9	¿Se ha sentido cansado?	1	2	3	4	5	6

10.	Durante las últimas 4 semanas, ¿cuánto tiempo ha interferido su salud física o problemas emocionales con sus actividades sociales (visitar amigos, parientes, etc)? (Por favor escoja una alternativa). Siempre – La mayor parte – Algunas veces – Casi nunca – Nunca –					
11.	¿Que tan CIERTO o FALSO es cada una de las siguientes afirmaciones para usted? (Por favor marque con un círculo en cada línea).					
	Muy cierto	Relativa mente cierto	No lo se	Relativa mente falso	Muy falso	
11.1	Parece que me enfermo mas que otras personas.	1	2	3	4	5
11.2	Soy tan saludable como cualquiera que conozco.	1	2	3	4	5
11.3	Espero que mi salud empeore.	1	2	3	4	5
11.4	Mi salud es excelente	1	2	3	4	5
Este laboratorio forma parte de un Centro de Investigación. Solicitamos a usted autorizar que los datos obtenidos en esta encuesta puedan ser utilizados en investigaciones futuras, donde su identidad se mantendrá confidencial.						
Autorizo que estos datos puedan ser utilizados para la investigación o publicación de estudios clínicos.						
Nombre: _____						
Rut: _____						
Firma _____						

Anexo 4: Cuestionario Ansiedad y Depresión (Hospital Anxiety and Depression scale, HADS):

Este cuestionario evalúa la presencia de síntomas de ansiedad y depresión a través de sub-escalas de ansiedad y depresión. Sumando la puntuación de ambas escalas se establece los siguientes rangos: Normal para 0-7; casos probables para 8-10; caso de ansiedad y depresión para 11-21⁴.

HAD^D: Hospital, ansiedad y depresión (autoadministrada)

Los médicos conocen la importancia de los factores emocionales en la mayoría de enfermedades. Si el médico sabe cual es el estado emocional del paciente puede prestarle entonces mejor ayuda.

Este cuestionario ha sido confeccionado para ayudar a que su médico sepa cómo se siente usted afectiva y emocionalmente. No es preciso que preste atención a los números que aparecen a la izquierda. Lea cada pregunta y subraye la respuesta que usted considere que coincide con su propio estado emocional en la última semana.

No es necesario que piense mucho tiempo cada respuesta: en este cuestionario las respuestas espontáneas tiene más valor que las que se piensan mucho.

A.1. Me siento tenso/a o nervioso/a:

- 3. Casi todo el día
- 2. Gran parte del día
- 1. De vez en cuando
- 0. Nunca

D.1. Sigo disfrutando de las cosas como siempre:

- 0. Ciertamente, igual que antes
- 1. No tanto como antes
- 2. Solamente un poco
- 3. Ya no disfruto con nada

A.2. Siento una especie de temor como si algo malo fuera a suceder:

- 3. Sí, y muy intenso
- 2. Sí, pero no muy intenso
- 1. Sí, pero no me preocupa
- 0. No siento nada de eso

D.2. Soy capaz de reirme y ver el lado gracioso de las cosas:

- 0. Igual que siempre
- 1. Actualmente, algo menos
- 2. Actualmente, mucho menos
- 3. Actualmente, en absoluto

A.3. Tengo la cabeza llena de preocupaciones:

- 3. Casi todo el día
- 2. Gran parte del día
- 1. De vez en cuando
- 0. Nunca

D.3. Me siento alegre:

- 3. Nunca
- 2. Muy pocas veces
- 1. En algunas ocasiones
- 0. Gran parte del día

HAD^D: Hospital, ansiedad y depresión (autoadministrada)

A.4. Soy capaz de permanecer sentado/a tranquilo/a y relajado/a:

- 0. Siempre
- 1. A menudo
- 2. Raras veces
- 3. Nunca

D.4. Me siento lento/a y torpe:

- 3. Gran parte del día
- 2. A menudo
- 1. A veces
- 0. Nunca

A.5. Experimento una desagradable sensación de "nervios y hormigueos" en el estómago:

- 0. Nunca
- 1. Sólo en algunas ocasiones
- 2. A menudo
- 3. Muy a menudo

D.5. He perdido el interés por mi aspecto personal:

- 3. Completamente
- 2. No me cuido como debería hacerlo
- 1. Es posible que no me cuide como debiera
- 0. Me cuido como siempre lo he hecho

A.6. Me siento inquieto/a como si no pudiera parar de moverme:

- 3. Realmente mucho
- 2. Bastante
- 1. No mucho
- 0. Nunca

D.6. Espero las cosas con ilusión:

- 0. Como siempre
- 1. Algo menos que antes
- 2. Mucho menos que antes
- 3. En absoluto

A.7. Experimento de repente sensaciones de gran angustia o temor:

- 3. Muy a menudo
- 2. Con cierta frecuencia
- 1. Raramente
- 0. Nunca

D.7. Soy capaz de disfrutar con un buen libro o con un buen programa de radio o televisión:

- 0. A menudo
- 1. Algunas veces
- 2. Pocas veces
- 3. Casi nunca

Valoración: se considera que entre 0 y 7 no indica caso, entre 8 y 10 sería un caso dudoso y las puntuaciones superiores a 11 son, probablemente, casos en cada una de las subescalas.

Anexo 4: Cuestionario de Severidad de la Sintomatología de SII (SI-SS):

Este cuestionario incluye preguntas relacionadas a la intensidad del dolor abdominal, frecuencia del dolor abdominal, intensidad de la hinchazón, grado de insatisfacción del hábito intestinal, interferencia de los síntomas abdominales en la vida diaria del paciente, datos reportados retrospectivamente en los 10 días anteriores a la toma de la encuesta. El puntaje total del cuestionario es obtenido a partir de la suma de las puntuaciones individuales a cada pregunta (0 a 100 por pregunta y 0 a 500 en total). Se considerará estado de remisión o estado asintomático puntajes < 75; estado sintomático leve para puntajes 75-175; estado moderado para 175-300 y estado severo para > 300^{1, 2}.

Anexo 1. CUESTIONARIO DE GRAVEDAD DEL SÍNDROME DE INTESTINO IRRITABLE
PUNTUACIÓN DE LA GRAVEDAD DEL SÍNDROME DE INTESTINO IRRITABLE

1) ¿Sufre frecuentemente dolor abdominal (dolor de barriga)?

SÍ NO

Señale la respuesta que más se acerca a lo que siente.

Si su respuesta ha sido SÍ, ¿cuán grave es su dolor abdominal?



2) Por favor, escriba el número de días que tiene dolor en un lapso de 10 días. Por ejemplo, si anota 4 significará que ha tenido 4 días de dolor en 10 días. Si tiene dolor todos los días, anote 10.

Numero de días con dolor

3) a) ¿Sufre con frecuencia distensión o hinchazón abdominal?*(barriga hinchada, inflada o tensa)

SÍ NO

Señale la respuesta que más se acerca a lo que siente.

*las mujeres, por favor, ignoren la distensión relacionada con el periodo (la regla)

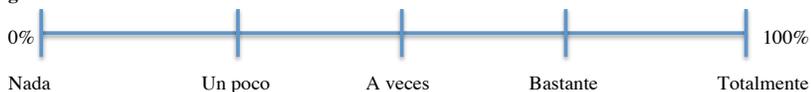
b) Si su respuesta ha sido SÍ, ¿cuan grave es su distensión abdominal?



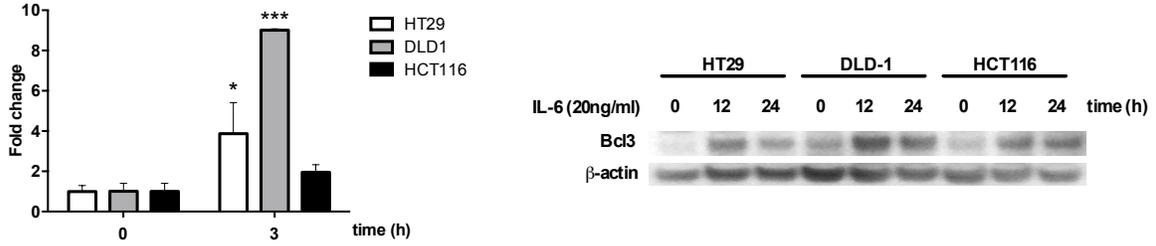
4) ¿Está satisfecho con su hábito intestinal (de cuantas veces va al baño)?



5) ¿En qué medida su síndrome de intestino irritable afecta o interfiere con su vida en general?



Anexo 4: Resultados preliminares. Determinación de los niveles proteicos de Bcl-3, frente a estímulo con IL-6, en líneas celulares de epitelio de colon.



Anexo 5: Determinación de los niveles de Bcl-3, en células Caco-2 estimuladas con tripsina en ausencia o presencia de heparina.

