

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



***ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE LA VÍA ESTEROIDOGÉNICA  
INTESTINAL Y SU CARACTERIZACIÓN EN PACIENTES CON COLITIS  
ULCEROSA***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de  
Magíster en Bioquímica área de Especialización en Bioquímica  
Clínica y Memoria para optar al Título de Bioquímica por:**

***MIRIT LUISA BITRÁN AMBLER***

**Director de Tesis: Dra. Marcela A. Hermoso Ramello**

**Santiago de Chile**

**Octubre, 2019**

**FORMULARIO PRESENTACION PROYECTO DE  
TESIS PROGRAMA DE MAGISTER EN  
BIOQUÍMICA**

**NOMBRE DEL ESTUDIANTE:**

**Mirit Luisa Bitrán Ambler**

**TITULO DEL PROYECTO DE TESIS:**

**ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE LA VÍA ESTEROIDOGÉNICA  
INTESTINAL Y SU CARACTERIZACIÓN EN PACIENTES CON  
COLITIS ULCEROSA**

**LUGAR DE DESARROLLO DE LA TESIS:**

**Laboratorio de Inmunidad Innata, Instituto de Ciencias Biomédicas,  
Facultad de Medicina, Universidad de Chile**

**FINANCIAMIENTO:**

**Proyecto Fondecyt Regular 1170648 (2017-2020)**

**DIRECTOR(ES) DE TESIS:**

**Marcela A. Hermoso Ramello**

**FIRMAS DE ESTUDIANTE Y DIRECTOR**



-----



-----

# UNIVERSIDAD DE CHILE

## FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

### INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

## MIRIT LUISA BITRÁN AMBLER

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización en Bioquímica Clínica y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día

---

Director de Tesis:

Dra. Marcela A. Hermoso Ramello

---

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Alfonso Paredes

---

Dra. Caroll Beltrán

---

Dr. Dante Miranda

---

*A mis padres, que han hecho admirablemente bien el trabajo más difícil.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Marcela Hermoso por haberme permitido desarrollar este proyecto en su laboratorio, por guiarme y ayudarme a crecer profesionalmente.

A mis compañeros del laboratorio de Inmunidad Innata: Octavio, Karen, Marjorie, Daniela, Glauben y Héctor por su invaluable ayuda y enseñanzas que permitieron en lo concreto el desarrollo teórico y experimental de esta tesis. A Gonzalo por la grata compañía diaria.

A la Clínica Las Condes y a sus profesionales: Al Dr. Rodrigo Quera y a la enfermera investigadora Daniela Simian, por su dedicación y compromiso con este proyecto de investigación. A la Dra. Claudia Hurtado, Dr. Mauricio Moreno y Magdalena Castro por la orientación brindada hacia el trabajo en el área clínica.

A todos los pacientes que accedieron a participar en este estudio, deseo agradecer enormemente su colaboración.

A los integrantes del laboratorio de Transducción de Señales del NIEHS a cargo del Dr. John Cidlowski por las facilidades técnicas y enseñanzas profesionales durante mi estadía.

A mi comisión evaluadora: Dr. Alfonso Paredes, Dra. Caroll Beltrán y Dr. Dante Miranda, a quienes agradezco sus consejos, sugerencias y sobre todo su apoyo y buena disposición durante este proceso.

Quiero agradecer al Colegio San Joaquín de La Serena y a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Puntualmente, agradezco sinceramente a mis profesores, a todos quienes fueron parte de mi proceso educativo en todos sus niveles y han sido maestros e inspiración para llegar a ser quien soy hoy.

A mis amigos y amigas, los que me dio la vida y los que me dejó esta carrera. Por su cariño, compañía e incondicional aliento. Por las risas, alegrías y momentos, ustedes son lo que queda, realmente, grabado para siempre.

A mis padres Jaime y Jessica por entregarme amor desmedido y fortaleza suficiente. A mi familia, por enseñarme a perseverar y a sobreponerme a las dificultades, mis hermanos Jael, Deborah y Lior, mi cuñado, mi sobrina, mis primos, tíos, abuelos y hasta a mi compañerita de cuatro patas. A todos, por su eterna y movilizadora confianza en mí.

## Índice

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	ix
<b>LISTA DE TABLAS</b>	xi
<b>ABREVIATURAS</b>	xii
<b>I. RESUMEN</b>	xiv
<b>I. ABSTRACT</b>	xvii
<b>II. INTRODUCCIÓN</b>	1
II .1 EPIDEMIOLOGÍA DE EII	1
II .2 DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA COLITIS ULCEROSA	2
II. 3 CLASIFICACIÓN DE CU, MANIFESTACIONES, DIAGNÓSTICO Y COMPLICACIONES	2
II .4 FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE CU	3
II.4a Genéticos	3
II.4b Dieta y estilo de vida	4
II.4c Microorganismos	4
II.4d Fármacos	5
II .5 TRATAMIENTO DE CU	5
II.5a Uso de glucocorticoides en CU	5
II .6 BASES MOLECULARES DEL TRATAMIENTO CON GC	6
II .7 BASES GENÉTICAS Y MOLECULARES DE LA RESISTENCIA/DEPENDENCIA A GC	9
II .8 ESTEROIDOGÉNESIS	10
II.8a Esteroidogénesis adrenal	10
II.8b Esteroidogénesis intestinal	11
<b>III.1 HIPÓTESIS</b>	15
<b>III.2 OBJETIVO GENERAL</b>	15
<b>III.4 OBJETIVO ESPECÍFICOS.</b>	15
<b>IV. METODOLOGIA</b>	17
IV.1 PACIENTES	17

IV.1a	Calculo del tamaño muestral	17
IV.1b	Descripción general del estudio	17
IV.1c	Descripción de los grupos	18
IV. 1d	Obtención de las muestras	18
IV. 2	CULTIVO CELULAR	20
IV.2a	Condiciones de cultivo	20
IV.2b	Conteo de células	20
IV. 3	TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS	20
IV.3a	Tratamiento líneas celulares	20
IV.3b	Tratamiento biopsias colonoscópicas	21
IV.3c	Cuantificación de cortisol	21
IV. 4	EXTRACCIÓN DE ARN	22
IV.4a	Extracción de ARN desde biopsias colonoscópicas usando columnas	22
IV.4b	Extracción de ARN de células Ccd841CoN utilizando Trizol	22
IV.4c	Cuantificación ARN	23
IV.4d	Tratamiento con DNasa	23
IV. 5	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE TRANSCRITOS.	23
IV.5a	RT-qPCR mediante sondas Taqman y Sybr Green	23
IV. 5b	Determinación de la expresión relativa y/o veces de cambio respecto al control	
IV. 6	EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE CÉLULAS EN CULTIVO.	26
IV.6a	Extracción de proteínas mediante RIPA	27
IV.6b	Cuantificación de proteínas	27
IV. 7	EVALUACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN BLOT	27
IV.7a	Western Blot para lisados de células en cultivo	28
IV.7b	Cuantificación de proteína detectada mediante Western Blot	28
IV. 8	ESTUDIO INTERACCIÓN PROTEÍNA- DNA	29
IV.8a	Análisis <i>in silico</i> de elementos de respuesta a glucocorticoides (GREs) en el promotor del gen de LRH-1 (NR5A2).	29
IV. 8b	Inmunoprecipitación de cromatina acoplada a qPCR	30
IV. 9	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	33

<b>V. RESULTADOS</b>	
VI.1 DETERMINACION DE LA REGULACIÓN DE LA VÍA ESTEROIDOGÉNICA INTESTINAL POR GLUCOCORTICOIDES EN LÍNEA CELULAR EPITELIAL DE COLON HUMANO.	34
VI.1a Cuantificación de la producción de cortisol en condiciones basales y posterior al tratamiento con dexametasona en los sobrenadantes de células epiteliales intestinales (Ccd841CoN) mediante ELISA.	34
VI.1b Determinación de la expresión génica de los componentes de la vía esteroideogénica inducida por dexametasona mediante qPCR en células epiteliales intestinales (Ccd841CoN).	35
VI.1c Determinación de la expresión proteica de los componentes de la vía esteroideogénica inducidos por dexametasona mediante Western Blot en células epiteliales intestinales (Ccd841CoN).	38
VI.1d Análisis de la interacción proteína – DNA entre GR y LRH-1 mediada por GC a través de técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) en la línea celular de colon humano.	39
V.2 CARACTERIZACION DE LOS COMPONENTES DE LA VIA ESTEROIDOGÉNICA Y EVALUAR LA PRODUCCIÓN DE CORTISOL DEPENDIENTE DE GR/LRH-1 INDUCIDA POR DEXAMETASONA EN LA MUCOSA INTESTINAL DE PACIENTES CON CU CLASIFICADOS SEGÚN SE RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON GC	42
V.2a. Cuantificación de la producción de cortisol en condiciones basales y posterior al tratamiento con dexametasona y bloqueadores farmacológicos específicos contra GR y LRH-1 (RU486 y SR1848, respectivamente) en los sobrenadantes de los explantes de mucosa cultivados ex vivo mediante ELISA.	43
V.2b. Determinación de la expresión de los componentes de la vía esteroideogénica (GR total, GR $\beta$ , LRH-1, CYP11A1 y CYP11B1) a nivel de transcrito mediante qPCR, en la mucosa intestinal en condiciones basales.	46
<b>VI. DISCUSIÓN</b>	51
Principales hallazgos	61
Conclusiones	62
Proyecciones	63
<b>VIII. REFERENCIAS</b>	64
<b>ANEXO 1</b>	71
<b>ANEXO 2</b>	72
<b>ANEXO 3</b>	73



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Diagrama del procesamiento alternativo del exón 9 en el gen NR3C1 (hGR) (cromosoma 5) y generación de las isoformas transcripcionales de GR $\alpha$  y GR $\beta$ . 7
- Figura 2.** Diagrama representativo del efecto de los GCs en las células epiteliales intestinales (IECs). 9
- Figura 3.** Diagramas representativos de flujograma para la toma de muestras de pacientes participantes en este estudio. 19
- Figura 4.** Mapa genómico de la zona amplificada utilizando las sondas respectivas para GRtotal (A), GR $\beta$  (B) y LRH-1 (C). 26
- Figura 5.** Producción de cortisol por la línea celular epitelial de colon humano (Ccd841CoN) inducido por tratamiento con dexametasona 35
- Figura 6.** Efecto de la dexametasona y el antagonista del GR (RU486) sobre la expresión relativa de los transcritos de LRH-1, CYP11A1, GR y GILZ. 37
- Figura 7.** Evaluación y cuantificación de la inducción de la proteína LRH-1 por dexametasona mediante Western Blot en células CCd841CoN. 39
- Figura 8.** Inmunoprecipitación de cromatina acoplado a PCR cuantitativo (qPCR) para evaluación de la unión del receptor de glucocorticoides (GR) a elementos de respuesta (GRE) identificados en el promotor del gen *NR5A2* (LRH-1) y *GILZ*. 41
- Figura 9.** Efecto de la dexametasona, el antagonista del receptor de glucocorticoides (RU486) e inhibición del factor transcripcional LRH-1 (SR1848) en la producción de cortisol en la mucosa de pacientes con CU. 45
- Figura 10.** Caracterización de los componentes de la vía esteroidogénica en la mucosa de pacientes con CU (Resp, Ref y Dep) e individuos sanos (IS). 49
- Figura 11.** Correlación de la expresión de los transcritos LRH-1 y GR total en la mucosa intestinal de individuos sanos y pacientes con CU (Índice de Spearman). 50

**Figura 12.** Modelo propuesto de la vía esteroidogénica intestinal en el epitelio y su regulación por GC. 53

**Figura 13.** Modelo de la participación de los componentes de la vía esteroidogénica en la mucosa intestinal en salud y enfermedad. 60

#### FIGURAS SUPLEMENTARIAS

**Figura Suplementaria 1.** Expresión de GR $\beta$  normalizado a la expresión de GR total en la mucosa de individuos sanos (Sano) y pacientes con CU (Resp, Ref y Dep) en muestras obtenidas previo al inicio del tratamiento con GC (col 1) y posterior al tratamiento (col 2) 78

**Figura Suplementaria 2.** Comparación pareada de la expresión de cada uno de los componentes de la vía esteroidogénica entre la colonoscopia 1 (1era) y la colonoscopia 2 (2da) para cada paciente con CU estudiado y en cada grupo de pacientes. 79

**Figura Suplementaria 3.** Enriquecimiento del GRE del gen GILZ relativo a la muestra input al comparar lo obtenido para la condición sin tratamiento (Control) y lo obtenido en el DNA de células tratadas por 2 horas con dexametasona 100 nM (100 nM Dex) a modo de control positivo. 80

**Figura Suplementaria 4.** Tabla resumen de coeficientes de Spearman (r) y valores p (p) para las correlaciones estadísticas analizadas entre la expresión de los componentes de la vía esteroidogénica evaluados en mucosa intestinal (biopsias colonoscópicas humanas de individuos sanos y pacientes con CU). 81

## **LISTA DE TABLAS**

Tabla 1. Comparación entre los métodos de RT- qPCR utilizados.	25
Tabla 2. Elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE) putativos identificados en la secuencia promotora de LRH-1 (pNR5A2) mediante análisis bioinformático (software JASPAR).	30
Tabla 3. Partidores diseñados (plataforma IDT) para el análisis de los GRE seleccionados en el promotor de LRH-1 mediante ChIP-qPCR.	32
Tabla 4. Datos epidemiológicos y clínicos de los pacientes incluidos en el estudio.	42

## **ABREVIATURAS**

**EII:** enfermedad inflamatoria intestinal

**CU:** colitis ulcerosa

**EC:** enfermedad de Crohn

**cDNA:** DNA complementario

**dNTPs:** mezcla de deoxinucleotidos

**ELISA:** ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima

**IL:** interleuquina

**KDa:** kilo daltons

**mRNA:** RNA mensajero

**NFκB:** factor nuclear κB

**qPCR:** reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

**RNA:** ácido ribonucleico

**DNA:** ácido dexosirribonucleico

**RT-PCR:** PCR en tiempo real

**ChIP:** Inmunoprecipitación de cromatina

**SNPs:** polimorfismos de un nucleótido

**ST2s:** ST2 soluble

**ST2L:** Receptor ST2

**TH1:** linfocitos T ayudadores tipo 1

**TH2:** linfocitos T ayudadores tipo 2

**TLRs:** receptores tipo toll

**TNFα:** factor de necrosis tumoral alfa

**hGR:** receptor de glucocorticoides humano

**LRH-1:** Liver receptor homologue 1

**GRβ:** isoforma β del receptor de glucocorticoides

**GRα:** isoforma α del receptor de glucocorticoides

**GCs:** glucocorticoides

**Dex:** dexametasona

**PKC:** proteína kinasa C

**PMA:** Phorbol 12-myristate 13-acetate  
**IS:** individuo sano  
**Resp:** respondedor  
**Ref:** refractario  
**Dep:** dependiente  
**Col 1:** colonoscopia 1  
**Col 2:** colonoscopia 2  
**Ctrl:** condición control  
**HPA:** Hipófisis-Pituitaria-Adrenal  
**pLRH-1:** promotor de LRH-1  
**CRC:** cáncer colorectal  
**GRE:** elementos de respuesta a glucocorticoides  
**GILZ:** Glucocorticoid Induced Leucine Zipper  
**CEIs:** células epiteliales intestinales  
**IgG:** Inmunoglobulina G  
**RedCap:** Research Electronic Data Capture  
**Cq:** ciclos de cuantificación  
**Pb:** pares de bases  
**PMN:** polimorfonucleares  
**PBS:** Tampón Fosfato Salino  
**SDS-PAGE:** Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con SDS  
**SFB:** Suero Fetal Bovino  
**TBS-Tween:** Tampón Salino de Tris con Tween  
**TEMED:** N, N, N', N'-tetrametiletildiamina con Tween-20  
**Tris:** Tris-(hidroximetil)-aminometano  
**BSA:** Albúmina de Suero Bovino  
**PFA:** paraformaldehído

## **I. RESUMEN**

Las enfermedades inflamatorias del intestino (EII) son condiciones de inflamación crónica del tracto gastrointestinal y abarca dos manifestaciones clínicas principales: Enfermedad de Crohn (EC) y Colitis Ulcerosa (CU).

En Chile no se cuenta con información epidemiológica exacta de cifras de prevalencia o incidencia, sin embargo, estudios uni- y multicéntricos han demostrado el constante aumento de la incidencia de EII, atribuible principalmente a la CU.

La CU es una enfermedad inflamatoria crónica idiopática, para la que aún no existe un tratamiento curativo definitivo, caracterizada por etapas de actividad (comúnmente con sangrado en las deposiciones y diarreas recurrentes) e inactividad/remisión.

Los glucocorticoides (GC), son el tratamiento base y de primera línea en CU puesto que, debido a su acción anti-inflamatoria e inmunomoduladora, son altamente efectivos en la inducción de la remisión clínica y endoscópica. Sin embargo, a pesar que más de la mitad de los pacientes con EII responden al tratamiento con GC, el 19% son refractarios o resistentes al tratamiento y el 20% de los pacientes sometidos a terapia prolongada con GC, se hacen dependientes del fármaco.

Numerosas vías han sido propuestas para explicar los efectos anti-inflamatorios e inmunomodulatorios de los GCs exógenos una vez que se unen al receptor de glucocorticoides (GR). Adicionalmente, estudios más recientes han identificado al epitelio intestinal como una importante fuente de GCs endógenos extra-adrenales, los que no son regulados por la actividad del eje HPA (ni afectarían la producción sistémica de GCs), sin embargo, con capacidad de ejercer sus efectos localmente. Esta esteroidogénesis intestinal representaría un mecanismo fundamental para la mantención de la homeostasis y estaría, por lo tanto, adaptado y sujeto a las necesidades locales, presentándose como un importante mecanismo inmuno-regulatorio tejido-específico. Además, la producción de GCs es inducida por estimulación de las células inmunes y el microambiente inflamatorio característico de la CU. En particular, la vía enzimática de síntesis de cortisol (a partir de colesterol) parece ser idéntica a la operante en la glándula adrenal, pero regulada por moléculas y eventos de señalización diferentes. Así, la actividad del factor transcripcional Liver receptor homologue 1 (LRH-1) ha cobrado especial relevancia para comprender en profundidad el mecanismo de regulación de las enzimas esteroidogénicas (CYP11A1 y CYP11B1), corroborando una elevada expresión a nivel del epitelio intestinal.

En base a los antecedentes expuestos, la hipótesis propuesta en esta tesis es: Los glucocorticoides inducen la expresión de LRH-1 y la activación de la vía esteroidogénica intestinal.

Así, el desarrollo de esta investigación pretendió determinar el efecto de los GCs sobre la expresión de LRH-1 y la activación de la vía esteroidogénica intestinal, y, en este contexto, caracterizar sus componentes en la mucosa intestinal de pacientes con CU y la posible relación con la respuesta a la terapia corticoidal.

Para esto, en primer lugar, se caracterizó de la expresión de los transcritos de los componentes de la vía esteroidogénica propuesta en la mucosa intestinal de pacientes con CU y la capacidad productora de cortisol inducida por GCs fue determinada mediante qPCR y ELISA, respectivamente.

Los ensayos *ex vivo* mostraron que la mucosa intestinal (tanto de individuos sanos como de pacientes con CU) produce cortisol al ser estimulada con GCs exógenos y esta capacidad esteroidogénica es regulada tanto por GR como por el factor LRH-1. Adicionalmente, los resultados obtenidos sugieren de diferencias a nivel de la expresión estos componentes de la vía esteroidogénica entre la mucosa intestinal de pacientes que respondieron adecuadamente a la terapia con GCs y aquellos que no. Una menor expresión de LRH-1 y GR total en la mucosa de pacientes refractarios y dependientes comparado con respondedores, sugieren que la expresión de estos componentes está relacionada con la respuesta a la terapia con GCs.

Sumado a lo anterior, estudios realizados mediante índice de correlación de Pearson, arrojaron una correlación positiva entre la expresión de GR y LRH-1 en la mucosa intestinal de los sujetos de estudio.

Para determinar la regulación directa de la expresión del LRH-1 y activación de la vía esteroidogénica mediante GCs/GR, un modelo de línea celular intestinal epitelial de colon humano (Ccd841CoN) fue utilizado. La producción de cortisol y la inducción de los componentes de la vía esteroidogénica mediada por GCs fue evaluada por ELISA, qPCR y Western Blot. Por último, la regulación directa de LRH-1 por GCs/GR fue estudiada por ChIP-qPCR.

Los resultados obtenidos permiten confirmar la inducción del factor regulador principal de la vía esteroidogénica intestinal, LRH-1, mediada por GCs tanto a nivel de transcrito como de proteína y, además, relacionar por primera vez la actividad de LRH-1 y la

producción de cortisol endógeno en el epitelio intestinal con la actividad del GR como factor transcripcional que induciría la transactivación y expresión de LRH-1 por unión directa a sitios GRE en su promotor.

A partir de los resultados obtenidos, esta tesis propone que los GCs exógenos son capaces de regular transcripcionalmente al factor LRH-1 por unión directa de GR a los sitios GRE en su promotor. La expresión y el efecto regulatorio de LRH-1 desencadenaría la producción a nivel intestinal de GCs endógenos en las células epiteliales del colon. Una vez en la mucosa, el cortisol producido ejercería su actividad inmunomoduladora y anti-inflamatoria de manera local. Estos hallazgos permiten concluir que el funcionamiento de la vía esteroideogénica podría controlar la progresión de patologías inflamatorias autoinmunes como la CU y que alteraciones en la misma podrían explicar una respuesta alterada a la terapia con corticoides en estos pacientes.



## **I. ABSTRACT:**

### **Study of the regulation of the intestinal steroidogenic pathway and its characterization in intestinal mucosa of ulcerative colitis patients**

The inflammatory bowel diseases (IBD) represent chronic inflammatory conditions of the gastrointestinal tract and include two main clinical manifestations: Crohn´s Disease (CD) and Ulcerative Colitis (UC).

In Chile, there is no epidemiologic data relating to the prevalence or incidence rates, however, uni- and multicenter studies have demonstrated a constant increase in IBD incidence, which is mainly due to a concomitant increase of UC cases.

UC is an idiopathic chronic inflammatory disease, for which there is no definitive curative treatment available. This pathology is characterized by activity stages, (commonly manifested with bleeding on the stool and recurrent diarrhea), and also inactive stages or remission.

The glucocorticoids (GC) are the fist-line treatment for UC patients since, due to their anti-inflammatory and immunomodulating action, they are highly effective in inducing clinical and endoscopic remission. However, it is important to mention that although more than half of IBD patients respond to GC treatment, 19% are refractory or resistant to the treatment and 20% of patients undergoing a prolonged GC therapy, become drug dependent.

Numerous ways in which exogenous GCs linked to the glucocorticoid receptor (GR) would exert their anti-inflammatory and immunomodulatory effects have been proposed. Additionally, more recent studies have identified the intestinal epithelium as an important source of extra-adrenal endogenous GCs, which are not regulated or affected by the HPA axis nor would affect the systemic GCs production, and are able to exert local effects. This would represent an important mechanism for intestinal homeostasis maintenance and would, therefore, be adapted to the local needs, presenting itself as an important tissue-specific immunoregulator.

It has also been reported that GCs production is induced by stimulation of immune cells and by the inflammatory microenvironment characteristic of inflammatory pathologies such as UC. In addition, while the enzymatic pathway of cortisol synthesis from cholesterol appears to be identical to that studied in the adrenal gland, it would be

regulated by different molecules and signaling events.

Thus, the activity of the transcriptional factor LRH-1 has gained special scientific relevance to understand the regulatory mechanism of steroidogenic enzymes CYP11A1 and CYP11B1, and has been corroborated by a high intestinal expression of this factor.

Based on the above, the hypothesis proposed in this thesis is: Glucocorticoids induce the expression of LRH1 and the activation of the intestinal steroidogenic pathway.

Thus, the development of this research aims to determine GCs effect on LRH-1 expression and the intestinal steroidogenic pathway activation, and, in this context, characterize the expression of the components of this pathway in the intestinal mucosa of UC patients whilst studying the possible relationship with the response to therapy with GCs.

Initially, transcript expression of steroidogenic pathway components and the cortisol-producing capacity induced by GCs was characterized in the intestinal mucosa of UC patients by qPCR and ELISA, respectively.

These *ex vivo* trials demonstrated the intestinal mucosa of both healthy individuals and UC patients is capable of producing cortisol when stimulated with exogenous GCs and that this steroidogenic capacity is regulated both by the GR and LRH-1. Alternatively, these results suggest differences at the expression level of these regulatory components between the intestinal mucosa of patients who responded adequately to GC therapy and those who did not. In general, lower expression of LRH-1 and total GR in the mucosa of refractory and dependent patients compared to responders, suggest that the component expression is related to the response to GC therapy.

In addition to the above, Pearson data analysis showed a significant positive correlation between GR and LRH-1 expression in the intestinal mucosa of the study subjects.

To determine the direct LRH-1 expression regulation and activation of steroidogenic pathway by GCs / GR, a human colon epithelial intestinal cell line model (Ccd841CoN) was used and cortisol was quantified by ELISA. Additionally, the induction of the steroidogenic pathway components mediated by GCs was evaluated by qPCR and Western Blot and finally, the direct regulation of LRH-1 by GCs / GR was studied by ChIP-qPCR. The results obtained confirm the induction of LRH-1, mediated by GCs both at the level of transcript and protein. Also, the results make it possible for the first time to relate the LRH-1 activity and endogenous cortisol production in the intestinal epithelium with the activity of GR as a transcriptional factor that would transactivate LRH-1 gene by directly

binding to GRE sites in its promoter, thus inducing its expression at the level of mRNA and protein.

The expression and regulatory effect of LRH-1 would trigger the intestinal production of endogenous GCs in the epithelial cells of the colon, and once in the mucosa, the cortisol produced will exert its immunomodulatory and anti-inflammatory activity. We therefore conclude that the functioning of this pathway could control the progression of autoimmune inflammatory diseases such as UC, and that alterations in it could explain a failed response to GCs therapy in these patients.

## **II. INTRODUCCIÓN**

Las enfermedades inflamatorias del intestino (EII) son condiciones de inflamación crónica del tracto gastrointestinal y abarca dos manifestaciones clínicas principales: la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU), que a pesar de ser diferentes entidades fisiopatológicas, han sido agrupadas bajo el término genérico de EII debido a sus características comunes (etapas de actividad/remisión, cronicidad y etiología multifactorial) (1,2).

### **II .1. EPIDEMIOLOGÍA DE EII**

La incidencia anual de CU varía desde 0-19,2 por cada 100.000 habitantes en Norteamérica y 0,6-24,3 por cada 100.000 habitantes en Europa lo que se traduce en una prevalencia de 249 casos en Norteamérica y 505 en Europa, por cada 100.000 habitantes (2). En cuanto a la EC, se estima una prevalencia de aproximadamente 320 casos por cada 100.00 habitantes tanto en Norteamérica como Europa (2,3). Desde la segunda mitad del siglo XX, un aumento sustancial en la incidencia de estas patologías ha sido determinado a nivel mundial, haciendo su estudio un tema de gran importancia (3). Esta tendencia, ha sido registrada principalmente en países en desarrollo de Asia, oriente medio (Hong-Kong, Japón, Corea, Israel y Malasia), y también en Sudamérica (Brasil y Chile), sugiriendo una importante influencia de factores medioambientales en el desarrollo de las EII (2-4).

En cuanto a la epidemiología en Chile, no se cuenta con cifras exactas (5), sin embargo, estudios uni- y multicéntricos han demostrado el constante aumento de la incidencia de EII acercándose a niveles registrados en países desarrollados, posiblemente asociado a procesos de industrialización como también a mejoras en los métodos diagnósticos y mayor acceso a los servicios de salud (4). Así, en un estudio publicado en 2016 por Simian. y cols., 716 pacientes con EII fueron estudiados, de los cuales 508 fueron diagnosticados con CU, y su comparación con estudios anteriores (2014) permiten concluir el aumento en las EII intestinales en Chile, particularmente por un aumento concomitante de la CU (4).

Dado los antecedentes epidemiológicos presentados, este proyecto de tesis se centrará en el estudio de la CU orientado hacia profundizar la comprensión de los mecanismos involucrados en esta patología de modo de implementar mejoras futuras en las terapias utilizadas actualmente para una enfermedad que afecta cada vez más a la población chilena.

## II.2 DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA COLITIS ULCEROSA

La CU es una enfermedad inflamatoria crónica idiopática, para la que aún no existe un tratamiento curativo definitivo. La inflamación se localiza principalmente en el colon y afecta en mayor proporción a adultos entre 30 y 40 años. En esta patología, la inflamación está restringida exclusivamente al colon, específicamente la mucosa intestinal (6). La CU está caracterizada por inflamación en la mucosa intestinal de manera retrógrada, iniciándose en el recto y extendiéndose hasta segmentos proximales del colon, manifestándose comúnmente con sangrado en las deposiciones y diarreas recurrentes (6,7). Otros síntomas pueden incluir incontinencia, aumento de la frecuencia de movimientos peristálticos, descarga de mucus, incomodidad abdominal, fiebre y pérdida de peso abrupta (6).

## II.3 CLASIFICACIÓN DE CU, MANIFESTACIONES, DIAGNÓSTICO Y COMPLICACIONES

La clasificación anatómica de la CU (según extensión de la inflamación a nivel del colon), conlleva a presentaciones clínicas diferentes, tales como proctitis, colitis de lado izquierdo y pancolitis (6), y según la Clasificación de Montreal como E1, E2 y E3, respectivamente (8).

La proctitis corresponde a una inflamación persistente y recurrente en el recto de diferente etiología, siendo la proctitis ulcerosa la manifestación más frecuente y parte del cuadro de la CU (9), presentando sensación de urgencia y tenesmus (percepción de evacuación incompleta) (6). Adicionalmente, la colitis de lado izquierdo (cuadro inflamatorio que comprende el recto, colon sigmoides y descendente hasta el ángulo esplénico), puede tener una manifestación clínica similar a la anterior, sumándose la constipación. Por último, la pancolitis o CU extensa corresponde a una inflamación que incluye el colon en su totalidad y las manifestaciones son diarreas sanguinolentas (los exámenes físicos pueden dar signos de anemia y sensibilidad abdominal (6), y dolor abdominal más agudo.

Para el diagnóstico de la CU, es requisito la combinación de manifestaciones clínicas mencionadas y/o la alteración de marcadores sanguíneos o fecales (niveles de proteína C reactiva, anticuerpos anti-neutrófilo citoplasmático perinuclear y niveles de calprotectina fecal elevados). Sin embargo, por sobre lo anterior, la detección de una alteración endoscópica de la mucosa intestinal mediante colonoscopia y el estudio histológico de biopsias endoscópicas (para confirmar el diagnóstico y clasificar la patología) son críticas (9,10).

Así, luego de confirmado el diagnóstico, la actividad de CU es evaluada utilizando

mayoritariamente el índice de Mayo (escala endoscópica y clínica definida para evaluar la respuesta a los tratamientos aplicados a los pacientes con CU) (8), correspondiendo a una composición de subíndices de cuatro categorías (frecuencia de las deposiciones, sangrado rectal, hallazgos en la colonoscopia y la evaluación global del médico) que va desde 0 a 12 (dividido en subíndices que, dependiendo de los hallazgos endoscópicos, van del 0 al 3) (8). De esta manera, un 0 como subíndice de Mayo endoscópico es atribuido a una mucosa normal o a un paciente con CU inactiva, mientras que un índice de 1 corresponde a enfermedad leve, 2 a enfermedad moderada y 3 indica ulceración y sangrado espontáneo. Además, la regeneración completa de la mucosa (luego de un periodo de actividad, el que está definido con subíndices  $\geq 2$ ) se ha definido como un subíndice de mayo endoscópico de 0 o 1 (8,11).

Debido a lo costoso e invasivo que resulta el examen de confirmación de diagnóstico actual de la CU y dada la importancia de la vía inflamatoria IL33/ST2 en su patogénesis, el análisis del sST2 plasmático sugiere a ST2 como un biomarcador para la detección de CU activa, requiriendo estudios más exhaustivos para asegurar su capacidad predictiva y uso diagnóstico (11,12).

Cabe destacar que una de las complicaciones más serias de la CU (causa de muerte por EII en aproximadamente el 10-15% de los casos), es el cáncer colorrectal (CRC), con un riesgo acumulativo que alcanza un 2, 8 y 18 % luego de 10, 20 y 30 años de su diagnóstico (realizado entre 15 a 20 años antes que los cánceres esporádicos) (13).

## II .4 FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE CU

Los factores de riesgo para el desarrollo de esta enfermedad, la hacen ser clasificada como una enfermedad multifactorial, lo que sin duda complica todavía más su prevención, diagnóstico y seguimiento.

### II.4a Genéticos

En el desarrollo de este tipo de patologías, han sido evaluados distintos factores genéticos asociados a susceptibilidad, ya que 8-14% de los pacientes con CU tiene un historial familiar de EII y los parientes de primer grado tienen 4 veces más riesgo de desarrollar la enfermedad (6). Además, se ha visto heterogeneidad étnica en este aspecto, ya que se sabe que la población judía tiene las tasas más altas de CU en comparación con otras etnias. A partir de esto, estudios de asociación del genoma completo (GWAS) han identificado más de 200 loci de riesgo para

las EII (6).

#### II.4b Dieta y estilo de vida

Asimismo, la variación en la composición de la microbiota intestinal asociado a factores genéticos del hospedero y medioambientales, ha surgido como un posible factor asociado a la influencia de la dieta en el riesgo a desarrollar esta patología. En este contexto, no se ha logrado clasificar a ciertos alimentos como protectores o dañinos debido a que existe una alta heterogeneidad en los efectos de diferentes tipos de alimentación, la que se debe, presumiblemente, a la heterogeneidad de la microbiota de cada individuo. Solo algunos alimentos, como las grasas saturadas, han registrado ser factor de riesgo para el desarrollo de la patología (3).

De la misma manera, la hipótesis de la higiene planteada por primera vez por Strachan et al. se ha estudiado con el fin de explicar la alta incidencia registrada en países más desarrollados y en zonas urbanas comparadas con sectores rurales. Estos estudios han sugerido que factores como tener una familia numerosa, beber leche no pasteurizada y convivir con animales desde edades tempranas, se relaciona de manera inversa al riesgo de desarrollar EII (3,6).

Otros factores referidos al estilo de vida han sido estudiados como elementos de riesgo para CU, como el estrés, el que ha sido asociado a una mayor producción de citoquinas pro inflamatorias por activación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal, la depresión y ansiedad que además han sido asociados a baja respuesta al tratamiento inmunosupresor, sumado a algunos trastornos del sueño que se relacionan con la reactivación de la patología (3).

#### II.4c Microorganismos

Por otro lado, algunos estudios han sugerido que la infección por ciertas bacterias como *Salmonella* o *Campylobacter* podrían asociarse al desarrollo de EII (14), sin embargo, también se ha demostrado un aumento en el riesgo a enfermar posterior a cuadros de gastroenteritis sin etiología bacteriana o viral. Respecto a esto, de lo que si se tiene claridad es que la infección por *Clostridium Difficile*, es la causa infecciosa más comúnmente asociada a reactivaciones de la CU, sobre todo en pacientes hospitalizados, registrándose en estos casos altos índices de mortalidad (3).

#### II.4d Fármacos

Algunos medicamentos como anticonceptivos orales, terapia hormonal de reemplazo y anti-inflamatorios no esteroideos se han asociado con riesgo aumentado de desarrollo de CU, no así el uso de antibióticos como factor modificador de la microbiota intestinal como podría suponerse (3,6).

Resulta interesante mencionar que, en el estudio de los factores de riesgo para el desarrollo de CU, se han identificado como factores fuertemente protectores: la lactancia materna prolongada, la exposición al tabaco y la apendicetomía en pacientes jóvenes. Así, se ha registrado que 2 a 5 años luego de cesar el consumo de tabaco aumenta el riesgo de CU y este se mantiene elevado por 20 años. Por otro lado, se ha visto que aquellos pacientes que se sometieron a apendicetomía por inflamación de este órgano y no por causas inespecíficas antes de los 20 años presentan una incidencia de CU marcadamente inferior (3).

#### II .5 TRATAMIENTO DE CU

El tratamiento de la CU sigue un esquema secuencial y el algoritmo farmacológico es variable entre pacientes, puesto que dependerá además de la severidad de la patología. Actualmente no existe una terapia universalmente efectiva, pero en todos los casos tendrá como objetivo principal reducir la inflamación en primera instancia para luego lograr y mantener la remisión promoviendo la regeneración de la mucosa intestinal. Esto con el fin de prevenir las complicaciones mencionadas y cirugías como la colectomía (9,15). Actualmente, las opciones de tratamiento disponibles incluyen aminosilicatos (5-ASA), inmunosupresores como la azatriopina y anticuerpos neutralizantes de TNF $\alpha$ . También, los glucocorticoides son usados ampliamente en el tratamiento de la CU para remitir el estado activo de la patología (16).

#### II.5a Uso de glucocorticoides en CU

Los glucocorticoides (GC), son el tratamiento anti-inflamatorio base y de primera línea en CU con actividad moderada o severa (2,15,17), de hecho, el tratamiento con GC orales como la prednisona ha mostrado ser el más efectivo en inducir remisión en un promedio de 7-14 días. El esquema farmacológico que habitualmente se utiliza en los pacientes con CU consiste en comenzar con dosis elevadas de corticoides orales (60 mg/día) e ir disminuyendo esta dosis en 10 mg semana a semana de manera paulatina hasta eliminarlos por completo. Esto porque estos fármacos son efectivos para inducir la inactivación de la patología, pero no son efectivos en el

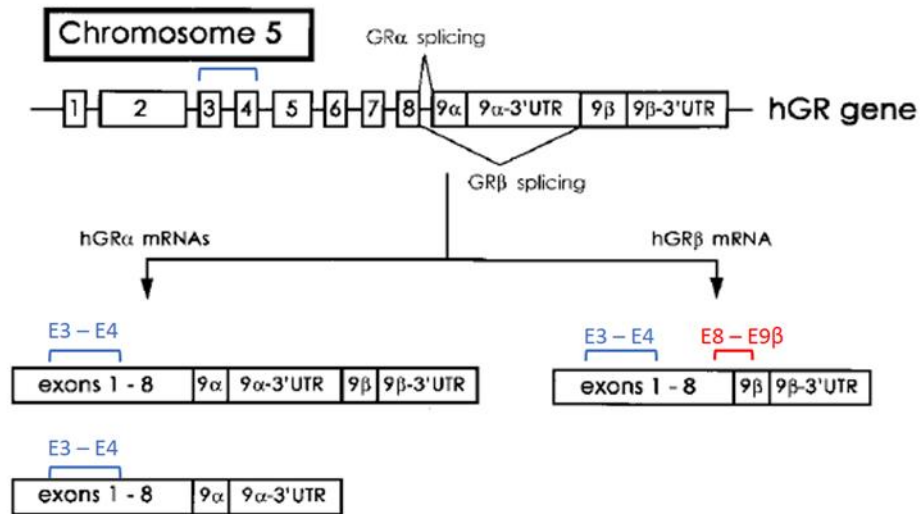


mantenimiento de la remisión y por lo tanto no se recomienda su administración sostenida en el tiempo (16,17). Sumado a lo anterior y no menos importante, se sabe que el uso de glucocorticoides a largo plazo puede provocar efectos secundarios perjudiciales llevando a complicaciones clínicas serias como osteoporosis, enfermedades metabólicas y aumentar el riesgo de enfermedades cardiovasculares (2,18). Sin embargo, es importante mencionar que a pesar de que más de la mitad de los pacientes con EII responden al tratamiento con GC alcanzando la remisión clínica y endoscópica, el 19% son refractarios o resistentes al tratamiento, lo que quiere decir que el GC no ejerce su efecto en el tejido blanco y por lo tanto no es posible inducir la remisión en estos pacientes mediante el tratamiento con corticoides y el 20% de los pacientes sometidos a terapia prolongada con GC se hacen dependientes del fármaco, lo que se manifiesta como una reactivación de la patología al llegar al periodo de dosis bajas de corticoides o pocas semanas después de terminado el esquema de tratamiento, esto se traduce en la necesidad de prolongar la terapia con GC para mantener la remisión de la patología, aumentando el riesgo de generar resistencia definitiva al tratamiento y un fenotipo clínico más agresivo de la EII (2,19).

## II .6 BASES MOLECULARES DEL TRATAMIENTO CON GC

Los GC exógenos, así como el cortisol endógeno, son altamente lipofílicos, lo que los hace ampliamente biodisponibles. Los GCs circulan por el torrente sanguíneo unidos a proteínas transportadoras, difundiendo pasivamente hacia el espacio intracelular para interactuar con su receptor (GR) un factor transcripcional que une hormonas, perteneciente a la familia de los receptores esteroidales nucleares (2).

El receptor de glucocorticoides (GR) es una proteína citosólica codificada por el gen NR3C1, el que consiste en 9 exones y puede codificar para múltiples isoformas proteicas por splicing alternativo de su último exón siendo  $\alpha$  y  $\beta$  las más estudiadas. Este último exón codifica para el dominio de unión a ligando (LBD) de GR y el 3'UTR, por esta razón las isoformas de GR son idénticas hasta el aminoácido 727, punto en el que divergen. Así, GR $\alpha$  tiene 50 aminoácidos adicionales que codifican para las hélices 11 y 12 del dominio de unión a ligando. En cambio, GR $\beta$  tiene solo 15 aminoácidos adicionales lo que le impide formar la hélice 12 del LBD (Fig 1).



**Figura 1. Diagrama del procesamiento alternativo del exón 9 en el gen NR3C1 (hGR) (cromosoma 5) y generación de las isoformas transcripcionales de GR $\alpha$  y GR $\beta$ .** Los exones se representaron como cajas y los intrones como líneas. Modificado de Pujols. L y cols (2001) (20)

(Se representa en azul la unión de la sonda Taqman para GR total (Exón3-Exón4) y en rojo la unión de la sonda Taqman para GR $\beta$  (Exón8- Exón9 $\beta$ ) – Metodología sección IV.5a)

La isoforma  $\alpha$  se encuentra en el citoplasma en ausencia de ligando y en presencia del mismo esta isoforma experimenta un cambio conformacional que le permite translocar al núcleo donde afecta la transcripción. Por su parte, la isoforma  $\beta$  es constitutivamente nuclear y no es capaz de unir agonistas. Por esta razón se ha concluido que GR $\beta$  tendría un efecto antagónico sobre la actividad de GR $\alpha$  proponiéndose incluso como un dominante negativo de GR $\alpha$ , ya que no es capaz de unirse a su ligando (GC), si no que se une solamente a los sitios de respuesta a GC (GRE) inhibiendo la transcripción de ciertos genes y causando probablemente la resistencia a GC (21,22)

Estos sitios de respuesta a glucocorticoides (GRE) se han definido como secuencias palindrómicas (GGAACAnnnTGTTCT) separadas por un espaciador de 3 nucleótidos. El complejo GR/GC se uniría a estas secuencias formando dímeros permitiendo que cada monómero se posicione en una de las secuencias palindrómicas (23).

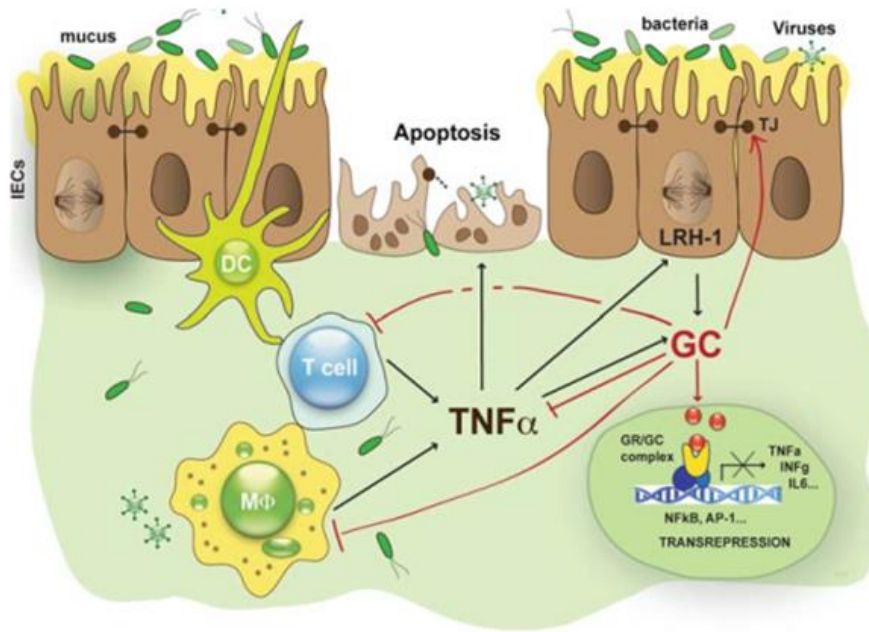
La acción anti-inflamatoria de los GCs, está dada por la capacidad del GC/GR de unirse a estos sitios GRE ubicados en los promotores de algunos genes. Esta unión induce un cambio

conformacional que permite el reclutamiento de co-reguladores y complejos de remodelación de cromatina que influyen en la actividad de la RNA polimerasa II activando o reprimiendo la transcripción de éstos genes. Por ejemplo, dicho complejo interactúa con factores de las vías inflamatorias como AP-1 o NFκB afectando su función e inhibiendo la producción de citoquinas pro-inflamatorias (IL1α, IL1β, IL6, IL12, TNFα, IFNγ, y otras) y aumentando la expresión de citoquinas anti-inflamatorias. A su vez, interactúa directamente con factores como STAT3, STAT5 y STAT6 inhibiendo la expresión de genes inflamatorios (2,15).

Sumado a lo anterior, los GCs son potentes inductores de la apoptosis de células inmunes (linfocitos T y B), inhibiendo la expresión de moléculas anti-apoptóticas reguladas por NFκB e induciendo pro-apoptóticas mediante Bim (15). Además, promueven un perfil de macrófagos tolerogénicos (M2) (2,15).

Cabe destacar, que también se ha descrito exhaustivamente en estos tipos celulares y otros como los cardiomiocitos, la inducción de un gen conocido como Glucocorticoid induced Leucine Zipper (GILZ) mediada por GCs. Este gen estaría regulando igualmente la apoptosis y diferenciación celular por vías diferentes. Además, como es de esperarse, múltiples sitios GRE como los mencionados anteriormente han sido descritos en el promotor de este gen (24,25).

Por estas propiedades anti-inflamatorias e inmunoregulatoras mencionadas, que se resumen esquemáticamente en la Fig 2. es que los GCs son ampliamente utilizados en la clínica y han resultado altamente efectivos en el tratamiento de las EII.



**Figura 2. Diagrama representativo del efecto de los GCs en las células epiteliales intestinales (IECs).** Se muestra la capacidad de las células T y de los macrófagos de inducir la producción de TNF  $\alpha$  inducidas por las células presentadoras de antígeno (DC). Este factor desencadena un proceso inflamatorio el que produce la apoptosis celular por un lado y la producción de GC endógenos por otro. Estos GC producidos serán capaces de formar complejos con su receptor (GR) que migrarán al núcleo para unirse a promotores de genes antiinflamatorios como NF $\kappa$ B y AP-1. Por otro lado, se sugiere la capacidad de TNF $\alpha$  de inducir LRH-1, factor que también comanda la producción endógena de GC. Esquema modificado de Noti M. y cols (2009) (26).

## II .7 BASES GENÉTICAS Y MOLECULARES DE LA RESISTENCIA/DEPENDENCIA A GC

Respecto a las posibles causas genéticas o moleculares de las respuestas de resistencia o dependencia al tratamiento con GC, polimorfismos (SNPs) en ciertos genes podrían alterar en diferentes niveles la vía de producción de cortisol inducida por el tratamiento (2,27). Así, la presencia de SNPs en NR3C1 (el gen que codifica GR), explicarían cambios conformacionales en esta proteína que afectarían el proceso de transactivación. De la misma manera, los polimorfismos en MDR1 (gen que codifica para P- glicoproteína), explicarían la sobreexpresión de ésta misma que es la encargada de la absorción, distribución, metabolismo y excreción de fármacos como los GC y actúa como bomba de eflujo, por lo que una sobreexpresión de ésta podría explicar la respuesta alterada al tratamiento de algunos pacientes debido a que la dosis de glucocorticoide recibida no está pudiendo ejercer su acción en el tejido blanco (2,18,28).

Además, estos tipos de respuesta al tratamiento han sido asociados a la sobreexpresión de citoquinas pro- inflamatorias (IL6 e IL8), expresión disminuida de otras anti-inflamatorias (IL10), y a disminución en los niveles de EBF (factor transcripcional del mecanismo anti-inflamatorio de TGF $\beta$ ) (29). Lo que explicaría molecularmente el fenotipo agresivo de la patología que se desarrollaría luego de someter a pacientes que manifiestan este tipo de respuestas a tratamiento con GC

Adicionalmente, niveles en la expresión de la isoforma  $\beta$  de GR elevados por sobre la  $\alpha$  han sido detectados en linfocitos y en mucosa inflamada de pacientes con colitis ulcerosa resistentes o dependientes al tratamiento con GC, por lo que la razón GR $\beta$ /GR $\alpha$  aumentada se ha relacionado e incluso propuesto como un predictor de una mala o no respuesta a glucocorticoides en estos pacientes (30,31). Además, la activación de NF $\kappa$ B inducido por TNF $\alpha$  (identificado como un factor promotor de la enfermedad) (15,32), altera los niveles de las isoformas de GR, produciendo una razón GR $\beta$ /GR $\alpha$  aumentada de manera tiempo y dosis dependiente en células epiteliales. Esto, sumaría a lo anterior una posible participación de TNF $\alpha$  en la resistencia o dependencia al tratamiento con GC (33).

## II .8 ESTEROIDOGÉNESIS

A pesar de que, la producción de cortisol endógeno ha sido restringida solamente a la glándula suprarrenal y las gónadas; en los últimos 20 años el cerebro, el pulmón, el timo, la piel, el hígado y el intestino han sido descritos también como órganos esteroideogénicos.

### II.8a Esteroidogénesis adrenal

Respecto a lo que se sabe sobre la vía esteroideogénica adrenal, se ha visto que, así como fue descrito como mecanismo general, el receptor citoplasmático de glucocorticoides (GR por sus siglas en inglés, glucocorticoid receptor) interactúa con GC en primera instancia y que luego este complejo GC/GR trasloca al núcleo para unirse a secuencias promotoras de ciertos factores transcripcionales que tengan elementos de respuesta a GC (GRE). Mediante este mecanismo es que se activa la vía de síntesis de cortisol a partir de colesterol mediante la inducción de la expresión de varias enzimas esteroideogénicas de la familia del citocromo P450. Entre estas enzimas están los genes CYP11A1 y CYP11B1, que codifican para la enzima P450 ssc y la enzima 11  $\beta$ -hidroxilasa. Estas enzimas participan en la transformación de colesterol a pregnolona y de 11-deoxicortisol a cortisol (corticosterona en murinos), respectivamente.

Adicionalmente, se ha reportado que la expresión de estas enzimas es controlada en la glándula adrenal por un factor transcripcional perteneciente al grupo A de los receptores nucleares de la subfamilia 5 codificado por el gen NR5A1, llamado SF-1 (Steroidogenic Factor 1) (15,32).

Es importante mencionar que, en situaciones fisiológicas, los GC liberados están involucrados también en procesos metabólicos como la regulación de la glicemia, de la presión sanguínea y la liberación de insulina (15).

## II.8b Esteroidogénesis intestinal

En primer lugar, es necesario recordar que el tracto intestinal tiene una amplia superficie, que está en contacto permanente tanto con antígenos provenientes de la dieta como con bacterias de la microbiota intestinal y potenciales patógenos y que este espacio luminal está separado del tejido intestinal estéril sólo por una delgada capa de células epiteliales (CEIs). Esto representa un riesgo constante, ya que la integridad de la barrera epitelial puede ser alterada permitiendo la invasión de bacterias (tanto de la microbiota intestinal como patógenas externas) hacia el tejido intestinal pudiendo causar bacteremia. Por otro lado, el contacto directo con los antígenos mencionados y las células inmunes innatas, que se encuentran en abundancia en las capas epiteliales y sub-epiteliales del intestino, lleven a una estimulación crónica de las células inmunes intestinales desencadenando desordenes inflamatorios, como las EII (15).

Por esta razón, resulta crítico para el sistema inmune intestinal mantener una comunicación estrecha entre el epitelio y las células de la inmunidad innata y adaptativa, para garantizar un balance apropiado entre las respuestas inmunes protectoras y la tolerancia inmunológica, con el fin de evitar un daño innecesario asociado a procesos inflamatorios (15).

De hecho, las células epiteliales de la mucosa intestinal se consideran una de las principales fuentes extra- adrenales de GC sintetizados *de novo*, debido a la presencia tanto de las enzimas que participan en la síntesis de cortisol como por la detección de esteroides bioactivos en la mucosa intestinal (34). Esto sugiere que, en condiciones patológicas, la esteroidogénesis es un contribuyente directo al mantenimiento de la homeostasis intestinal, actuando en la inmunoregulación y participando además en procesos antiinflamatorios. Por esta razón, es que fallas en este potencial esteroidogénico intestinal ha sido íntimamente ligado a la patogénesis de las EII (34).

Tanto en líneas celulares epiteliales de colon como en biopsias de colon humano se ha detectado la presencia de las enzimas esteroidogénicas y también se ha podido comprobar la producción

y secreción de cortisol por este tipo celular (32,35). Estos y otros experimentos han sugerido por tanto que la mucosa humana es capaz de producir GC y que estos tendrían efectos locales. Sin embargo, el factor transcripcional SF-1 que, como se discutió anteriormente, comanda la expresión de las enzimas esteroidogénicas en la glándula adrenal, no se expresa en células epiteliales intestinales. En su lugar se ha detectado la expresión elevada en las criptas intestinales de LRH-1 (Liver receptor homologue -1) codificado por el gen NR5A2, factor que presenta alta homología de secuencia con SF-1 además de ser capaz de unirse a secuencias de consenso idénticas y en consecuencia, posee actividades transcripcionales similares (15,32,34). En estudios realizados por Coste et al, se evidenció que ratones mutantes con expresión reducida de LRH-1 intestinal de manera tejido-específica, eran más susceptibles a la colitis inducida experimentalmente con compuestos como el sulfato de sodio dextrano (DSS) (15). Además de esto, una expresión reducida de LRH-1 se observó en biopsias de tejido intestinal inflamado de pacientes con CU y EC, sugiriendo que la presencia de LRH-1 es un factor protector en el desarrollo de las EII (36). Sumado a lo anterior, estudios realizados por Bayner et al, en organoides intestinales humanizados de ratón y organoides humanos de pacientes con IBD comprobaron que la falta de expresión de LRH-1 en estos organoides aumentó la muerte celular y disminuyó la viabilidad de los organoides, afectando notablemente la integridad de la barrera epitelial, la que fue recuperada al expresar nuevamente dicho factor transcripcional (37). Además, los resultados obtenidos por este grupo en modelos de ratón con colitis inducida al sobreexpresar el factor LRH-1 refuerzan la idea de que este factor tiene efectos anti-inflamatorios fundamentales en la recuperación de la mucosa intestinal en el contexto de una EII (37).

Además, niveles notablemente reducidos de mRNA de CYP11A1 y CYP11B1 se encontraron en estas biopsias de tejido inflamado y por lo que, este y otros estudios han permitido sugerir que, LRH-1 actúa como regulador de la expresión de las enzimas esteroidogénicas mencionadas en las células epiteliales de la mucosa intestinal humana y que esto tendría implicancias en la patogénesis, prevención y tratamiento de las EII (34,36).

Además de lo anterior, otras funciones relacionadas de LRH-1 han sido estudiadas, tales como, por ejemplo, la regulación de la proliferación celular en las criptas intestinales mediante la inducción de la expresión de ciclina C1 y E1 y que, en consecuencia, podría estar involucrado además en el desarrollo de tumores epiteliales intestinales (15).

De esta manera, la expresión tanto de LRH-1 como de las ciclinas y enzimas esteroidogénicas

que éste induce, están restringidos a células epiteliales proliferativas de las criptas intestinales (15). Esta expresión disminuye gradualmente a medida que las células se diferencian en las cercanías de la punta de la microvellosidad. Por esto, se concluye que la síntesis de GC estaría ocurriendo en las células madres epiteliales, contribuyendo así a la mantención de la integridad de la barrera epitelial. Ya que, sumado a esto, se ha registrado la inducción de proteínas propias de las uniones estrechas en la barrera epitelial mediada por LRH-1 (15).

Todo lo anterior hace posible afirmar que LRH-1 estaría regulando la integridad de la barrera epitelial y la homeostasis mediante dos mecanismos: la producción de GC antiinflamatorios que previenen el daño epitelial ocasionado por la respuesta inmune y acelerando la reparación epitelial aumentando la proliferación de células madre progenitoras en las criptas intestinales e induciendo la expresión de proteínas de uniones estrechas (32).

Considerando el contexto dado por toda la información expuesta, es necesario destacar la importancia de profundizar en el estudio de las terapias disponibles para el tratamiento de la CU, sobre todo dada la variabilidad de respuesta frente a los tratamientos farmacológicos (9) y la dificultad de establecer un algoritmo o protocolo terapéutico universalmente efectivo y seguro.

Teniendo en cuenta que actualmente el tratamiento más efectivo en inducir la remisión de la patología en pacientes con CU activa son los GC (2,15,17), que disminuyen el cuadro inflamatorio y mantienen la homeostasis inmunológica, esta tesis plantea la premura de determinar los mecanismos moleculares que comandan la producción de cortisol a nivel intestinal puesto que estos afectarían directamente la regeneración de la mucosa en pacientes con CU que reciben este tratamiento. Además, se hace relevante caracterizar este mecanismo a nivel de la mucosa intestinal de pacientes con CU, ya que las posibles diferencias en esta vía podrían explicar las diferentes respuestas al tratamiento.

En resumen, al considerar los antecedentes de los que se dispone en cuanto a la existencia de esteroidogénesis local a nivel intestinal y la expresión de moléculas como GR, LRH-1 y las enzimas esteroidogénicas del CYP450 (15,32,34–36) y además, tomando en cuenta el gran porcentaje de pacientes que presentan resistencia o dependencia al tratamiento y la posible relación de estas respuestas con alteraciones moleculares y/o genéticas en la vía de producción de cortisol a nivel intestinal (2) es que este trabajo plantea como hipótesis que *los glucocorticoides inducen la expresión de LRH1 y la activación de la vía esteroidogénica intestinal.*



La utilidad e interés de este estudio radica en primer lugar en contribuir al entendimiento de la vía esteroidogénica a nivel intestinal (expresión de sus moléculas reguladoras) en un contexto asociado a CU, lo que además podría acercarnos hacia la comprensión del mecanismo molecular involucrado. Sumado a lo anterior, la importancia clínica de esta tesis abarca la probabilidad futura de poder anticipar (mediante exámenes de laboratorio), el tipo de respuesta que tendrá el paciente al tratamiento con GC. Este conocimiento permitiría optimizar el uso de glucocorticoides evitando el padecimiento innecesario de efectos adversos al tratamiento debido a su larga duración. De esta manera, podrían implementarse en el futuro intervenciones que permitan acercarse a una terapia personalizada para esta patología.

### **III.1 HIPÓTESIS**

**Los glucocorticoides inducen la expresión de LRH1 y la activación de la vía esteroidogénica intestinal.**

### **III.2 OBJETIVO GENERAL**

**Determinar el efecto de los glucocorticoides sobre la expresión de LRH1 y la activación de la vía esteroidogénica intestinal y la relación de los componentes de esta vía en la mucosa de pacientes con CU con la respuesta a la terapia con GCs**

### **III.4 OBJETIVO ESPECÍFICOS.**

- 1. Determinar la regulación de la vía esteroidogénica intestinal por GCs en la línea celular epitelial de colon humano.**
- 2. Caracterizar los componentes de la vía esteroidogénica y evaluar producción de cortisol dependiente de la regulación de GR/LRH1 inducida por dexametasona en la mucosa intestinal de pacientes con CU clasificados según su respuesta al tratamiento con GC.**

**1. Determinar la regulación de la vía esteroidogénica intestinal por GCs en la línea celular epitelial de colon humano.**

**Racional:** Resultados previos de nuestro laboratorio confirman la existencia de sitios GRE putativos en el promotor de LRH-1, este trabajo de tesis propuso determinar la regulación directa de la expresión del LRH-1 y activación de la vía esteroidogénica mediante GCs en un modelo de línea celular intestinal epitelial de colon humano (Ccd841CoN). Para ello, la capacidad esteroidogénica y la regulación de los componentes involucrados en esta vía inducida por GCs fue determinada en la línea celular Ccd841CoN.

**1.a Cuantificar la producción de cortisol en condiciones basales y posterior al tratamiento con**

dexametasona en los sobrenadantes de los cultivos de las células Ccd841CoN mediante ELISA.

1.b Determinar la expresión génica de los componentes de la vía esteroidogénica inducida por dexametasona mediante qPCR en células Ccd841CoN.

1.c Determinar la expresión proteica de LRH-1 inducida por dexametasona mediante Western Blot en células epiteliales intestinales (Ccd841CoN).

1.d Analizar la interacción entre GR y promotor de LRH-1 mediada por GC mediante inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) en la línea celular de colon humano.

## **2. Caracterizar los componentes de la vía esteroidogénica y evaluar producción de cortisol dependiente de la regulación de GR/LRH1 inducida por dexametasona en la mucosa intestinal de pacientes con CU clasificados según su respuesta al tratamiento con GC.**

**Racional:** Debido a que la producción de cortisol, la presencia de las enzimas responsables de este proceso y expresión del factor regulador LRH- 1 elevada han sido demostradas en la mucosa intestinal humana, en esta tesis se propuso caracterizar estos componentes en la mucosa intestinal de pacientes con CU (expresión de los transcritos) en los diferentes grupos de pacientes, clasificados según su respuesta a la terapia con GCs.

2.a Cuantificar la producción de cortisol en condiciones basales y posterior al tratamiento con dexametasona y bloqueadores farmacológicos específicos contra GR y LRH-1 (RU486 y SR1848, respectivamente) en los sobrenadantes de los explantes de mucosa intestinal cultivados *ex vivo* mediante ELISA.

2.b Determinar la expresión de los componentes de la vía esteroidogénica (GR total, GR $\beta$ , LRH-1, CYP11A1 y CYP11B1) a nivel de transcrito mediante qPCR, en la mucosa intestinal de pacientes con CU.

## **IV. METODOLOGIA**

### IV.1 PACIENTES

#### IV.1.a. Calculo del tamaño muestral

Para una correlación estadística entre variables (estimada en rho de 0,6; error alfa de 0,025 y error beta= 0,10), y considerando una pérdida de muestras estimada en un 10%, el tamaño muestral calculado resultó de 30 en total, es decir, 10 pacientes por grupo y 10 individuos sanos. Sin embargo, debido al tiempo disponible para la realización de este proyecto de tesis, el presente se plantea como un estudio piloto o de prueba de concepto donde se reclutó el mayor número de pacientes posible en el plazo de 1 año.

#### IV.1.b. Descripción general del estudio

El presente es un estudio prospectivo longitudinal analítico observacional y a su vez experimental en el que participaron pacientes chilenos sometidos a colonoscopia, de ambos géneros, mayores de 18 años, con CU activa que presentaron debut o reactivación de la patología.

Como criterios de inclusión para los pacientes se consideró a individuos diagnosticados con CU en estado activo con un índice de Mayo  $\geq 2$ , basándose en parámetros clínicos, endoscópicos e histológicos y que reciban, luego de la toma de las primeras biopsias (durante la 1<sup>ra</sup> colonoscopia), un tratamiento con glucocorticoides. El esquema de tratamiento establecido indica prednisona oral, durante 14 semanas, con una dosis inicial de 60mg al día, la que paulatinamente va disminuyendo (Figura 3). Fueron excluidos del estudio aquellos pacientes que presenten alguna de las siguientes características: EII no clasificable, enfermedades autoinmunes, alergias alimentarias severas, enfermedad celíaca, diverticulitis, síndrome de intestino irritable o alguna infección al momento de la evaluación. Se respetaron los criterios de inclusión y exclusión especificados en **Anexo 1**.

También se consideró un grupo control, correspondiente a individuos sanos de los que se obtengan biopsias tomadas en colonoscopia de control por pesquisa o antecedentes de cáncer

de colon.

El estudio es unicéntrico puesto que los pacientes fueron reclutados de Clínica Las Condes (CLC, Las Condes, Santiago, Chile).

La información del tratamiento recibido (fármaco, dosis, tiempo) fue obtenido a partir de la historia clínica (con la cooperación de la Enfermera Investigadora Daniela Simian en CLC.) utilizando plataforma RedCap (Research Electronic Data Capture, Universidad de Vanderbilt, USA)

La información respecto a las características anatomopatológicas de las biopsias colonoscópicas tomadas de los pacientes enrolados en este estudio fue obtenida a partir del análisis realizado por el Dr. Juan Carlos Roa (jefe del departamento de anatomía patológica de la Escuela de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile).

La información de los pacientes reclutados para este estudio se detalla en la Tabla 4.

#### IV.1c Descripción de los grupos (38)

Los pacientes enrolados en el estudio fueron clasificados como:

**Respondedores:** Alcanza la remisión clínica luego de 1 a 2 semanas de tratamiento con dosis plenas (0,75 mg/kg/día de prednisolona o 1 mg/kg/día de prednisona, o equivalente) y no presenten reactivación hasta transcurridos más de 3 meses desde finalizado el esquema de tratamiento.

**Refractarios:** Situación de actividad clínica a pesar de tratamiento durante 1 semana con dosis plenas (0,75 mg/kg/día de prednisolona o 1 mg/kg/día de prednisona, o equivalente).

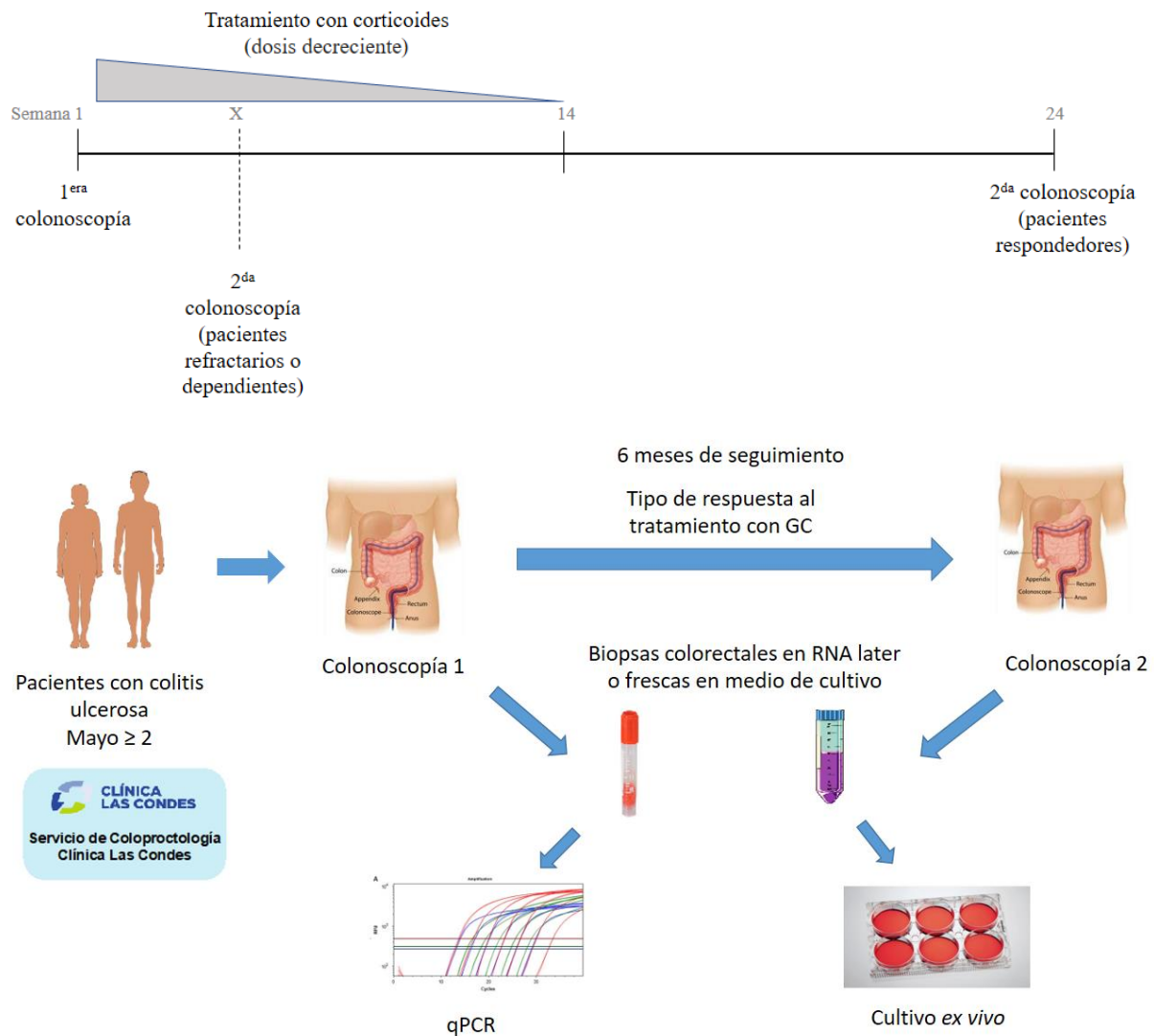
**Dependientes:** Imposibilidad de disminuir la dosis de corticoides por debajo de 10 mg/día de prednisona (o equivalente) tras inicio del tratamiento con corticoides por reactivación o recidiva dentro de los primeros 3 meses de haber suspendido los corticoides.

**Individuos Sanos:** Individuos que acudieron al servicio de salud para realizarse colonoscopia de control por antecedentes familiares de cáncer colorectal. No se consideraron aquellos con anomalías endoscópicas o histológicas.

#### IV. 1d Obtención de las muestras

Las biopsias intestinales fueron tomadas de la mucosa inflamada de pacientes con CU (entre 6

a 8 muestras por paciente) mediante colonoscopia, posterior aceptación de consentimiento informado (**Anexo 2**), y fueron recibidas en medio de cultivo DMEM/F12 (suplementado con gentamicina, normocina y fungizona para su transporte y posterior tratamiento *ex vivo* según lo descrito en 3.b), o en RNA later (para la posterior extracción de RNA y análisis de transcritos según lo descrito en 4.a y 5.a, respectivamente). Una vez transcurridos o durante los 6 meses de seguimiento del paciente (dependerá del tipo de respuesta al tratamiento), una segunda colonoscopia fue realizada y las biopsias obtenidas fueron tratadas como descrito previamente (Fig 3).



**Figura 3. Flujograma para la toma de muestras de pacientes con CU participantes en el estudio.** Unidad de tiempo expresada en semanas (superior)

## IV. 2 CULTIVO CELULAR

### IV.2a Condiciones de cultivo

La línea celular colorectal epitelial embrionaria humana Ccd841CoN (gentilmente donada por el Dr. Julio Tapia, Universidad de Chile) fue utilizada para los ensayos *in vitro* y fueron cultivadas en medio Modified Eagle's medium (MEM Gibco-Life Technologies, NY, USA), suplementado con 10% suero fetal bovino (HyClone Laboratories, GE Healthcare Life Sciences, Utah, USA) y 1% penicilina/estreptomicina (Gibco).

### IV.2b Cálculo de número de células

Las células fueron desagregadas utilizando Tripsina EDTA (Gibco) 1X (inactivada con el medio de cultivo correspondiente a la línea celular), posteriormente fueron centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos, el pellet obtenido fue resuspendido en 1ml de medio de cultivo y las células fueron contadas en cámara de Neu-Bauer (aplicando el factor de multiplicación 20.000 al recuento promedio de los cuatro cuadrantes).

$1 \times 10^6$  células/pocillo fueron sembradas en placas de 6-pocillos en 1 mL de medio de cultivo 24 horas antes de incorporar los estímulos (descrito en 3.a.)

## IV. 3 TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS

### IV.3a Tratamiento líneas celulares

Aproximadamente 10 horas después de sembradas, el medio de las células fue cambiado por MEM, suplementado con 1% de suero bovino libre de GC y 1% penicilina/estreptomicina. Las células se mantuvieron con este medio durante toda la noche y durante las horas de tratamiento. Al día siguiente del cambio de medio las células fueron tratadas con dexametasona (Steraloids, Inc. Newport, RI, USA) a una concentración de 100 nM (biológicamente activa para experimentos *in vitro* como los descritos en esta sección y *ex vivo* como los descritos en la sección 3.b (39) por 0-24 horas (dependiendo del objetivo, es decir, para determinar la

expresión a nivel de transcrito o de proteína). Además, para demostrar la participación de GR en el proceso, las células fueron tratadas con RU486 (Steraloids, Inc. Newport, RI, USA) a una concentración 10  $\mu$ M, en combinación con dexametasona (las células fueron incubadas con el antagonista de GR una hora antes del estímulo con dexametasona. Además, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de dexametasona: 10 nM y 1000 nM.

#### IV.3b Tratamiento biopsias colonoscópicas

Las biopsias colonoscópicas (transportadas en medio de cultivo DMEM/F12) fueron lavadas en una dilución en PBS de los mismos antibióticos contenidos en el medio de cultivo (gentamicina, normocina y fungizona) para posteriormente ser cortadas en 6 muestras de tamaños idénticos (0,5 mm), distribuidas una a una en 6 pocillos en 350  $\mu$ L de medio de cultivo (DMEM/F12 sin suero) e incubadas con dexametasona 100 nM durante 24 horas, dexametasona 100 nM en co-tratamiento con RU486 10  $\mu$ M, dexametasona 100nM en co-tratamiento con SR1848 (Merck, Sigma Aldrich, USA) 20  $\mu$ M, ambos bloqueadores por si solos, y un pocillo control sin tratamiento (ambos bloqueadores fueron agregados al cultivo una hora antes que el estímulo con dexametasona).

#### IV.3c Cuantificación de cortisol

El sobrenadante (explantes o células tratados) fue extraído, purificado mediante centrifugación y almacenado a -80°C para posteriormente realizar la detección de cortisol mediante ELISA, utilizando el kit comercial DetectX Cortisol enzyme immunoassay kit (Arbor Assays, Ann Arbor, MI, USA, Cat. K003-H5) según las instrucciones del fabricante. En breve, estándar o muestras (50  $\mu$ L) fueron agregadas por duplicado en placa de 96 pocillos, el buffer de ensayo (75 o 50  $\mu$ L) fue agregado a los pocillos de uniones inespecíficas y a los pocillos de máximas uniones específicas, respectivamente. Luego, DetectX Cortisol Conjugate (25  $\mu$ L) y DetectX Cortisol Antibody (25  $\mu$ L) fueron agregados en todos los pocillos (excepto en aquellos de uniones inespecíficas). A continuación, la placa fue sometida a agitación mecánica durante una hora a temperatura ambiente, posteriormente lavada y secada (utilizando toallas absorbentes) para



agregar a continuación 100  $\mu$ L del sustrato TMB a cada pocillo e incubar por 30 minutos sin agitación. La reacción fue detenida agregando 50  $\mu$ L de la solución de detención a cada pocillo y la densidad óptica para el cortisol fue medida en el lector de placas Synergy 2 (BIOTEK® Instruments Inc., Winooski, VT, USA) a 450 nm luego de 15 minutos de detenida la reacción. La concentración de cortisol en cada pocillo fue calculada de acuerdo a las instrucciones del fabricante usando la curva estándar.

Es importante destacar, que el límite de detección de este kit se ha determinado en 45,4 pg/mL y la sensibilidad en 27,6 pg/mL.

#### IV. 4 EXTRACCIÓN DE ARN

##### IV.4a Extracción de ARN desde biopsias colonoscópicas usando columnas

Las biopsias colonoscópicas tomadas de los pacientes que fueron almacenadas en RNA later y a  $-80^{\circ}\text{C}$  fueron procesadas para la extracción del ARN usando RNeasy Kit, Qiagen Inc, Thermo Fisher.

Previo a la extracción, el tejido fue lisado y homogenizado mediante disrupción mecánica utilizando perlas de lisis. Posterior a eso se continuo con el protocolo del kit según lo especificado por el fabricante, en breve, el tejido lisado mediante disrupción mecánica y por acción del buffer de lisis contenido en el kit es separado y purificado utilizando columnas de afinidad incluidas en el kit para finalmente, ser eluido desde la columna de purificación utilizando agua libre de nucleasas.

##### IV.4b Extracción de ARN de células Ccd841CoN utilizando Trizol

Luego de que las células fueron cultivadas y tratadas con dexametasona durante 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 y 48 horas, para la realización del análisis de la temporalidad completa y durante 2,4 y 6 horas cuando se analizó la expresión temprana de los componentes de la vía estoroidogénica y el efecto del bloqueador RU486 sobre el mismo. A continuación, el RNA total fue extraído a partir de las células tratadas según lo descrito en 3.a, mediante la técnica con Trizol (Ambion, Life Technologies, Carlsbad CA, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En breve,

luego del tratamiento con Trizol y la homogenización mecánica del tejido, éste fue tratado con 100  $\mu$ L cloroformo para separar el RNA del resto de los componentes celulares mediante centrifugación a 13000 rpm por 15 minutos, la fase acuosa fue extraída y tratada con 250  $\mu$ L de isopropanol el que se utiliza para precipitar el RNA, luego de centrifugaciones a bajas temperaturas, el pellet fue lavado con etanol y finalmente resuspendido en agua libre de nucleasas.

#### IV.4c Cuantificación ARN

El ARN obtenido se cuantificó mediante absorbancia a 260 nm en el equipo Synergy 2 (BIOTEK® Instruments Inc., Winooski, VT, USA) y el posterior análisis de su integridad se realizó utilizando gel de agarosa al 1%. Una vez comprobada su integridad, se procedió con el tratamiento con DNasa para el ARN extraído según lo descrito en 4.d y a continuación con la reacción enzimática necesaria para la obtención de cDNA utilizando la enzima AffinityScript Multitemp- RT, con 2  $\mu$ g de RNA y reactivos según las instrucciones del fabricante.

#### IV.4d Tratamiento con DNasa

Luego de obtenido el RNA y comprobada su integridad; y antes de realizar la reacción de obtención de cDNA, el total del RNA extraído fue tratado con la enzima Turbo DNasa (Ambion Lifetech). La reacción enzimática fue incubada 30 minutos a 37°C, para posteriormente ser detenida con 2  $\mu$ L del reactivo de inactivación (Ambion), e incubada por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente la mezcla fue centrifugada a 1200 rpm por 1,5 minutos y el sobrenadante fue transferido al tubo definitivo. La concentración de RNA fue re calculada en base al nuevo volumen obtenido después del tratamiento con DNasa.

### IV. 5 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE TRANSCRITOS.

#### IV.5a RT-qPCR mediante sondas Taqman y Sybr Green

100 ng de cDNA fueron utilizados para las reacciones de qPCR para cada gen (GR total, GR $\beta$ , LRH-1, CYP11A1 y CYP11B1; para GR (Hs00353740\_m1), GR $\beta$  (Hs00354508\_m1) y LRH-

1 (Hs00892377\_m1), el método de sondas Taqman, ThermoFisher fue utilizado para la amplificación y, para las enzimas esteroideogénicas CYP11A1 y CYP11B1, qPCR mediante partidores específicos y el reactivo SybrGreen (Agilent). La cuantificación de los correspondientes genes constitutivos para cada técnica utilizada (PPIB para Taqman y 18S para SybrGreen) fue determinada. La reacción de RT-qPCR fue realizada utilizando el equipo Real Time PCR System (Agilent Tech) y las sondas Taqman o primers (correspondientes para cada gen y los reactivos necesarios en cada caso según las instrucciones del fabricante). Para el caso de los genes cuantificados mediante SybrGreen, 10µL de reactivo SYBRGreen Master Mix (Agilent), 1 µL de partidor forward (5'- GTGGAGCGATTTGTCTGGTT-3' , 5'-TGGCTGCATGGGACGTGATTTT-3' y 5'-TTGCTGAATGGGCCTGAAT-3' ,para 18S, CYP11A1 y CYP11B1, respectivamente), 1 µL de partidor reverse (5' CGCTGAGCCAGTCAGTGTAG-3', 5'- TCCTCGAAGGACATCTTGCTGTCT-3' y 5'-GCCAAGTTGCTGGCTTCTAT-3', para 18S, CYP11A1 y CYP11B1, respectivamente), 100 ng de cDNA y agua libre de nucleasas fueron utilizados para llevar a cabo la reacción de qPCR para el gen de 18S, CYP11A1 y CYP11B1, respectivamente. Las condiciones de amplificación para estos genes mediante SybrGreen fueron 95°C por 60 segundos al inicio, seguido de 45 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 60 segundos y 72°C por 15 segundos.

Para los genes cuantificados utilizando sondas Taqman, 10 µL de Taqman Universal Master Mix NO UNG (ThermoFisher), 1 µL de la sonda correspondiente y agua libre de nucleasas se utilizaron para llevar a cabo la reacción de qPCR, para la que se aplicó el perfil de temperatura como sigue; 30 segundos a 25°C, 10 minutos a 95°C y 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C.

Para facilitar la comprensión de las diferencias metodológicas entre las técnicas utilizadas, lo anterior ha sido resumido en la Tabla 1.

	Técnicas de RT-qPCR utilizadas	
	SybrGreen	Taqman
Fundamento	Unión inespecífica de fluorocromos	Oligonucleótido con fluoróforo. Sistema FRET
Reactivos	SYBRGreen Master Mix	Taqman Universal Master Mix
	Primer Forward	Sonda Taqman
	Primer Reverse	Agua libre de nucleasas
	Agua libre de nucleasas	cDNA
	cDNA	
Gen constitutivo de referencia	Subunidad ribosomal 18S	PPIB
Protocolo de T°	Dependiente del gen	Universal

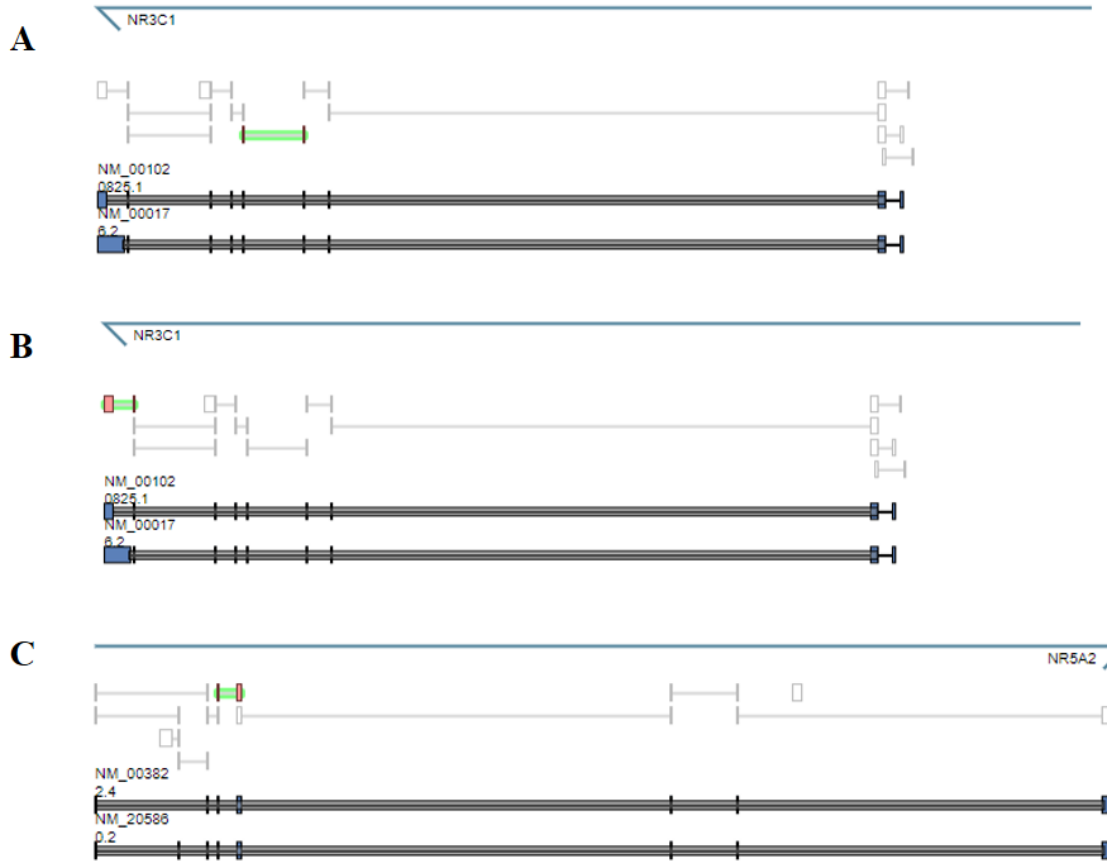
**Tabla 1. Comparación entre los métodos de RT- qPCR utilizados.** Se describe el fundamento, los reactivos utilizados, el gen constitutivo utilizado como referencia y el protocolo de temperatura para las técnicas de qPCR mediante el reactivo SybrGreen o utilizando sondas Taqman.

Es importante destacar que la expresión de los genes determinados en cada modelo corresponde a:

Biopsias de tejido colorectal humano: GR total, GR $\beta$ , LRH-1, CYP11A1 y CYP11B1

Línea celular humanas Ccd841CoN: GR total, LRH-1, CYP11A1 y CYP11B1

El lugar de amplificación de las sondas Taqman utilizadas se especifica en la Fig 1 y Fig. 4 .



**Figura 4.** Mapa genómico de la zona amplificada utilizando las sondas respectivas para GRtotal (A), GRβ (B) y LRH-1 (C).

#### IV. 5b Determinación de la expresión relativa y/o veces de cambio respecto al control

A partir de los valores de Cq (ciclos de cuantificación) obtenidos en el equipo Stratagene Mx3000(p) (Agilent technologies) se aplicaron las siguientes fórmulas para calcular las relaciones.

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-\Delta Cq}$$

Donde,  $\Delta Cq = \Delta Cq$  gen de interés  $- \Delta Cq$  gen constitutivo

## IV. 6 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE CÉLULAS EN CULTIVO.

### IV.6a Extracción de proteínas mediante RIPA

Una vez que las células fueron cultivadas y tratadas durante 8 y 24 horas, el análisis de la expresión de los componentes de la vía esteroidogénica y el efecto del bloqueador farmacológico fueron evaluados. Las células fueron sometidas a agitación a temperatura ambiente durante 5 minutos con 100  $\mu$ L de buffer de lisis RIPA (Pierce®, Thermo Scientific, Meridian, USA) por pocillo para, a continuación, realizar la recolección mecánica del lisado celular, y luego sonicados (Microson™ Ultrasonic cell disruptor, Misonix, New York) en 2 ciclos de 20 segundos a una intensidad de 3A interrumpidos por lapsos de 1 minuto de enfriamiento en hielo. Posteriormente, las proteínas fueron almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su cuantificación

### IV.6b Cuantificación de proteínas

Las proteínas extraídas fueron cuantificadas por duplicado mediante el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay, Bio Rad®, Chile) en una placa de 96 pocillos (10  $\mu$ L por muestra), determinando su absorbancia por colorimetría en el equipo Synergy 2 (BIOTEK® instruments Inc. Winooski, VTA, USA) a 595 nm. En breve, 10  $\mu$ L de muestra y de los estándares de la curva preparada según las instrucciones del fabricante, fueron dispuestos en los pocillos de una placa de 96 pocillos. A continuación, 200  $\mu$ L del reactivo de Bradford provisto en el kit fueron agregados a cada pocillo. La placa se agitó durante un minuto para posteriormente ser incubada por 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  en estufa. Transcurrido el tiempo de incubación la placa fue leída en lector de placas Synergy 2 y la concentración de proteínas en las muestras fue determinada a partir de la lectura de absorbancia y la ecuación obtenida de la curva estándar.

## IV. 7 EVALUACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN BLOT

### IV.7a Western Blot para lisados de células en cultivo

Luego de cuantificadas las proteínas, éstas fueron denaturadas utilizando buffer de carga Lamelli (Bio-Rad) y sometiéndolas a hervor a 96°C por 5 minutos. Cabe destacar que además de los lisados proteicos de células Ccd841coN con los distintos tratamientos, se incluyó también una muestra de la proteína recombinante de LRH-1 (Novus Biologicals, human recombinant protein LRH-1/NR5A2 Nro cat.h00002494-p01), la que se sometió al mismo procedimiento. Posterior a eso, la cantidad de  $\mu\text{l}$  del lisado equivalente a 15  $\mu\text{g}$  de proteína fue cargado en gel SDS-PAGE al 10%, resuelto con una potencia de 80V por 30 minutos y 120V por los 60 minutos restantes. A continuación, la transferencia semi-seca (Trans-blot® turbo™) de proteínas hacia membrana de nitrocelulosa fue realizada aplicando 25V en 2 ciclos de 7 minutos cada uno. Posteriormente, la membrana fue bloqueada durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación con buffer de bloqueo al 0,5% (Odyssey®. LI-COR, NE, USA). Una vez transcurrida la hora de bloqueo la membrana fue incubada durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente, anti LRH-1 (NovusBio) y anti  $\beta$ -actina (Santa Cruz Biotechnology Dallas, TX, USA, Cat. Sc-4778) como control de carga. Los anticuerpos fueron diluidos en TBS-Tween 0,1% en proporciones de 1:1000 y 1:2000, respectivamente.

Al día siguiente, el anticuerpo primario fue lavado para a continuación incubar la membrana a temperatura ambiente por 1 hora con el anticuerpo secundario correspondiente, anticuerpo anti-mouse (ThermoFisher) y anti-rabbit (ThermoFisher) diluido en TBS-T 0,1% ambos en proporción 1:10.000.

Como último paso la membrana se reveló en revelador de quimioluminiscencia (Chemiscope) (Chemiscope 3400, Clinx Science Instruments co, Ltd, China) usando el kit revelador Supersignal® West picochemiluminescent substrate (Supersignal® West picochemiluminescent substrate, ThermoFisher Scientific, USA).

### IV.7b Cuantificación de proteína detectada mediante Western Blot

Las bandas reveladas en la membrana de nitrocelulosa, tanto a banda correspondiente a la proteína de interés (LRH-1) como a la proteína utilizada como control de carga ( $\beta$ -actina)

fueron cuantificadas utilizando el software Image J (US National Institutes of Health, Bethesda, ML, USA). La normalización de la carga se realizó mediante el cálculo de la razón LRH-1/actina para a partir de ella realizar el cálculo del porcentaje de expresión, considerando la condición control como 100%.

#### IV. 8 ESTUDIO INTERACCIÓN PROTEÍNA- DNA

IV.8a Análisis *in silico* de elementos de respuesta a glucocorticoides (GREs) en el promotor del gen de LRH-1 (NR5A2).

Un análisis bioinformático *in silico* utilizando los softwares JASPAR (University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark) y MotifTool (BMC Bioinformatics) revelaron la presencia de múltiples sitios putativos de respuesta a glucocorticoides (GRE) en la región promotora de LRH-1 utilizando la secuencia publicada en GenBank/EMBL (número de acceso FP002419 NR5A2\_1). Estos GREs fueron mapeados y analizados mediante múltiples alineamientos utilizando la secuencia de consenso como referencia mediante el software STAMP. A partir de las coincidencias y puntajes de alineamiento obtenidos por este software se seleccionaron 4 de los 11 GREs encontrados utilizando JASPAR (Tabla 2). El criterio para realizar la selección de los sitios GRE a evaluar se centró en el porcentaje de alineamiento de los GRE encontrados con la secuencia de consenso, lo que además se traduce en un puntaje o score absoluto el que también se tomó en consideración. Además de esto, se consideró la posición del GRE respecto al sitio de inicio de la transcripción, dándole prioridad a aquellos que se encontraran más próximos al TSS y que cumplieran con los criterios anteriormente expuestos.

A partir de esta información, se diseñaron partidores flaqueando estas zonas para su evaluación por qPCR (Tabla 3.)



3 putative sites were predicted with these settings (77%) in sequence named **pNR5A2**

Model ID	Model name	Score	Relative score	Start	End	Strand	predicted site sequence
MA0113.1	NR3C1	7.671	0.783529885679569	77	94	1	GAGACCAGCCTGGCCAAC
MA0113.1	NR3C1	7.671	0.783529885679569	546	563	-1	GAGACCAGCCTGGCCAAC
MA0113.1	NR3C1	7.270	0.775675749182888	1395	1412	-1	GAAAAAAAAAATCCAGA

8 putative sites were predicted with these settings (75%) in sequence named **pNR5A2**

Model ID	Model name	Score	Relative score	Start	End	Strand	predicted site sequence
MA0113.1	NR3C1	7.671	0.783529885679569	77	94	1	GAGACCAGCCTGGCCAAC
MA0113.1	NR3C1	6.864	0.76772368080969	282	299	1	AAAAAAAAATTGTTATTT
MA0113.1	NR3C1	7.671	0.783529885679569	546	563	-1	GAGACCAGCCTGGCCAAC
MA0113.1	NR3C1	6.474	0.760084994441346	646	663	1	AGAATAATAACTTATAA
MA0113.1	NR3C1	6.820	0.766861880296338	742	759	1	AGATAGATTGTGTTTTAG
MA0113.1	NR3C1	6.634	0.763218814489898	1217	1234	-1	AAGAGGACCCTGTTATAA
MA0113.1	NR3C1	6.498	0.760555067448629	1379	1396	-1	GAATTCATAAAGTTACAA
MA0113.1	NR3C1	7.270	0.775675749182888	1395	1412	-1	GAAAAAAAAAATCCAGA

**Tabla 2. Elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE) putativos identificados en la secuencia promotora de LRH-1 (pNR5A2) mediante análisis bioinformático (software JASPAR).** Se tabularon los resultados al configurar un 77% de homología con la secuencia de consenso (superior) y un 75% de homología (inferior). Se muestran los valores de puntajes otorgados por el software según los parámetros configurados (score, relative score), el inicio y término de la secuencia del GRE encontrada y la hebra de DNA donde se encontraría, de referencia (+) o complementaria (-)

#### IV. 8b Inmunoprecipitación de cromatina acoplada a qPCR

Las células Ccd841CoN fueron cultivadas ( $9 \times 10^6$  detallado en 2.a) y tratadas durante 2 horas con dexametasona (según 3.a), posteriormente fueron fijadas (PFA 1%, 10 minutos a temperatura ambiente), seguido de la detención de la reacción (glicina 1X, por 5 minutos). A continuación, el kit Magna ChIP™ A/G (Millipore, USA) fue utilizado para realizar la inmunoprecipitación. En breve, las células fueron precipitadas mediante centrifugación y posteriormente lisadas utilizando Buffer de lisis celular y homogeneizador mecánico *dounce* para obtener la fracción nuclear aislada en una solución con cOplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich). Posteriormente, se realizó la lisis nuclear utilizando Buffer de lisis nuclear. La cromatina fue fragmentada a intensidad alta en un sonicador con temperatura controlada a 4°C (Bioruptor 300, Diagenode, Sparta, NJ, USA) en 13 ciclos de 30 segundos de

sonicación cada 30 segundos de pausa. Luego de realizados los 13 primeros ciclos las muestras fueron incubadas en hielo por 10 minutos para continuar posteriormente con los 13 ciclos restantes

La cantidad y fragmentación de la cromatina fue evaluada tomando una alícuota de la muestra y realizando incubaciones con RNAasa A (Millipore, USA) a 37°C y Proteinasa K (Millipore, USA) a 62°C durante 30 y 120 minutos, respectivamente. Para posteriormente revelar la cromatina extraída en un gel de agarosa al 1% y confirmar la que la fragmentación de la cromatina se encuentre entre 100 y 500 pb.

Una vez realizado el paso anterior, se procedió con la inmunoprecipitación de la cromatina fragmentada. Para esto, se tomaron 3 alícuotas de la cromatina sonicada de cada una de las condiciones (control y dexametasona 2hrs) para inmunoprecipitar con 0,175 ng de anticuerpo anti-GR (Cell Signaling, Danvers, MA, USA, Cat.3660S) y 250 µg de anti-IgG (EMD Millipore) y como muestra “input”. La inmunoprecipitación se llevó a cabo incubando con el anticuerpo respectivo en conjunto con 20 µL de perlas magnéticas conjugadas con proteína A/G (Millipore, USA) durante toda la noche. Al día siguiente, se separó la cromatina de las perlas magnéticas utilizando un soporte magnético y realizando lavados sucesivos con Buffer de lavado bajo en sales, Buffer de lavado alto en sales, Buffer de lavado de LiCl y Buffer TE. A continuación, se revirtió la unión proteína-DNA en la cromatina inmunoprecipitada tratando con RNasa A y Proteinasa K por 2 horas a 62°C y 10 minutos a 95°C. Una vez que las muestras fueron enfriadas a temperatura ambiente. Se purificó el DNA utilizando QIAquick PCR purification Kit (Qiagen, USA).

Luego, a partir de DNA purificado se realizaron los qPCR correspondientes como se describió en la sección 5.a y 8.a utilizando partidores para amplificar elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE) detallados en la tabla 3.

Los valores de Cq de cada muestra fueron comparados respecto al input inicial y normalizados respecto a los valores obtenidos de las muestras inmunoprecipitadas con el anticuerpo para control de isotipo IgG. Los valores fueron expresados en veces de enriquecimiento (fold enrichment) de la condición estimulada. Adicionalmente, se analizó el enriquecimiento del sitio GRE ubicado en el promotor del gen de GILZ a modo de control positivo (24).

Posición GRE amplificado	Secuencias
pLRH-1 -206	5'-CCT GCA TAG AGT CAT GTG ATG AG-3'
	5'-CCA ACA TTA GTG ACC TGC TGT A-3'
	/56-FAM/AC CAT CAT G/Zen/A AAC TGG ATA CAT GGT /3IABkFQ/
pLRH-1 -1322	5'-CGG GTA GAT CAT TTG AGG TCA C-3'
	5'-CCA GTA GCT GGG ATT ACA GG-3'
	/56-FAM/AA ATT AGC C/Zen/G GGC ATG GTG GTGT/3IABkFQ/
pLRH-1 -2095	5'-TCA CCT GAG GTC AGG AGT TC-3'
	5'-TAC AGG TAC GTG CCA CCA T-3'
	/56-FAM/CA GCC TGG C/Zen/C AAC ATG GCA AA/3IABkFQ/
pLRH-1 -3389	5'-GAC CTA CAT ATT TCA AAG CAG TTA CAG-3'
	5'-CAG GCT GGT GTC GAA CTC-3'
	/56-FAM/CA CAC TTG G/Zen/A AGG CTA AGG CAGGA/3IABkFQ/
GILZ -1500	5'-TTCATGGGTACTGGCCTTAAC-3'
	5'-GGTGATGCAACCGGAATA-3'
	TGTGGTGGAAACCCAATGTTCTC

**Tabla 3. Partidores diseñados (plataforma IDT) para el análisis de los GRE seleccionados en el promotor de LRH-1 mediante CHIP-qPCR.**

#### IV. 9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En primer lugar, el test D'Agostino & Pearson fue utilizado para evaluar normalidad de los datos. En aquellos con distribución normal, los resultados fueron expresados como promedio con error estándar, utilizando ANOVA de una vía para la comparación de variables cuantitativas. En aquellos datos identificados como no paramétricos, los resultados se expresaron de la misma manera, pero para la comparación pareada dentro de un mismo grupo se utilizó la prueba de Wilcoxon, para comparaciones no pareadas entre grupos se utilizó Mann Withney y para comparar más de dos grupos se utilizó el test de Kruskal Wallis con post-test de Dunns.

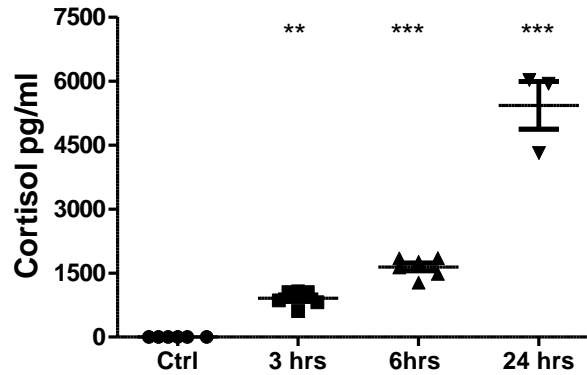
Por su parte, los análisis de correlación se hicieron mediante correlación de Spearman, asumiendo una distribución no normal de los datos. Un valor  $p < 0,05$  fue considerado significativo para todos los análisis estadísticos realizados utilizando el programa GraphPad Prism 6.0.

## **V. RESULTADOS**

### **Objetivo 1: Determinar la regulación de la vía esteroidogénica intestinal por GCs en la línea celular epitelial de colon humano.**

- a. Cuantificación de la producción de cortisol en condiciones basales y posterior al tratamiento con dexametasona en los sobrenadantes de los cultivos de las células Ccd841CoN mediante ELISA.

Para comprobar la funcionalidad de la vía de esteroidogénesis y su inducción por GC a nivel local intestinal en el modelo de línea celular, se determinó la producción basal y la secreción de cortisol inducida por el tratamiento con el GC sintético en las células epiteliales intestinales Ccd841CoN mediante la detección y cuantificación de éste en el medio de cultivo por ELISA (Fig. 5). Los resultados muestran que en la condición control sin tratamiento las células no producen cortisol, aun luego de transcurridas 24 horas de cultivo. Adicionalmente, el contenido de cortisol aumenta luego del estímulo con dexametasona 100 nM. Así, a las 3 horas de tratamiento con dexametasona el contenido de cortisol alcanza los 900 pg/mL, a las 6 horas los 1600 pg/mL y a las 24 horas la concentración se eleva a 5400 pg/mL, permitiendo concluir que la producción de cortisol es inducida por GC y sostenida durante el periodo experimental en este modelo.



**Figura 5. Producción de cortisol por la línea celular epitelial de colon humano (Ccd841CoN) inducido por tratamiento con dexametasona.**

Concentración de cortisol detectado mediante ELISA y cuantificado en pg/mL de sobrenadante de células Ccd841CoN tratadas con dexametasona (100nM) por 3, 6 y 24 horas y en condición control sin tratamiento cultivadas durante 24 horas (Ctrl). Test estadístico ANOVA de una vía (n=3), \* p< 0,05, \*\* p< 0,01, \*\*\* p< 0,001.

- b. Determinación de la expresión génica de los componentes de la vía esteroidogénica inducida por dexametasona mediante qPCR en células Ccd841CoN.

Una vez comprobada la producción de cortisol inducida por dexametasona, se la inducción de los componentes de la vía esteroidogénica planteada mediada por el GC sintético fue evaluada, además, se corroboró que dicha inducción ocurriera por la vía propuesta utilizando el bloqueador de GR, RU486 (Fig. 6).

Para esto se determinó la expresión de los transcritos de los genes que componen de la vía esteroidogénica estudiada (GR, LRH.1, CYP11A1 y CYP11B1) y la expresión del gen TSC22D3 que codifica para la proteína GILZ a modo de control positivo del estímulo con dexametasona, puesto que este es un reconocido gen de respuesta a corticoides (24). Los resultados se analizaron y representaron gráficamente como expresión relativa del transcrito de interés respecto a un gen constitutivo, en este caso, PPIB o 18S, respectivamente.

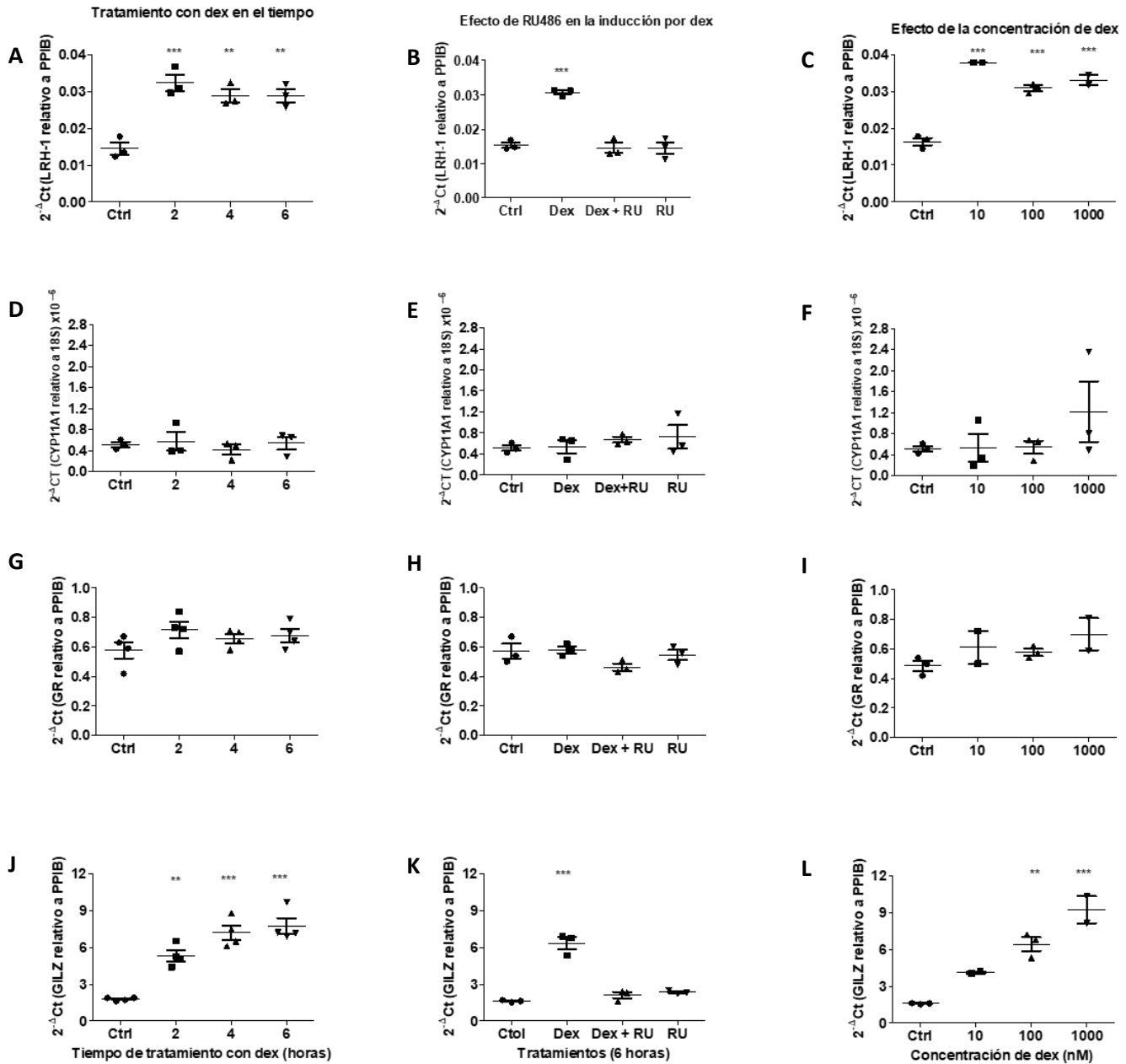
Observamos que la expresión de LRH-1 es inducida hasta 2 veces respecto a la condición sin tratamiento (Ctrl) a las 2, 4 y 6 horas de tratamiento con dexametasona, lo que indica que dicha inducción ocurriría en tiempos tempranos y se mantendría estable durante este lapso de tiempo (Fig. 6A). Sin embargo, no se observaron cambios en los niveles de transcrito de CYP11A1 ni para GR luego de la inducción con dexametasona a las 2, 4 o 6 horas post tratamiento (Fig. 6D y 6G). Además, es importante mencionar en este punto que, al igual que lo ocurrido en las muestras de pacientes, la enzima CYP11B1 tampoco fue detectable de manera consistente en

la línea celular, por ninguno de los dos métodos de cuantificación utilizados (Taqman y SybrGreen), por lo que es posible confirmar que la expresión de esta enzima a nivel de transcrito en las células Ccd841CoN se encuentra por debajo del límite de detección de la técnica. La inducción de la expresión del transcrito de GILZ en los tiempos de tratamiento fue de hasta 4 veces respecto a la condición sin tratamiento (Ctrl) y ésta continuó aumentando de manera tiempo dependiente (Fig. 6J), lo que confirma la respuesta de las células en cultivo al glucocorticoide sintético.

Respecto al efecto del bloqueador farmacológico de GR (RU486), se observa que la inducción de LRH-1 obtenida a las 6 horas de tratamiento con dexametasona es revertida, alcanzando niveles similares a los de la condición sin tratamiento cuando las células son tratadas previamente con el bloqueador RU486 y que por su parte el bloqueador por sí solo no tiene efectos sobre la expresión de dicho transcrito (Fig. 6B). Lo anterior sugiere fuertemente que la inducción observada de LRH-1 producida por el tratamiento con dexametasona es mediada por GR.

Puesto que, ni la enzima ni GR son inducidos por el tratamiento con dexametasona, el bloqueador RU486 no mostró tener ningún efecto sobre la expresión de ninguno de estos transcritos (Fig. 6E y 6H). De la misma manera, la inducción de GILZ mediada por dexametasona fue revertida por el bloqueador, lo que comprueba nuevamente que la inducción de GILZ observada está siendo mediada por el GR (Fig. 6K).

De la misma manera, concentraciones crecientes de dexametasona son capaces de inducir la expresión del transcrito de LRH-1, sin embargo, para este gen se observa que la inducción es independiente de la concentración puesto que, utilizando 10 nM, 100 nM o 1000 nM, la inducción es aproximadamente de 2 veces respecto a la condición sin tratamiento (Fig. 6C). A diferencia de la inducción del gen GILZ, el que si muestra ser concentración dependiente (Fig. 6L). Los resultados mostraron además que tanto la expresión de la enzima CYP11A1 (Fig. 6F) como del receptor GR (Fig. 6I) no puede ser inducida por un tratamiento con dexametasona por 6 horas aun cuando la concentración de ésta sea muy superior (1000 nM) o muy inferior (10 nM) a la determinada como fisiológica (100 nM) para estos experimentos *in vitro* según estudios anteriores (39). Estos resultados muestran concretamente que LRH-1 es inducido a nivel de transcrito por dexametasona y que ésta ocurre en tiempos tempranos y requiere de la participación de GR, aun cuando éste no es inducido por el GC a nivel de transcrito.



**Figura 6. Efecto de la dexametasona y el antagonista del GR (RU486) sobre la expresión relativa de los transcritos de LRH-1, CYP11A1, GR y GILZ.**

Cambios en la expresión del transcrito en una curva de tiempo de 2, 4 y 6 horas de tratamiento con dexametasona 100nM respecto a la condición sin tratamiento (Ctrl), LRH-1 (A) CYP11A1 (D) GR (G) GILZ (J). Efecto de RU486 en la expresión del transcrito a las 6 horas de tratamiento con dexametasona, LRH-1 (B) CYP11A1 (E) GR (H) GILZ (K). Efecto de la concentración de dexametasona en la expresión de transcritos utilizando una curva de concentración de 10 nM, 100 nM y 1000 nM respecto a la condición sin tratamiento (Ctrl), LRH-1 (C) CYP11A1 (F) GR (I) GILZ (L). Test estadístico ANOVA de dos vías, (n=3), \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001.



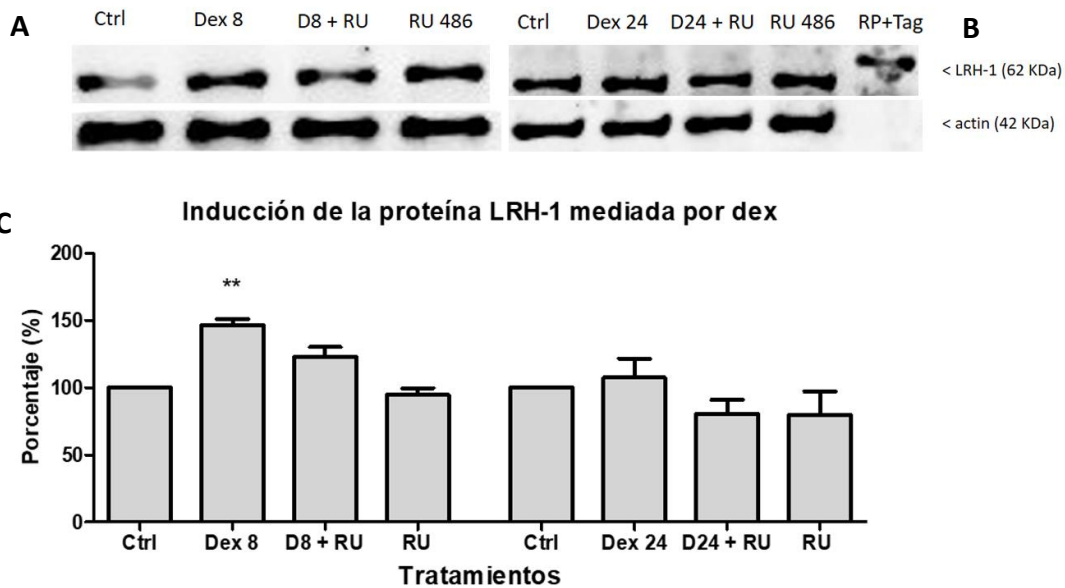
- c. Determinación de la expresión proteica de LRH-1 inducida por dexametasona mediante Western Blot en células epiteliales intestinales (Ccd841CoN).

Una vez determinada la inducción del transcrito de LRH-1 mediado por dexametasona como componente regulador de la vía esteroidogénica intestinal *in vitro*, evaluamos la traducción de ésta inducción a nivel de proteína, de manera de comprobar que este factor transcripcional se exprese a nivel de proteína pudiendo ser funcional y ejerciendo su efecto sobre la regulación de las enzimas esteroidogénicas como ha sido reportado (37,40)

Lo que se muestra en la Fig. 7 es que al tratar las células con dexametasona 100nM por 8 horas (Dex 8) observamos una inducción significativa de LRH-1 a nivel de proteína respecto a la condición control sin tratamiento (Ctrl) y de la misma manera que se observó a nivel de transcrito, esta inducción es revertida cuando las células son pre-tratadas con el bloqueador RU486 (D8 + RU). Por otra parte, RU486, a pesar de mostrar una leve inducción mediante la observación a simple vista de la banda, no tendría la facultad de inducir cambios significativos en la expresión de la proteína de interés ( $p=0,3702$ ) (Fig. 7A y 7C).

Cuando las células Ccd841CoN fueron estimuladas por 24 horas con dexametasona, en presencia o ausencia del bloqueador RU486, no se observaron diferencias significativas en la expresión de la proteína LRH1 respecto a la condición control sin estímulo. (Fig. 7B y 7C). A modo de control de especificidad para el anticuerpo, una proteína recombinante comercial de LRH-1 fue utilizada, detectándose a un peso molecular superior a la proteína endógena, debido a la existencia de una etiqueta o *tag* GST acoplado a la proteína recombinante (agrega 26 KDa extra a la proteína de peso 62 KDa) (Fig. 7B).

En conclusión, estos resultados muestran que la inducción de LRH-1 mediada por dexametasona a nivel de transcrito se traduce en la proteína del factor transcripcional LRH-1 y que, por lo tanto, tendría la facultad de regular la expresión de las enzimas esteroidogénicas y ejercer sus efectos conocidos a nivel de proliferación celular como ha sido demostrado en estudios anteriores.



**Figura 7. Evaluación y cuantificación de la inducción de la proteína LRH-1 por dexametasona mediante Western Blot en células CCd841CoN.**

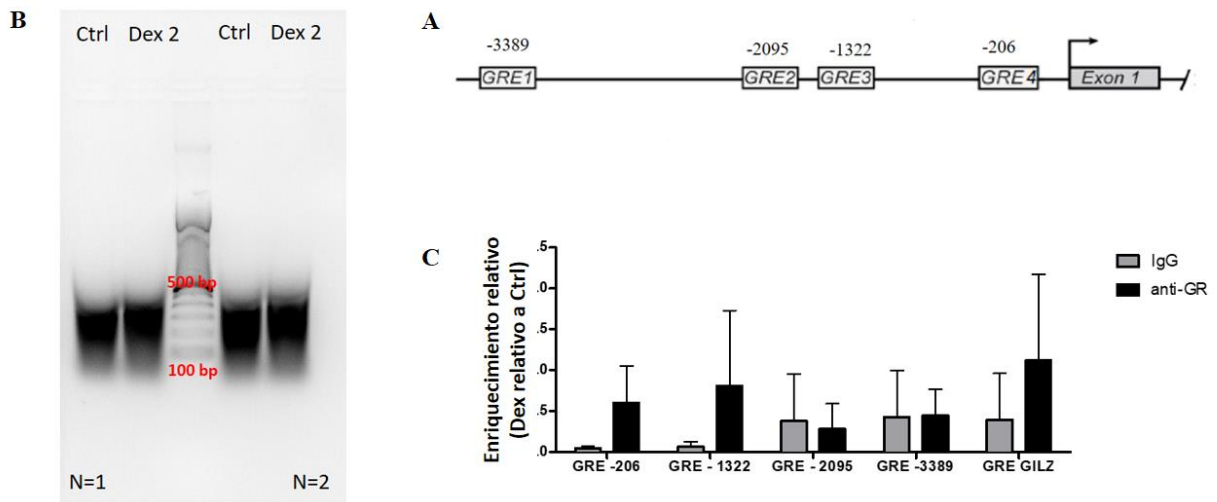
Cambios en la expresión de la proteína LRH-1 en células Ccd841CoN tratadas por 8 o 24 horas con dexametasona 100nM por si sola (Dex 8, Dex 24), pre-incubadas con bloqueador farmacológico de GR, RU486, por 1hr para posterior tratamiento con dexametasona (D8+ RU o D24 + RU) y RU486 por si solo por ambos tiempos (RU 486), comparados respecto a una condición control sin tratamiento (Ctrl). Se utilizó  $\beta$ -actina como control de carga y proteína recombinante de LRH-1 como control de especificidad de la banda detectada (RP+ Tag) (A y B). Cuantificación de las bandas para LRH-1 detectadas en A normalizadas frente al control de carga, expresadas en porcentaje respecto a la condición control sin tratamiento (Ctrl) establecida como 100% (C). Test estadístico ANOVA de una vía con post test de Bonferroni. (n=5), \*\* p< 0,01

d. Análisis de la interacción entre GR y promotor de LRH-1 mediada por GC mediante inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) en la línea celular de colon humano.

Luego de comprobada la inducción de LRH-1 mediada por dexametasona/GR tanto a nivel de transcrito como de proteína, la interacción directa entre estos componentes reguladores de la vía esteroideogénica intestinal (GR y promotor del gen LRH-1) fue evaluada. De esta manera buscamos comprobar la regulación que podría ejercer el GR sobre el factor transcripcional que comandaría la vía de producción de cortisol a nivel intestinal (LRH1) a través de una unión directa a su promotor como se ha visto que ocurre con otros factores transcripcionales regulados por GR (2,16).

El diagrama representativo del promotor de LRH-1 (Fig. 8A) indica los sitios GRE que

fueron evaluados mediante qPCR. Estos sitios fueron elegidos utilizando los criterios descritos en la sección de metodología 10.a y fueron flanqueados por los primers descritos en la Tabla 3 de la misma sección. La fragmentación de la cromatina luego de la extracción y sonicación de la misma según lo descrito en la sección 10.b fue evaluada mediante la visualización de los fragmentos en un gel de agarosa al 1%, identificándose fragmentos de entre 100 y 500 pb en ambas replicas, siendo esta la fragmentación adecuada para la realización de la inmunoprecipitación de cromatina (Fig. 8 B). Luego de la inmunoprecipitación de la cromatina utilizando el anticuerpo anti-GR y el anticuerpo anti-IgG como control de isotipo se calcularon las veces de enriquecimiento relativo (Fold enrichment) que tuvieron los GREs indicados al ser inmunoprecipitados con cada uno de los anticuerpos mencionados, normalizando frente al input de DNA utilizado y luego frente a la condición control sin tratamiento (Ctrl). Se observa un enriquecimiento en los GRE localizados en las posiciones -206 u -1322 de 0,6 y 0,8 veces, respectivamente, al inmunoprecipitar con el anticuerpo anti-GR, enriquecimiento que no se observa al inmunoprecipitar con el control de isotipo. Por el contrario, para los otros dos sitios evaluados (-2095 y -3389) se observa un enriquecimiento menor a 0,5 veces al inmunoprecipitar con el anticuerpo anti-GR y, además, este resulta ser similar al obtenido al inmunoprecipitar con IgG, lo que no permite comprobar la especificidad del enriquecimiento en estos casos. De manera de controlar la activación de GR, se evaluó el enriquecimiento del GRE del gen de GILZ a modo de control positivo (Fig. 8 C y Fig Sup.3) lo que permite confirmar la respuesta esperada de las células tratadas con el corticoide sintético. Todo lo anterior permite sugerir que los GRE encontrados en el promotor de LRH-1 (-206 y 1322) serían funcionalmente activos en respuesta a la estimulación por dexametasona. Repeticiones de este experimento serán necesarias para confirmar estos resultados.



**Figura 8. Inmunoprecipitación de cromatina acoplado a PCR cuantitativo (qPCR) para evaluación de la unión del receptor de glucocorticoides (GR) a elementos de respuesta (GRE) identificados en el promotor del gen NR5A2 (LRH-1) y GILZ.** Esquema representativo de los GRE evaluados encontrados en las posiciones indicadas en el promotor del gen NR5A2 (LRH-1) (A). Fragmentación de cromatina para N=2 en condiciones control sin tratamiento (Ctrl) y tratamiento con dexametasona 2 horas (Dex 2) evaluada mediante gel de agarosa 1% (B). Enriquecimiento con el receptor de glucocorticoides (GR) en 4 sitios GRE evaluados en el promotor de LRH-1, ubicados en las posiciones indicadas en pares de bases (pb) respecto al inicio de la transcripción (-206, -1322, -2095, -3389) y en el GRE de GILZ, normalizando lo obtenido en la condición con tratamiento con dexametasona por 2 horas frente a la condición control sin tratamiento al inmunoprecipitar con el anticuerpo para control de isotipo (IgG) en gris y con el anticuerpo del receptor de glucocorticoides (GR) en negro. (n=1)

**Objetivo 2. Caracterizar los componentes de la vía esteroidogénica y evaluar producción de cortisol dependiente de la regulación de GR/LRH1 inducida por dexametasona en la mucosa intestinal de pacientes con CU clasificados según su respuesta al tratamiento con GC.**

La tabla 4 detalla la información clínica y epidemiológica de los pacientes enrolados hasta la fecha. (Debido a que el número de pacientes reclutados por grupo es menor a lo necesario según el cálculo muestral en la sección 1.a de metodología, 10 por grupo, el presente proyecto fue catalogado como estudio piloto o de prueba de concepto).

	Colonoscopia 1				Colonoscopia 2		
	Individuos Sanos n=6	Respondedor n=11	Refractario n=4	Dependiente n=3	Respondedor n=5	Refractario n=3	Dependiente n=2
Género (F/M)	3/3	6/5	2/2	3/0	3/2	1/2	2/0
Edad, en años (mediana, rango)	55 (41-61)	30,5 (19-61)	28 (20-37)	39 (23-40)	31 (19-61)	30 (20-37)	39,5 (39-40)
Duración de la enfermedad, en años (mediana, rango)	-	2 (0-20)	1 (1-2)	3 (3-13)	1 (0-3)	1 (1-2)	8 (3-13)
Índice de Mayo clínico (mediana, rango)	-	4(2-8)	3,5(2-7)	5(5)	0(0)	8(0-8)	4(4)
Índice de Mayo endoscópico (mediana, rango)	-	2 (2-3)	2,5(2-3)	2(2-3)	0(0)	2(0-3)	2,5(2-3)
Tratamiento, n							
5-ASA	-	10	3	2	1	1	1
Mesalazina	-	-	1	-	-	-	-
Azatioprina	-	1	-	2	4	-	2
Infliximab	-	-	-	-	-	1	-
Corticoides	-	-	-	-	-	2	-
Sin tratamiento	6	-	-	-	-	-	-
Análisis anatómico-patológico, n							
Infiltrado inflamatorio (0/1/2/3)	(1/0/0/0)	(0/2/4/5)	(0/1/2/1)	(0/0/1/2)	(0/5/0/0)	(1/0/1/1)	(0/0/2/0)
PMN (0/1/2/3)	(1/0/0/0)	(0/3/6/2)	(0/1/2/1)	(0/0/1/2)	(4/1/0/0)	(1/2/0/0)	(1/1/0/0)
Plasmocitos (0/1/2/3)	(0/1/0/0)	(1/0/5/5)	(0/0/4/0)	(0/0/1/2)	(0/5/0/0)	(1/0/1/1)	(0/0/2/0)
Eosinófilos (0/1/2/3)	(1/0/0/0)	(1/3/7/0)	(0/1/2/1)	(1/0/2/3)	(0/5/0/0)	(0/2/1/0)	(0/2/0/0)
Linfocitos (0/1/2/3)	(0/1/0/0)	(0/3/8/0)	(0/1/3/0)	(1/0/2/0)	(1/4/0/0)	(0/3/0/0)	(0/2/0/0)
Dif. Epitel (0/1/2/3)	(0/0/0/1)	(1/3/6/1)	(0/1/1/2)	(0/1/2/0)	(0/0/2/3)	(0/2/0/1)	(0/2/0/0)
Microabsceso (si/no)	(0/1)	(4/7)	(2/2)	(2/1)	(0/5)	(1/2)	(0/2)
Criptitis (si/no)	(0/1)	(11/0)	(4/0)	(3/0)	(1/4)	(2/1)	(1/1)
Actividad (0/1/2/3)	(1/0/0/0)	(0/3/4/4)	(0/1/2/1)	(0/0/1/2)	(1/4/0/0)	(2/1/0/0)	(1/1/0/0)
Fibrosis (0/1/2/3)	(1/0/0/0)	(4/6/1/0)	(1/2/0/1)	(1/1/0/1)	(3/2/0/0)	(3/0/0/0)	(1/1/0/0)

**Tabla 4. Datos epidemiológicos y clínicos de los pacientes incluidos en el estudio.** Se describen las características de individuos sanos, pacientes con CU respondedores, refractarios, dependientes.

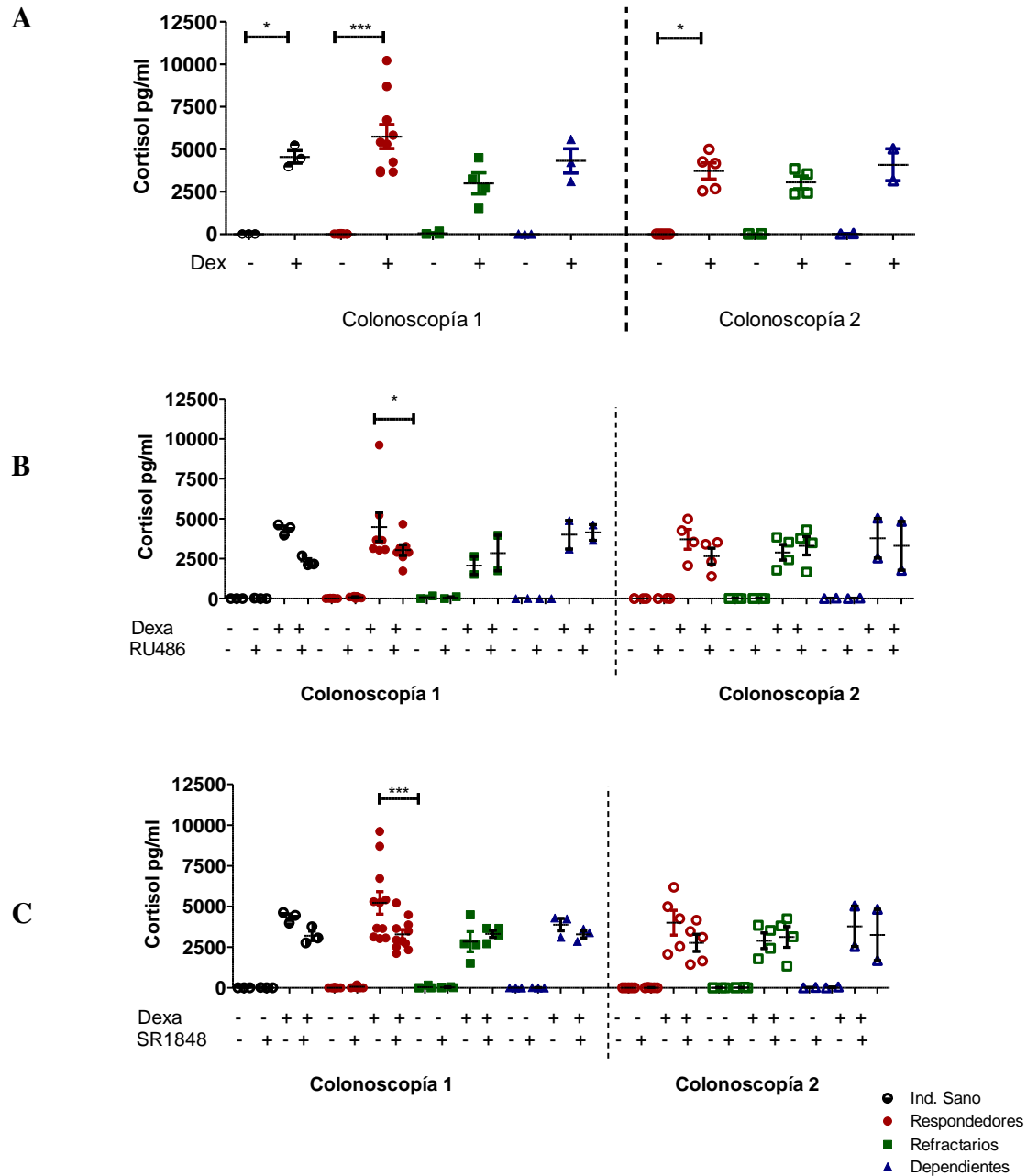
a. Cuantificación de la producción de cortisol en condiciones basales y posterior al tratamiento con dexametasona y bloqueadores farmacológicos específicos contra GR y LRH-1 (RU486 y SR1848, respectivamente) en los sobrenadantes de los explantes de mucosa cultivados *ex vivo* mediante ELISA.

La producción de cortisol de la mucosa intestinal de pacientes (cultivo *ex vivo* de biopsias intestinales durante 24 horas) (Fig. 9), determinada por ELISA en el sobrenadante, mostró niveles indetectables en la condición control (sin tratamiento) para la mayoría de las muestras de todos los grupos de estudio (individuos control, pacientes respondedores, cortico-refractarios y dependientes). El tratamiento con dexametasona durante 24 horas provocó un aumento en la producción de cortisol de manera significativa en el grupo de individuos sanos y pacientes respondedores (muestras de la primera colonoscopia) (Fig. 9A). En el caso de muestras de pacientes refractarios y dependientes, la producción de cortisol tiende a ser mayor luego del tratamiento con dexametasona que la condición control, sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas, ni en la colonoscopia 1 ( $p= 0,1250$  y  $p= 0,2500$ , respectivamente) ni en la colonoscopia 2 ( $p= 0,1250$  y  $p= 0,5000$ , respectivamente) (Fig. 9A)

Los datos expuestos demuestran la capacidad esteroidogénica de la mucosa intestinal, inducida por dexametasona, tanto en un estado fisiológico como patológico (inflamación). Adicionalmente, al comparar la producción de cortisol inducida por el GC en la mucosa de pacientes respondedores antes (inflamada, colonoscopia 1) y después de la terapia (sana, colonoscopia 2), la capacidad esteroidogénica estaría intacta, con una tendencia a una producción menor cuando el tejido se encuentra sano v/s inflamado (Fig 9A).

Para determinar la participación del GR y del factor de transcripción LRH-1 en la producción de cortisol intestinal inducida por dexametasona, los inhibidores RU486 (Fig. 9B) y SR1848 (Fig. 9C) fueron capaces de disminuirla en individuos sanos y en la mucosa inflamada (colonoscopia 1) de pacientes respondedores de manera significativa. En la mucosa recuperada de los pacientes respondedores (colonoscopia 2), una tendencia a la disminución fue observada ( $p=0,1250$  y  $p=0,0625$ ), la que no se observó para los grupos de pacientes refractarios ( $p=0,5000/0,6250$  y  $p=0,3750/0,6250$ ) o dependientes

( $p=1,0000/0,5000$  y  $p=0,5000/0,5000$ ) del tratamiento en ninguna de las dos tomas de biopsia colonoscópica. Estos resultados indican que, en estos últimos grupos descritos, a diferencia de individuos sanos y pacientes con CU respondedores, los bloqueadores de la vía esteroidogénica empleados no son capaces de ejercer un efecto a nivel de la producción de cortisol endógena que está siendo mediada por dexametasona. Estos resultados demuestran que, en la mucosa intestinal, la producción de cortisol inducida por dexametasona es mediada por GR y LRH-1 y que los pacientes con CU refractarios y dependientes podrían tener alteraciones en este nivel de la vía esteroidogénica, lo que afectaría la respuesta que puedan tener a la terapia con GCs.



**Figura 9. Efecto de la dexametasona, el antagonista del receptor de glucocorticoides (RU486) e inhibición del factor transcripcional LRH-1 (SR1848) en la producción de cortisol en la mucosa de pacientes con CU.**

Producción de cortisol en pg/mL medida el sobrenadante de las biopsias intestinales tomadas en la primera (colonoscopia 1) y segunda (colonoscopia 2) colonoscopia realizada a pacientes con CU, tratadas ex vivo con dexametasona (Dexa) durante 24 horas (A) y/o RU486 (B) o SR1848 (C) durante 24 horas según lo indicado en el gráfico. ANOVA de una vía no paramétrica (Kruskal Wallis), \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  en (A). Test pareado no paramétrico (Wilcoxon) para comparaciones en los grupos IS (individuo sano) ( $n=3$ ), respondedores ( $n=8$ ) refractarios ( $n=4$ ) y dependientes ( $n=2$ ) en (B) y (C), \*  $p$  value  $< 0,05$ .



b. Determinación de la expresión de los componentes de la vía esteroidogénica (GR total, GR $\beta$ , LRH-1, CYP11A1 y CYP11B1) a nivel de transcrito mediante qPCR, en la mucosa intestinal de pacientes con CU.

Una vez caracterizada la producción de cortisol mediada por dexametasona en los pacientes con CU y al analizar las diferencias existentes entre grupos, la caracterización de los principales componentes de la vía esteroidogénica intestinal fue determinada en biopsias de mucosa intestinal (Fig. 10).

Al analizar los niveles del transcrito del factor transcripcional LRH-1 (Fig. 10A) se observó un mayor contenido en la mucosa sana de individuos control que en los pacientes respondedores, cortico-refractarios y dependientes, sin embargo, solo se identifican diferencias significativas al comparar la mucosa de individuos sanos respecto a pacientes con CU respondedores al tratamiento. Al comparar a los individuos sanos con el grupo refractario al tratamiento es posible apreciar una tendencia clara de inferioridad en la expresión de LRH-1, aunque ésta no resulta estadísticamente significativa ( $p=0,0571$  IS v/s Ref). Por su parte, al comparar la expresión del mismo entre grupos de pacientes, es posible observar una tendencia (no significativa) que podría indicar una menor expresión del transcrito en los grupos de pacientes que resultan tener una respuesta no deseada al tratamiento con corticoides versus pacientes respondedores ( $p=0,2601$  Resp v/s Ref y  $p=0,4363$  Resp v/s Dep). Al analizar el contenido del transcrito de LRH-1 en biopsias obtenidas en el seguimiento (2da colono) si bien no se observan diferencias significativas, se puede observar una tendencia que podría ser sugerente de mayores niveles de expresión en la mucosa de pacientes respondedores que en la de pacientes refractarios y dependientes ( $p=0,7857$  Resp v/s Ref y  $p=0,3810$  Resp v/s Dep). Cabe destacar, que al comparar la expresión de LRH-1 entre la mucosa de los pacientes respondedores obtenida de la primera colonoscopia (mucosa inflamada) con la misma en la mucosa obtenida en la segunda colonoscopia (mucosa sana) la expresión de LRH-1 parece mayor en el periodo refractario de la enfermedad ( $p=0,0559$  Resp col 1 v/s Resp col 2), pudiendo alcanzar niveles similares a lo observado para los individuos sanos.

En lo que se relaciona con la expresión del transcrito de las enzimas esteroidogénicas en estudio, CYP11B1 y CYP11A1, es importante destacar en primer lugar que la expresión de la enzima CYP11B1 fue indetectable por el método de qPCR utilizado, probablemente

debido a que la expresión de esta enzima es muy baja en el tejido ensayado y se encontró por debajo del límite de detección tanto utilizando reactivo SybrGreen como sondas Taqman. Respecto a la enzima CYP11A1 (Fig. 10B), en este caso los niveles de expresión de la enzima esteroideogénica resultaron ser muy bajos en todos los grupos de estudio (orden de  $10^{-7}$ ) y tener elevada dispersión de los datos. Para este caso, no se observaron diferencias significativas en ninguna de las comparaciones, ni tampoco tendencias sugerentes estadísticamente. Sin embargo, los resultados a simple vista reportan una tendencia a una menor expresión de CYP11A1 en individuos sanos comparados con los grupos de pacientes con CU activos (colonoscopia 1) ( $p=0,2091$  IS v/s Resp,  $p=0,6286$  IS v/s Ref y  $p=0,4000$  IS v/s Dep).

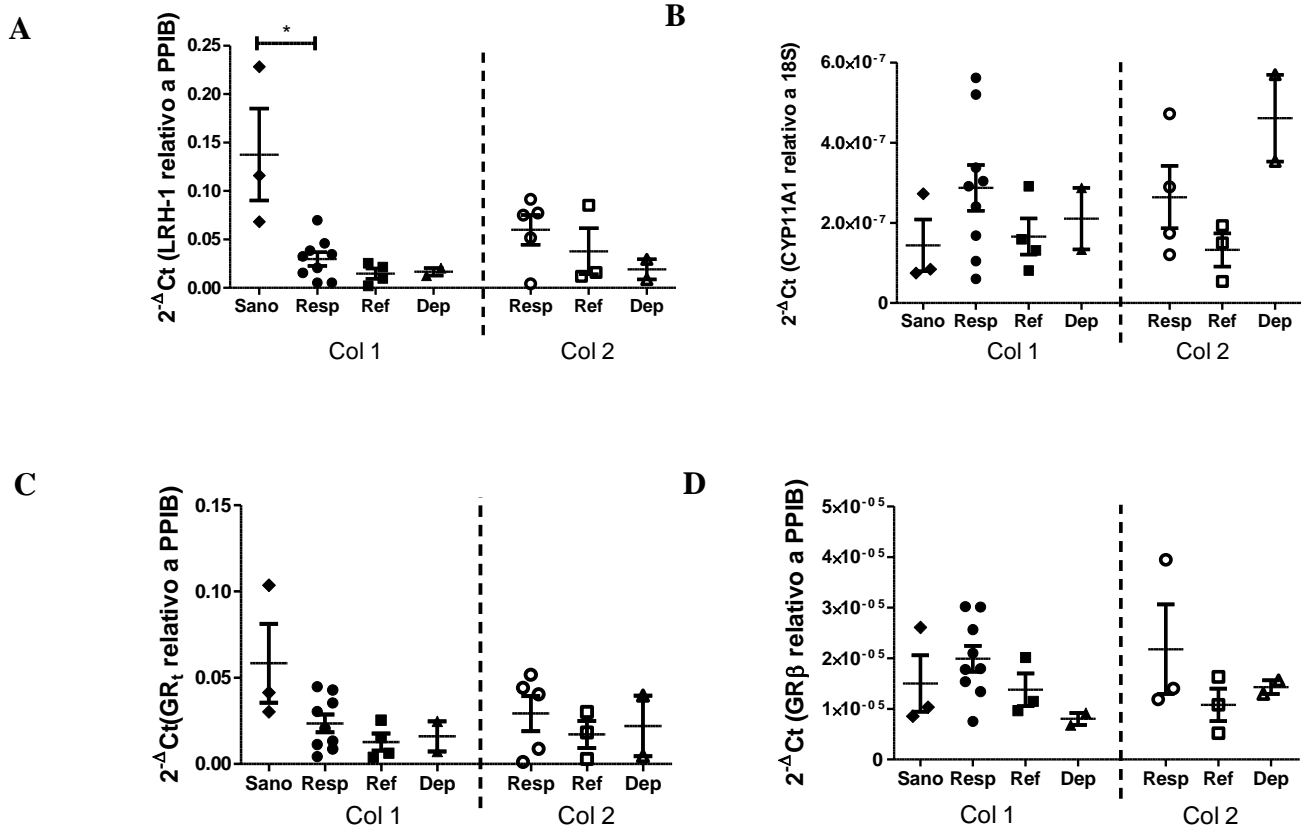
Por otro lado, la expresión de CYP11A1 en la mucosa obtenida de la segunda colonoscopia para los tres grupos de pacientes muestra también una tendencia a ser inferior en la mucosa de pacientes refractarios al compararse con respondedores ( $p=0,4000$  Resp v/s Ref) y aumentada en la mucosa de pacientes dependientes al compararse con los clasificados como respondedores ( $p=0,2667$  Resp v/s Dep).

La expresión de la totalidad de las isoformas de GR, GR total, (Fig. 10C) mostró una tendencia de menor contenido en la mucosa intestinal de pacientes con CU de manera general al compararse con el grupo control de individuos sanos. Esta tendencia es todavía más sugerente en la mucosa de pacientes refractarios a la terapia ( $p=0,2091$  IS v/s Resp,  $p=0,0571$  IS v/s Ref y  $p=0,2000$  IS v/s Dep). Al observar los niveles de expresión entre los grupos de pacientes se aprecia que tanto cuando la mucosa de los pacientes respondedores está inflamada (colonoscopia 1) como cuando ésta ha sanado luego del tratamiento (colonoscopia 2) GR total tiende a expresarse más en estos pacientes que en la mucosa de los pacientes refractarios ( $p=0,2601$  Resp v/s Ref col 1 y  $p=0,5714$  Resp v/s Ref col 2). A su vez, la expresión de GR en los pacientes dependientes también podría tener una tendencia similar, sin embargo, con el número de pacientes reclutados en este grupo (Dep) y la dispersión de los datos registrados hasta ahora no es posible describirla. Evaluamos, además, la expresión de una isoforma específica de GR, la que ha sido descrita como dominante negativa de los efectos del receptor (21). En este caso, tampoco se observaron diferencias significativas entre los grupos y a igual que en el caso de la enzima CYP11A1 los datos mostraron elevada dispersión, sin embargo, se puede destacar que a diferencia de los demás transcritos evaluados, la isoforma  $\beta$  del receptor de

glucocorticoides (GR $\beta$ ) (Fig. 10D) mostró una tendencia a expresarse en menor cantidad en la mucosa de individuos sanos al compararse con la mucosa de pacientes respondedores tanto inflamada (p= 0,4818 IS v/s Resp col 1) como recuperada (p= 0,4000 IS v/s Resp col 2).

Por otra parte, al normalizar la expresión de GR $\beta$  frente a la expresión de GR $\alpha$  mediante el cálculo de una razón (GR $\beta$ /GR $\alpha$ ) (Fig Sup. 1) para los valores obtenidos en ambos transcritos, se observa una tendencia que indica que la razón calculada estaría aumentada en la mucosa de los pacientes que no responden adecuadamente al tratamiento al realizar la misma comparación anterior. Aún más, al comparar a los individuos sanos con los pacientes respondedores al tratamiento la diferencia resulta significativa (p= 0,0091 IS v/s Resp col 1). Esta razón fue calculada en base a datos bibliográficos con la intención de acercarse al cálculo sugerido de una razón GR $\beta$ /GR $\alpha$  (31,41).

Para cada uno de los genes descritos en esta sección se graficó la comparación de la expresión transcripcional entre la colonoscopia 1 y la colonoscopia 2 para pacientes de un mismo grupo. Esto se incluyó como figura suplementaria (Fig Sup. 2) para facilitar el entendimiento de lo aquí descrito.



**Figura 10. Caracterización de los componentes de la vía esteroidogénica en la mucosa de pacientes con CU (Resp, Ref y Dep) e individuos sanos (IS).**

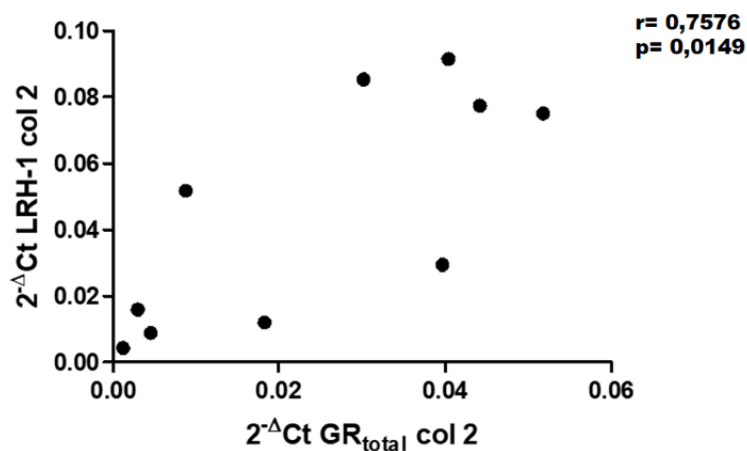
Cuantificación de la expresión de los transcritos de la vía esterodogénica normalizados frente al gen constitutivo (PPIB o 18S) en la mucosa intestinal de individuos sanos y pacientes con CU clasificados según el tipo de respuesta a glucocorticoides obtenida a partir de biopsias colorectales tomadas al inicio del estudio (Col 1) y luego del tratamiento con GC una vez transcurridos los meses de seguimiento correspondiente a cada grupo (Col 2). LRH-1 (A), CYP11A1 (B), GR total (C), GR $\beta$  (D). Test estadístico ANOVA de una vía no paramétrico (Kruskall Wallis) y Mann Whitney para comparaciones entre 2 grupos, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . (n IS=3, n Resp=8, n Ref=4, n Dep=2/ n Resp=5, n Ref=3, n Dep=2).

Individuo sano (**Sano**), Respondedores (**Resp**), Refractarios (**Ref**), Dependientes (**Dep**). Colonoscopia 1 (**Col 1**), Colonoscopia 2 (**Col 2**)

A partir de esta cuantificación obtenida para la expresión de los componentes de la vía esteroidogénica a nivel de mRNA, análisis de correlación fueron realizados en la totalidad de los individuos analizados. Éstos arrojaron una correlación positiva estadísticamente significativa entre la expresión de LRH-1 y GR total en la mucosa intestinal de los individuos de la biopsia tomada en la colonoscopia 2 (Fig. 11) ( $r=0,7576$ ;  $p=0,0149$  con LRH-1 dependiente de GRt). Por su parte, la correlación entre estos mismos componentes

en la biopsia obtenida en la colonoscopia 1, no resultó estadísticamente significativa, pero el valor p obtenido sugiere la misma correlación entre estos componentes ( $p=0,0778$  y  $p=0,0725$ ) (Fig Sup. 4)

La caracterización realizada es de alta relevancia científica pues las tendencias observadas apuntan a posibles alteraciones en la vía esteroidogénica intestinal en la mucosa de pacientes con CU que podrían explicar el desarrollo del cuadro inflamatorio y/o su respuesta a la terapia con GCs. Además, dan cuenta de la importancia de componentes de la vía esteroidogénica como GR y LRH-1 y la relación entre ambos, la que fue estudiada en profundidad en el objetivo específico siguiente en un modelo de línea celular.



**Figura 11. Correlación de la expresión de los transcritos LRH-1 y GR total en la mucosa intestinal de individuos sanos y pacientes con CU (índice de Spearman). Se muestra la correlación para LRH-1 dependiente de GR total.  $r = 0,7576$ ,  $p = 0,0149$ .**

## VI. DISCUSIÓN

Esta tesis contempló profundizar en el mecanismo molecular que regula la producción de cortisol endógeno, a nivel intestinal, inducida por el tratamiento con GCs. Adicionalmente, destaca la importancia de este proceso regulatorio local sobre el éxito de la terapia con GCs en el alcance de la remisión de la CU. Este trabajo de tesis comprende la primera evidencia donde fue reportada la regulación del factor transcripcional LRH-1 inducida por GCs. Nuestros resultados en la línea celular de epitelio intestinal de colon humano (Ccd841CoN) demuestran que las células epiteliales intestinales producen cortisol endógeno de manera sostenida en el tiempo como respuesta a GCs exógenos. Sumado a esto, los resultados permiten concluir que los GCs exógenos inducen la expresión (tanto a nivel de transcrito como de proteína) del principal factor regulador de la esteroidogénesis intestinal, LRH-1, por un mecanismo que requiere la participación del GR. Además, los resultados sugieren por primera vez una interacción directa proteína-DNA entre el GR y el promotor del factor LRH-1, y, por lo tanto, la regulación de la expresión de LRH-1 sería mediada directamente por GR y su ligando.

El mecanismo involucrado en la producción de cortisol en la línea celular de epitelio intestinal permite confirmar que lo observado no se debe a una amplificación general de la vía comandada por el GR, cuya expresión génica no es inducida por el tratamiento con corticoides. Por lo tanto, tanto la producción de cortisol como la inducción de LRH-1 mediadas por GCs hablan de un proceso regulado en donde es necesaria la participación de estos componentes.

El factor transcripcional LRH-1 es el regulador maestro de la esteroidogénesis intestinal, induciendo la expresión de las enzimas CYP11A1 y CYP11B1 que participan en distintas etapas de la producción de cortisol (15,32,42,43). Durante la inflamación, el cortisol sería inducido por citoquinas pro-inflamatorias como TNF $\alpha$  (26, 44). Dado el ambiente inflamatorio predominante en la CU, es esperable este tipo de regulación, no obstante, el hallazgo de GRE en el promotor de LRH-1 fue sugerente de la regulación por GC la cual fue confirmada por nuestros ensayos *ex vivo* e *in vitro*.

En los ensayos *in vitro*, el contenido de CYP11A1 no cambió luego del estímulo de las células epiteliales con dexametasona, sugiriendo que la enzima es inducida a tiempos más

tardíos de lo evaluado, ya que, según ha sido reportado previamente por el grupo de *Mueller. M y cols*, la inducción de CYP11A1 y CYP11B1 mediada por PMA ocurre a las 16 horas post-tratamiento (45).

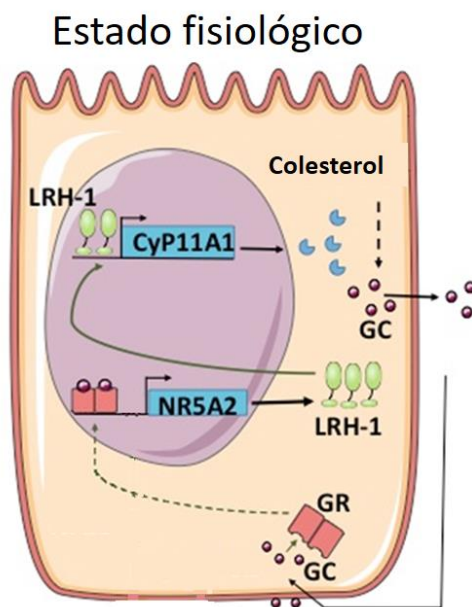
Para clarificar esta interrogante, sería interesante estudiar la cinética de inducción mediada por GCs de los componentes estudiados, en particular CYP11A1.

Asimismo, para ampliar el conocimiento del mecanismo molecular que comanda la producción de cortisol, sería relevante evaluar la localización subcelular de los componentes de la vía esteroidogénica antes y después del tratamiento con dexametasona, tal como la de los factores transcripcionales GR y LRH-1 que luego de activarse deben translocar al núcleo (distribuidos en el citoplasma antes del tratamiento con el GC y que predominen en el núcleo luego del tratamiento para ejercer sus efectos regulatorios).

Adicionalmente, para comprobar que la producción de cortisol en la línea celular es controlada por LRH-1, sería necesario evaluar a futuro el efecto del bloqueador SR-1848 en la respuesta inducida por dexametasona.

Por último, experimentos futuros deberían centrarse en comprobar la interacción entre GR y el promotor de LRH-1 en los sitios GRE aquí identificados mediante la repetición de los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina. De comprobar la funcionalidad de estos sitios GRE y la transcripción y traducción de LRH-1 mediada por dicha interacción, futuros ensayos de gen reportero en la secuencia promotora como regulador serían necesarios. Además, se propone utilizar técnicas de mutagénesis sitio dirigida de manera de estudiar la estructura funcional de los GRE y posibles actividades sinérgicas o independientes entre ellos.

De esta manera, los estudios realizados permiten confirmar la activación de una vía esteroidogénica en células epiteliales de colon humano, que es inducida por GCs exógenos y donde los principales componentes regulatorios involucrados son el GR y el factor LRH-1 (Fig. 12), integrando aspectos de la regulación de LRH-1 sobre CYP11A1 y la producción de cortisol previamente descrita (34,35,42).



**Figura 12. Modelo propuesto de la vía esteroidogénica intestinal en el epitelio y su regulación por GC.** Se representa lo observado en la línea celular epitelial intestinal de colon humano (Ccd841CoN) relativo a la unión del GC exógeno al receptor de glucocorticoides (GR) y la unión de este complejo (GC/GR) al promotor del gen de LRH-1 induciendo su transcripción a nivel de transcrito y proteína para la posterior regulación de la enzima esteroidogénica CYP11A1 y la producción intestinal de cortisol.

En pacientes con EII, el factor LRH-1 ha sido relacionado con la producción de GCs endógenos en la mucosa y los efectos anti-inflamatorios e inmunosupresores, junto con la recuperación de la integridad de la mucosa intestinal (inductor de proliferación celular y de expresión de proteínas de uniones estrechas) (15). Considerando lo anterior y sumado a la inducción de LRH-1 mediada por GCs, es sugerente que una respuesta positiva a la terapia con GCs en pacientes con CU sea atribuida en parte a la inducción y función de LRH-1. En particular, debido a que la sanación y recuperación de la mucosa epitelial intestinal podría estar mediada por LRH-1, siendo estos los aspectos que determinan el principal objetivo de la terapia con GCs en los pacientes para alcanzar la remisión endoscópica.

Lo anteriormente descrito, dirigió el interés hacia estudiar la expresión de los componentes moleculares que conforman la vía propuesta y evaluar la producción de GCs en la mucosa intestinal de aquellos pacientes con CU que son tratados con GCs exógenos y que además pueden presentar distintas respuestas a esta terapia. De este modo, la caracterización de los principales componentes de la vía de la esteroidogénesis en la



mucosa intestinal de individuos sanos y pacientes chilenos con CU sugiere su inducción por la terapia con GCs recibida, la cual es claramente diferente entre los grupos control y pacientes (más sutiles entre subgrupos de pacientes haciendo necesario aumentar el número de muestras).

La determinación de la producción de cortisol intestinal en los individuos sanos y pacientes con CU demostró niveles basales bajos (e incluso indetectables) similar a lo reportado previamente (14). Cabe destacar, que este es el primer estudio de medición de cortisol en mucosa intestinal de pacientes con EII. Adicionalmente, los niveles séricos de cortisol normalizados a deshidroepiandrosterona (DHEA) en pacientes con EII, (normalización que permite determinar la concentración libre y funcional de cortisol) (cortisol/DHEA) es mayor en pacientes con CU comparada con individuos control y aún más en aquellos pacientes previamente sometidos a terapia con GCs (46). Estos antecedentes sugieren que la producción de cortisol en la mucosa intestinal puede verse reflejado a nivel sistémico. El análisis de cortisol en el plasma de los pacientes con CU reclutados está siendo realizado actualmente por nuestro laboratorio.

Cabe destacar que futuros análisis contemplan la validación del método de detección de cortisol mediante ELISA utilizando la detección por Espectrometría de masas, esto debido a que en el último tiempo se han presentado discrepancias en el mundo científico respecto a los métodos de detección implementados para este tipo de determinaciones (60).

Adicionalmente, el tratamiento con dexametasona indujo la producción de cortisol por la mucosa intestinal *ex vivo*, tanto en individuos sanos como en pacientes respondedores a la terapia, como también refractarios o dependientes (menor que grupos control y CU respondedores). Los bloqueadores farmacológicos utilizados, RU486 y SR1848 (para GR y LRH-1 respectivamente), fueron efectivos para inhibir exclusivamente la producción de cortisol en pacientes respondedores. Estos resultados sugieren fuertemente que tanto el GR como el factor transcripcional LRH-1 estarían directamente relacionados con la producción de cortisol endógeno inducida por GCs en pacientes con CU y, además, los pacientes que no responden adecuadamente a la terapia presentarían alteraciones en la vía de producción de cortisol. Tales como las ya mencionadas respecto a polimorfismos en el GC o mutaciones en enzimas involucradas en el metabolismo de GC como la p-glicoproteína, pero también por una disminución de la expresión de estos componentes en la mucosa, lo que podría ir en desmedro de la correcta regulación de la

esteroidogénesis.

Los antagonistas utilizados inhiben la actividad de sus moléculas blanco; RU486 (mifepristona, un antagonista competitivo de GR), puede unirse con mayor afinidad (constante de disociación de  $kD \leq 10^{-9}$  M) en comparación a la dexametasona (constante de disociación  $kD = 10^{-8}$  M) (47), inhibiendo completamente la unión del agonista, provocando un impedimento estérico y funcional que evitará la unión de sus ligandos naturales e inhibiendo toda actividad del GR (48). La molécula SR1848 ha sido caracterizada como un potente inhibidor o agonista inverso de la actividad de LRH-1, puesto que provocaría la rápida traslocación hacia el citoplasma, impidiendo sus acciones a nivel transcripcional, lo que es traducido en una disminución de genes involucrados en múltiples procesos fisiológicos (enzimas esteroidogénicas CYP11A1 y CYP11B1) (42,49).

Ambos bloqueadores inhiben (mediante mecanismos moleculares diferentes) etapas claves de la vía esteroidogénica en los cultivos de mucosa *ex vivo*. Debido a que la producción de cortisol no fue significativamente disminuida por los antagonistas en la mucosa de los pacientes refractarios y/o dependientes de la terapia con GCs, se podría sugerir que existen mecanismos alternativos en la producción de cortisol intestinal en estos grupos de pacientes, como aquellos atribuibles exclusivamente al ambiente inflamatorio.

La expresión del transcrito del factor LRH-1 está disminuida en la mucosa inflamada de pacientes con CU al compararse con individuos sanos, concordando con reporte previo (15), con una tendencia a una expresión menor en la mucosa de pacientes que no responden adecuadamente al tratamiento (respecto a control y pacientes respondedores), sugiriendo que la menor expresión del factor de transcripción impacta sobre la producción de GCs endógenos, así como también la proliferación celular e integridad de la barrera epitelial intestinal.

El contenido de GR en la mucosa intestinal, tiende a ser menor en pacientes respondedores a la terapia comparado a individuos sanos, posiblemente debido a la condición inflamada de la mucosa intestinal de pacientes con CU. En este sentido, se ha visto que el TNF $\alpha$  (contribuye fuertemente a la progresión de la CU) es capaz de inducir la producción de GCs a nivel local en el intestino como un mecanismo inmunosupresor (26), y es posible que en el ambiente inflamatorio con niveles de TNF $\alpha$  elevados en etapa activa (29) induzca la producción de cortisol endógeno, lo que provocaría la consecuente

disminución de los niveles de GR como un mecanismo de regulación negativa previamente reportada en líneas celulares, modelos murinos y células sangre periférica humana (50).

Cabe destacar, que reportes anteriores no identificaron diferencias entre individuos sanos y pacientes con EII en la expresión de GR total evaluada tanto en mucosa intestinal como en sangre periférica, sin embargo, este mismo reporte si identificó diferencias en la expresión de GR total en la mucosa de pacientes respondedores comparado con pacientes refractarios a la terapia con GC (51), lo que también fue sugerido en esta tesis a partir de las tendencias observadas entre los grupos. Adicionalmente, el mismo reporte previo no registra diferencias en la expresión de GR post tratamiento con esteroides (51), lo que también estaría relacionado con las observaciones de esta tesis (en el modelo de línea celular).

En conjunto, la menor expresión en LRH-1 y GR en pacientes no respondedores a la terapia con GCs, podría explicar la menor producción de cortisol inducida por dexametasona en la mucosa *ex vivo* (junto con un efecto parcial de los antagonistas sobre la respuesta evocada por GCs).

La correlación positiva observada entre los niveles de mensajero de los distintos componentes de la vía esteroidogénica en mucosa, muestra que LRH-1 es dependiente de la expresión de GR, lo cual concuerda con nuestra propuesta y con la regulación directa de LRH-1 por GR observado en la línea celular (efecto de RU486 sobre la inducción de LRH-1 y ensayos inmunoprecipitación de cromatina).

La expresión de CYP11A1 fue baja sin encontrar diferencias entre los grupos, no obstante, la mayor expresión de LRH-1 en la mucosa de individuos sanos comparado con pacientes respondedores no se relaciona con la expresión de CYP11A1 observada. El trabajo de *Mueller. M y cols* describe que el tratamiento de la línea celular epitelial de intestino murino (mICcl2) con PMA induce la expresión de CYP11B1 y no de CYP11A1 (mediada por la proteína kinasa C, PKC), sin embargo el PMA induce sinérgicamente la expresión de ambas enzimas en células que sobre-expresan LRH-1 (45) esto podría sugerir que las enzimas esteroidogénicas serían reguladas independientemente y por mecanismos alternativos y posiblemente podrían requerir de co-reguladores (que actúen en conjunto con LRH-1 para inducir su expresión). Adicionalmente, la expresión de ambas enzimas esteroidogénicas en la mucosa intestinal puede ser inducida por la activación de células T

(mediante  $\alpha$ CD3) con un impacto directo en la producción de cortisol local (52), demostrando la participación de mecanismos alternativos en este proceso.

Adicionalmente, la expresión del transcrito CYP11B1 fue indetectable en la mucosa intestinal de pacientes, similar a lo reportado en pacientes y modelos murinos (15,52), al igual que en la expresión de CYP11A1 (14). El contenido de CYP11B1 indetectable podría atribuirse a mecanismos moleculares, como una baja estabilidad del mRNA; puesto que se ha reportado que una delección del C´ terminal del mRNA de CYP11B1 incrementa su estabilidad *in vitro* (53). Sin embargo, ambas enzimas fueron identificadas en la mucosa de individuos sanos y pacientes con CU mediante técnicas de inmunohistoquímica realizadas en nuestro laboratorio (parte de proyecto en curso, ver **Anexo 3**). Así, la detección escasa de estas enzimas a nivel de transcrito no necesariamente representa la expresión de la proteína o su funcionalidad en la producción de cortisol.

Asimismo, otras funciones han sido atribuidas al LRH-1 a nivel intestinal, tal como la proliferación celular (regulación de ciclinas D1 y E1 en sinergia con  $\beta$ -catenina) (15,49), y su implicancia en la mantención de la integridad de la barrera epitelial intestinal y protección a daño o muerte celular en un ambiente inflamatorio (37). Adicionalmente, LRH-1 podría regular la expresión de otras enzimas esteroidogénicas como CYP17 (participa en la diferenciación de células mesenquimales a esteroidogénicas) en otros órganos esteroidogénicos (e.g., gónadas) (40).

La vía CYP1A1 y CYP1B1 estarían involucradas en la polarización de macrófagos a un perfil M2 mediada por IL-13 (predominante en la mucosa intestinal inflamada de CU) y LRH-1, induciendo el ligando de PPAR $\gamma$  (15-HETE) crucial en este proceso (54).

Todos estos antecedentes dan cuenta de múltiples mecanismos de regulación de LRH-1 y las enzimas esteroidogénicas, los que podrían explicar la variabilidad respecto a la expresión de estos componentes en la mucosa intestinal. Aún cuando el rol principal de LRH-1 es la inducción de la expresión génica de ambas enzimas, otros mecanismos podrían estar influyendo en un sistema complejo (biopsia colonoscópica con múltiples tipos celulares, contexto inflamatorio y autoinmune implicado en la patología).

La expresión génica de la variante de GR $\beta$  en la mucosa de los pacientes con CU fue menor al GR total, concordante con lo caracterizado previamente en líneas celulares como HeLa y CEM-C7 y otros tejidos como hígado, cerebro, pulmón, corazón y músculo esquelético (21,51). Adicionalmente, GR $\beta$  está elevada en células mononucleares de

sangre periférica y en la mucosa intestinal de pacientes con EII, posiblemente provocado por las citoquinas pro-inflamatorias predominantes que alterarían el mecanismo de corte y empalme alternativo de GR (55). Así, niveles de GR $\beta$  elevados han sido directamente relacionados a la resistencia a GCs en variadas patologías inflamatorias (31,41,56). Los resultados obtenidos muestran que la expresión génica de GR $\beta$  tiende a ser mayor en pacientes con CU respondedores a la terapia comparado a individuos sanos; sin embargo, para los otros grupos (pacientes refractarios y dependientes) no son diferentes al grupo respondedor. La incorporación de un mayor número de pacientes es clave para obtener conclusiones respecto de la posible importancia de la expresión de GR $\beta$  en la cortico-resistencia, ya que además, existen reportes anteriores donde tampoco se encontraron diferencias en la expresión de GR $\beta$  entre pacientes respondedores y refractarios (51) lo que ha puesto a la asociación entre expresión de GR $\beta$  y cortico-resistencia en una posición controversial. Debido a que la actividad trans-represional de GR $\beta$  ha sido demostrada en células COS-7 (57), donde se sobreexpresó alcanzando niveles mucho mayores respecto a la baja expresión basal detectada en este y otros estudios (20,51). Además esto se contradice con lo encontrado por *Brogan et al* donde GR $\beta$  no inhibe la trans-represión de AP-1 y NF $\kappa$ B mediada por GR $\alpha$  en el mismo tipo celular, incluso al sobre-expresarse 10 veces (58).

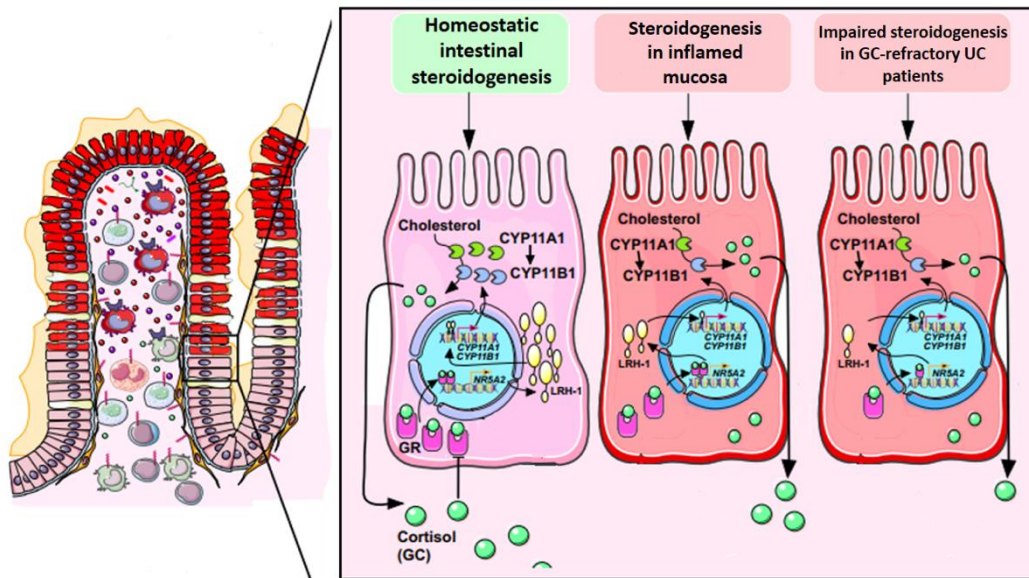
Durante el desarrollo de este trabajo, la expresión de GR $\alpha$  no fue posible detectar en la mucosa intestinal debido a que no existen metodologías validadas que permitan identificarla y diferenciarla de las demás isoformas mediante qPCR. Por lo tanto, la razón GR $\beta$ /GRt fue determinada para comparar la expresión de las isoformas de GR en cada grupo, permitiéndonos demostrar que GR $\beta$ /GRt fue mayor en pacientes con CU respondedores vs. individuos sanos, concordando con lo reportado anteriormente para una expresión de GR $\beta$  y GR $\beta$ /GR $\alpha$  mayor en pacientes con EII respecto a los individuos sanos (53) (no se observaron diferencias en GR $\beta$ /GRt entre los otros grupos de pacientes, debido a un n bajo).

Como parte del seguimiento de los pacientes incluidos en este estudio, una segunda colonoscopia fue realizada para evaluar los cambios en la mucosa intestinal luego del tratamiento con GCs, demostrando que la mucosa de pacientes con CU respondedores (aunque recuperada debido a una respuesta exitosa y en remisión), no necesariamente es comparable a la de un individuo sano, pudiendo existir lesiones y/o diferencias a nivel

anatómico, tisular, microscópico o incluso molecular que persisten en estas condiciones (Tabla 4). El análisis de expresión génica en las muestras disponibles de este seguimiento sugiere que el tratamiento con GCs produciría cambios en la expresión de algunos componentes en la mucosa intestinal de pacientes con CU con tendencias diferentes entre los grupos estudiados (Fig. suplementaria 2). La expresión de los componentes estudiados podría verse afectado por el daño en la mucosa epitelial intestinal provocado por la ulceración del tejido, reflejado en las características anatomopatológicas (criptitis, microabsesos o la diferenciación epitelial disminuida) observada en la mucosa inflamada de los pacientes respondedores, refractarios y dependientes en la colonoscopia 1 (parámetros que se mantuvieron alterados en la colonoscopia 2 de pacientes refractarios y dependientes). A pesar de que el número de pacientes reclutados hasta la fecha no permite sacar conclusiones al respecto, el seguimiento realizado es relevante, dado que permitirá obtener información de la expresión génica de estas moléculas en la mucosa intestinal luego de la activación de la vía por GCs en respondedores, o no inducida adecuadamente, refractarios y dependientes. Esta caracterización de la mucosa de los pacientes en el seguimiento resultará útil para atribuir, a través de la expresión de los componentes de la vía esteroideogénica, un perfil molecular de remisión endoscópica y por lo tanto recuperación de la integridad epitelial (pacientes respondedores en la colonoscopia 2), o cuando el tratamiento no logra inducir la remisión.

Un diagrama muestra un modelo de la mucosa intestinal y la participación de los componentes de la vía esteroideogénica (Fig. 13), de acuerdo a los resultados y tendencias

obtenidos junto con antecedentes de la literatura.



**Figura 13. Modelo de la participación de los componentes de la vía esteroidogénica en la mucosa intestinal en salud y enfermedad.** El diagrama muestra la expresión de los componentes de la ruta esteroidogénica en la mucosa intestinal sana, inflamada de pacientes con CU activa e inflamada de pacientes refractarios a la terapia con GCs. La expresión de GR y LRH-1 en la mucosa sana es mayor comparado con la mucosa inflamada y siendo más reducida en la mucosa de pacientes refractarios a la terapia con GCs. De igual manera, la producción de cortisol en la mucosa intestinal sana fue mayor comparada con la mucosa inflamada de pacientes respondedores y refractarios.

La expresión de las enzimas esteroidogénicas representa su regulación por LRH-1, de acuerdo a lo reportado en estudios anteriores (34,35,42).

Si bien, la información entregada por este estudio es novedosa y relevante para el conocimiento de la regulación de la vía esteroidogénica intestinal y el efecto de los GC, futuros experimentos serán fundamentales, tal como confirmar el contenido proteico de las enzimas esteroidogénicas post GCs (particularmente CYP11B1, productora directa de cortisol). Además, es imperativo, reclutar un mayor número de pacientes para poder realizar análisis estadísticos de los datos y para observar diferencias más claras respecto a la expresión de los componentes de la vía esteroidogénica evaluados en el presente estudio. Ya que al contar con la totalidad de las muestras y considerando el mecanismo molecular estudiado en el modelo *in vitro*, podría ser posible responder de manera concluyente a la interrogante que surge de la caracterización de la mucosa intestinal respecto a la expresión de los componentes de la vía esteroidogénica, en cuanto a la posibilidad de correlacionar una expresión disminuida en estos componentes con una

respuesta inadecuada al tratamiento con GCs implementado en la CU. Contar con un mayor número de muestras obtenidas de la colonoscopia de seguimiento (col 2) permitirá el estudio y caracterización de la mucosa luego de la terapia con GCs, pudiendo asociar la expresión de componentes de la vía como LRH-1 con la integridad de la mucosa intestinal (luego de la terapia), la que podría ser evaluada mediante parámetros anatomopatológicos y expresión de proteínas constituyentes de uniones estrechas reguladas por este factor.

Además, y de la misma manera en que se plantea en el modelo celular, una caracterización del contenido proteico y localización de los componentes a nivel de cripta y/o estroma (mediante IHQ o IFI) cobraría relevancia (puesto que se analizó la totalidad de la muestra, heterogénea en cuanto a los tipos celulares constituyentes). Además, la determinación de la localización sub celular (núcleo/citoplasma) de los componentes de la vía esteroidogénica en la mucosa de pacientes con CU es altamente relevante, ya que las diferencias entre grupos podría explicar los diferentes tipos de respuesta a GC y asociarlo con la regulación sus genes blancos. Una desregulación en cualquiera de estos niveles podría contribuir al efecto de refractariedad o de dependencia (observado en estos pacientes) lo que hace necesario su estudio y análisis en el futuro.

### **Principales hallazgos**

1. Determinación de la regulación de la vía esteroidogénica intestinal por glucocorticoides en línea celular de colon humano Ccd841CoN
  - Las células intestinales epiteliales Ccd841CoN producen cortisol en respuesta a dexametasona de manera sostenida en el tiempo estudiado.
  - La dexametasona induce la expresión del factor transcripcional LRH-1 a través de un mecanismo que requiere la participación de GR
  - El GR podría unirse a sitios GRE aparentemente funcionales en el promotor de LRH-1 para inducir su transcripción.
2. Caracterizar los componentes de la vía esteroidogénica en la mucosa intestinal de pacientes



con CU, clasificados según respuesta al tratamiento con GC.

- La caracterización de la mucosa intestinal de pacientes chilenos con CU, considerando la respuesta a glucocorticoides (determinada clínicamente) y su capacidad esteroideogénica (mediante la medición de la producción de cortisol y la expresión de los transcritos involucrados) fue evaluada.
- La mucosa intestinal humana tiene la capacidad de producir cortisol *ex vivo* inducida por glucocorticoides exógenos (dexametasona).
- La producción de cortisol inducida por glucocorticoides exógenos requiere la participación del receptor de glucocorticoides (GR) y el factor transcripcional LRH-1.
- Existen diferencias posibles en la expresión de LRH-1, GR $\beta$  y GR total en la mucosa de individuos sanos y pacientes con CU y también entre los diferentes grupos de pacientes con CU evaluados.

### **Conclusiones**

Recopilando los hallazgos de esta tesis aquí puntualizados junto con antecedentes anteriores, esta tesis permite concluir que existe una vía de producción de cortisol a nivel intestinal que puede ser activada por glucocorticoides exógenos constituyendo un mecanismo de retroalimentación positiva de la esteroideogénesis intestinal, la que, en consecuencia, podría tener una participación fundamental en la efectividad de la terapia con GCs en pacientes con CU. Los estudios *in vitro* aquí realizados permiten atribuirle la función regulatoria de esta vía a dos factores principales, GR y LRH-1, moléculas que aparentemente conversan y se correlacionan entre sí y cuya expresión e inducción sería imperativa para la activación de esta vía. Asimismo, los estudios *ex vivo* realizados en la mucosa intestinal de pacientes con CU permite confirmar la producción de cortisol intestinal inducida por GCs y, además, sugieren la participación e importancia que la expresión de los factores GR y LRH-1 podría tener en el tipo de respuesta que tenga el paciente a dicho tratamiento. Por lo que, si bien se necesita reclutar y estudiar un mayor número de pacientes, esta tesis propone encauzar estudios futuros relacionados a la terapia con GCs en EII hacia la activación de la vía esteroideogénica a nivel intestinal y puntualmente la regulación y conversación entre los componentes aquí descritos.

## **PROYECCIONES**

- Estudiar la cinética de inducción mediada por GCs de los componentes de la vía esteroidogénica
- Evaluar la localización subcelular de los componentes de la vía esteroidogénica antes y después del tratamiento con dexametasona.
- Evaluar el efecto del bloqueador SR-1848 en la respuesta inducida por dexametasona para determinar la importancia de LRH-1
- Comprobar la interacción entre GR y el promotor de LRH-1 en los sitios GRE identificados
- Ensayos de gen reportero usando la secuencia promotora como regulador, junto con mutagénesis sitio dirigida de los sitios GRE para comprobar su funcionalidad.
- Reclutar un mayor número de pacientes para realizar análisis estadísticos.
- Estudio y caracterización de la mucosa luego de la terapia con GCs (col 2)
- Caracterización de la expresión y localización de los componentes a nivel de cripta y/o estroma para diferenciar la expresión en cada área y tipo celular que conforma la muestra.
- Estudiar la localización sub celular de los componentes de la vía esteroidogénica en la mucosa de pacientes con CU

## **REFERENCIAS**

1. De Souza HSP, Fiocchi C. Immunopathogenesis of IBD: Current state of the art. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2016;13(1):13–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2015.186>
2. Dubois-Camacho K, Ottum PA, Franco-Muñoz D, De La Fuente M, Torres-Riquelme A, Díaz-Jiménez D, et al. Glucocorticosteroid therapy in inflammatory bowel diseases: From clinical practice to molecular biology. *World J Gastroenterol*. 2017;23(36):6628–38.
3. Jacob P. Epidemiology and risk factors. *Chronic Venous Disord Low Limbs A Surg Approach* [Internet]. 2015;12(4):35–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2015.34>
4. Simian D, Fluxá D, Flores L, Lubascher J, Ibáñez P, Figueroa C, et al. Inflammatory bowel disease: A descriptive study of 716 local Chilean patients. *World J Gastroenterol*. 2016;22(22):5267–75.
5. Costo A, Soto LR. EVIDENCIA DISPONIBLE Condición de Salud : Colitis Ulcerosa Tecnología Sanitaria Evaluada : Adalimumab , azatioprina golimumab , infliximab , mesalazina , lansoprazol , omeprazol ,.
6. Ungaro R, Mehandru S, Allen PB, Peyrin-Biroulet L, Colombel JF. Ulcerative colitis. *Lancet*. 2017;389(10080):1756–70.
7. Conrad K, Roggenbuck D, and Laass MW. Diagnosis and classification of ulcerative colitis. *Autoimmun Rev*. 2014;13(4–5):463–6.
8. Wu XR, Liu XL, Katz S, Shen B. Pathogenesis, diagnosis, and management of ulcerative proctitis, chronic radiation proctopathy, and diversion proctitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2015;21(3):703–15.
9. Nemeth ZH, Bogdanovski DA, Barratt-Stopper P, Paglinco SR, Antonioli L, Rolandelli RH. Crohn’s Disease and Ulcerative Colitis Show Unique Cytokine Profiles. *Cureus* [Internet]. 2017;9(4). Available from: <http://www.cureus.com/articles/6369-crohns-disease-and-ulcerative-colitis-show-unique-cytokine-profiles>

10. Lakatos PL, Lakatos L. Risk for colorectal cancer in ulcerative colitis: Changes, causes and management strategies. *World J Gastroenterol*. 2008;14(25):3937–47.
11. Turner D, Walsh CM, Steinhart AH, Griffiths AM. Response to Corticosteroids in Severe Ulcerative Colitis: A Systematic Review of the Literature and a Meta-Regression. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007;5(1):103–10.
12. Díaz-Jiménez D, Núñez L, De La Fuente M, Dubois-Camacho K, Sepúlveda H, Montecino M, et al. A functional IL1RL1 variant regulates corticosteroid-induced sST2 expression in ulcerative colitis. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–14.
13. Bouguen G, Dubuquoy L, Desreumaux P, Brunner T, Bertin B. Intestinal steroidogenesis. *Steroids* [Internet]. 2015;103:64–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2014.12.022>
14. Sidler D, Renzulli P, Schnoz C, Berger B, Schneider-Jakob S, Flück C, et al. Colon cancer cells produce immunoregulatory glucocorticoids. *Oncoimmunology*. 2012;1(4):529–30.
15. Coste A, Dubuquoy L, Barnouin R, Annicotte J-S, Magnier B, Notti M, et al. LRH-1-mediated glucocorticoid synthesis in enterocytes protects against inflammatory bowel disease. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2007;104(32):13098–103. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0702440104>
16. Rosenbaum M. Ulcerative colitis. *Psychosomatics*. 1983;24(6):528–9.
17. Monticelli LA, Osborne LC, Noti M, Tran S V., Zaiss DMW, Artis D. IL-33 promotes an innate immune pathway of intestinal tissue protection dependent on amphiregulin–EGFR interactions. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2015;112(34):10762–7. Available from: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1509070112>
18. de Iudicibus S, Franca R, Martelossi S, Ventura A, Decorti G. Molecular mechanism of glucocorticoid resistance in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2011;17(9):1095–108.
19. Faubion WA, Loftus E V., Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: A population-based study. *Gastroenterology*. 2001;121(2):255–60.

20. Pujols L, Mullol J, Pérez M, Roca-Ferrer J, Juan M, Xaubet A, et al. Expression of the human glucocorticoid receptor  $\alpha$  and  $\beta$  isoforms in human respiratory epithelial cells and their regulation by dexamethasone. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001;24(1):49–57.
21. Oakley RH, Sar M, Cidlowski JA. The Human Glucocorticoid Receptor Isoform. *J Biol Chem.* 1996;271(16):9550–9.
22. Lewis-Tuffin LJ, Jewell CM, Bienstock RJ, Collins JB, Cidlowski JA. Human Glucocorticoid Receptor  $\beta$  Binds RU-486 and Is Transcriptionally Active. *Mol Cell Biol.* 2007;27(6):2266–82.
23. Bunney, P. E., Zink, A. N., Holm, A. A., Billington, C. J., & Kotz CM. Corticosteroids-Mechanisms of Action in Health and Disease. *Physiol Behav.* 2017;176(1):139–48.
24. Aguilar DC, Strom J, Xu B, Kappeler K, Chen QM. Expression of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) in cardiomyocytes. *Cardiovasc Toxicol.* 2013;13(2):91–9.
25. Asselin-Labat ML, Biola-Vidamment A, Kerbrat S, Lombès M, Bertoglio J, Pallardy M. FoxO3 mediates antagonistic effects of glucocorticoids and interleukin-2 on glucocorticoid-induced leucine zipper expression. *Mol Endocrinol.* 2005;19(7):1752–64.
26. Noti M, Sidler D, Brunner T. Extra-adrenal glucocorticoid synthesis in the intestinal epithelium: More than a drop in the ocean? *Semin Immunopathol.* 2009;31(2):237–48.
27. Chen HL, Li LR. Glucocorticoid receptor gene polymorphisms and glucocorticoid resistance in inflammatory bowel disease: A meta-analysis. *Dig Dis Sci.* 2012;57(12):3065–75.
28. Hoffmeyer S, Burk O, Von Richter O, Arnold HP, Brockmöller J, John A, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: Multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(7):3473–8.
29. Ishiguro Y. Mucosal proinflammatory cytokine production correlates with endoscopic activity of ulcerative colitis. *J Gastroenterol.* 1999;34(1):66–74.
30. Fujishima S ichiro, Takeda H, Kawata S, Yamakawa M. The relationship between the expression of the glucocorticoid receptor in biopsied colonic mucosa and the

- glucocorticoid responsiveness of ulcerative colitis patients. *Clin Immunol* [Internet]. 2009;133(2):208–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2009.07.006>
31. Honda M, Orii F, Ayabe T, Imai S, Ashida T, Obara T, et al. Expression of glucocorticoid receptor  $\beta$  in lymphocytes of patients with glucocorticoid-resistant ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2000;118(5):859–66.
  32. Murphy SJ, Kornbluth A. Treatment of severe ulcerative colitis. *Med Ther Ulcerative Colitis*. 2014;30(1):267–72.
  33. Paine ER. Colonoscopic evaluation in ulcerative colitis. *Gastroenterol Rep*. 2014;2(3):161–8.
  34. De la Fuente M, MacDonald TT, Hermoso MA. The IL-33/ST2 axis: Role in health and disease. *Cytokine Growth Factor Rev* [Internet]. 2015;26(6):615–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.07.017>
  35. Díaz-Jiménez D, De la Fuente M, Dubois-Camacho K, Landskron G, Fuentes J, Pérez T, et al. Soluble ST2 is a sensitive clinical marker of ulcerative colitis evolution. *BMC Gastroenterol* [Internet]. 2016;16(1):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12876-016-0520-6>
  36. Jeffrey C. Webster\*, Robert H. Oakley†, Christine M. Jewell and JAC. Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative  $\beta$  isoform: A mechanism for the generation of glucocorticoid resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1987;84(7):1744–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3031647>  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC304517>
  37. Bayrer JR, Wang H, Nattiv R, Suzawa M, Escusa HS, Fletterick RJ, et al. LRH-1 mitigates intestinal inflammatory disease by maintaining epithelial homeostasis and cell survival. *Nat Commun* [Internet]. 2018;9(1):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-06137-w>
  38. Gomollón F, García-López S, Sicilia B, Gisbert JP, Hinojosa J. Guía clínica GETECCU del tratamiento de la colitis ulcerosa elaborada con la metodología GRADE [Internet]. Vol.

- 36, Gastroenterología y Hepatología. 2013. 1-47 p. Available from:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0210570512003056>
39. Olivares-Morales MJ, De La Fuente MK, Dubois-Camacho K, Parada D, Diaz-Jiménez D, Torres-Riquelme A, et al. Glucocorticoids impair phagocytosis and inflammatory response against Crohn's disease-associated adherent-invasive escherichia coli. *Front Immunol.* 2018;9(MAY):1–14.
40. Yazawa T, Inanoka Y, Mizutani T, Kuribayashi M, Umezawa A, Miyamoto K. Liver receptor homolog-1 regulates the transcription of steroidogenic enzymes and induces the differentiation of mesenchymal stem cells into steroidogenic cells. *Endocrinology.* 2009;150(8):3885–93.
41. Nagy Z, Acs B, Butz H, Feldman K, Marta A, Szabo PM, et al. Overexpression of GR $\beta$  in colonic mucosal cell line partly reflects altered gene expression in colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *J Steroid Biochem Mol Biol [Internet].* 2016;155:76–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.10.006>
42. Mueller M, Cima I, Noti M, Fuhrer A, Jakob S, Dubuquoy L, et al. The nuclear receptor LRH-1 critically regulates extra-adrenal glucocorticoid synthesis in the intestine. *J Exp Med.* 2006;203(9):2057–62.
43. Kim JW, Peng N, Rainey WE, Carr BR, Attia GR. Liver receptor homolog-1 regulates the expression of steroidogenic acute regulatory protein in human granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(6):3042–7.
44. Huang SC, Lee CT, Chung BC. Tumor necrosis factor suppresses NR5A2 activity and intestinal glucocorticoid synthesis to sustain chronic colitis. *Sci Signal.* 2014;7(314):1–12.
45. Mueller M, Atanasov A, Cima I, Corazza N, Schoonjans K, Brunner T. Differential regulation of glucocorticoid synthesis in murine intestinal epithelial versus adrenocortical cell lines. *Endocrinology.* 2007;148(3):1445–53.
46. Straub RH, Vogl D, Gross V, Lang B, Schölmerich J, Andus T. Association of humoral markers of inflammation and dehydroepiandrosterone sulfate or cortisol serum levels in patients with chronic inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 1998;93(11):2197–202.

47. Rafestin-Oblin ME, Lombes M, Lustenberger P, Blanchardie P, Michaud A, Cornu G, et al. Affinity of corticosteroids for mineralocorticoid and glucocorticoid receptors of the rabbit kidney: Effect of steroid substitution. *J Steroid Biochem.* 1986;25(4):527–34.
48. Cadepond, PhD F, Ulmann, MD, PhD A, Baulieu, MD, PhD E-E. RU486 (MIFEPRISTONE): Mechanisms of Action and Clinical Uses. *Annu Rev Med.* 1997;48(1):129–56.
49. Corzo CA, Mari Y, Chang MR, Khan T, Kuruvilla D, Nuhant P, et al. Antiproliferation activity of a small molecule repressor of liver receptor homolog 1. *Mol Pharmacol.* 2015;87(2):296–304.
50. Burnstein KL, Cidlowski JA. The down side of glucocorticoid receptor regulation. *Mol Cell Endocrinol.* 1992;83(1).
51. Wissmann C, Ddatz DRA, Del PMID, Emu MB. Glucocorticoid receptor expression in inflammatory bowel disease : evidence for a mucosal down-regulation in steroid-unresponsive ulcerative colitis. 2004;47–61.
52. Cima I, Corazza N, Dick B, Fuhrer A, Herren S, Jakob S, et al. Intestinal epithelial cells synthesize glucocorticoids and regulate T cell activation. *J Exp Med.* 2004;200(12):1635–46.
53. Lin TCE, Chien SC, Hsu PC, Li LA. Mechanistic study of polychlorinated biphenyl 126-induced CYP11B1 and CYP11B2 up-regulation. *Endocrinology.* 2006;147(3):1536–44.
54. Lefèvre L, Authier H, Stein S, Majorel C, Couderc B, Dardenne C, et al. LRH-1 mediates anti-inflammatory and antifungal phenotype of IL-13-activated macrophages through the PPAR $\gamma$  ligand synthesis. *Nat Commun.* 2015;6.
55. Orii F, Ashida T, Nomura M, Maemoto A, Fujiki T, Ayabe T, et al. Quantitative analysis for human glucocorticoid receptor  $\alpha/\beta$  mRNA in IBD. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;296(5):1286–94.
56. Zhang H, Ouyang Q, Wen ZH, Fiocchi C, Liu WP, Chen DY, et al. Significance of glucocorticoid receptor expression in colonic mucosal cells of patients with ulcerative colitis. *World J Gastroenterol.* 2005;11(12):1775–8.



57. Bamberger CM, Bamberger A, Castro M De, Chrousos GP. Glucocorticoid Receptor  $\beta$ , a Potential Endogenous Inhibitor of Glucocorticoid Action in Humans. 1995;95(June):2435–41.
58. Brogan JJ, Murray IA, Cerillo G, Needham M, White A, Davis JRE. Interaction of glucocorticoid receptor isoforms with transcription factors AP-1 and NF- $\kappa$ B : lack of effect of glucocorticoid receptor  $\beta$ . 1999;157:95–104.
59. Payne AH, Hales DB. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. Endocr Rev. 2004;25(6):947–70.
60. Taylor AE, Keevil B, Huhtaniemi IT. Mass spectrometry and immunoassay: How to measure steroid hormones today and tomorrow. Eur J Endocrinol. 2015;173(2):D1–12.

## **Anexo 1**

- Criterio de exclusión: No serán considerados aquellos pacientes que presenten alguna de las siguientes características: EII no clasificable, enfermedades autoinmunes, alergias alimentarias severas, enfermedad celíaca, diverticulitis, síndrome de intestino irritable o alguna infección al momento de la evaluación.
- Criterio de inclusión: Pacientes adultos que se atienden en CLC diagnosticados con colitis ulcerosa moderada o severa clasificada según índices de Mayo endoscópicos  $\geq 2$ , de los que se disponga biopsia obtenida por colonoscopia y sean clasificables según el tipo de respuesta al tratamiento observada.

## Anexo 2



### FORMA DE CONSENTIMIENTO

#### Pacientes con Colitis Ulcerosa

#### "Rol de la Señalización Mediada por Corticoides en Colitis Ulcerosa"

##### Responsables:

**Dra. Marcela Hermoso Ramello**, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Tel: 2 29786934. E-mail: [mhermoso@med.uchile.cl](mailto:mhermoso@med.uchile.cl)

**Dr. Rodrigo Quera Pino**, Dpto. Gastroenterología, Clínica Las Condes. Tel: 610-8755, Email: [rquera@clc.cl](mailto:rquera@clc.cl)

**Dr. Patricio Ibañez Lazo**, Dpto. Gastroenterología, Clínica Las Condes. Tel: 610-8755, Email: [pibanez@clinalascondes.cl](mailto:pibanez@clinalascondes.cl)

#### Declaración de los Investigadores

Nuestro equipo dirige una investigación en relación al mecanismo por el cual los corticoides disminuyen la inflamación y promueven la reparación de la mucosa intestinal en pacientes con colitis ulcerosa que reciben este tratamiento. Para ayudarlo a decidir de manera voluntaria si desea participar en este estudio, en el presente documento se explican los riesgos y beneficios de su participación para que usted pueda tomar una decisión informada. Es por esto que se le está solicitando su autorización para tomar muestras pequeñas (biopsias), de una zona de su colon junto con una muestra de sangre periférica (antebrazo), ahora durante su colonoscopia y en un nuevo procedimiento de control a los 6 meses.

#### Objetivos

El objetivo de este estudio es evaluar si el receptor de corticoides, el cual es una molécula importante para la respuesta a este tratamiento en pacientes con colitis ulcerosa, interviene en la generación de esteroides, los cuales son importantes para el control de la inflamación a nivel de la mucosa intestinal. Este conocimiento nos permitirá entender mejor el efecto de la terapia con corticoides en los pacientes que la reciben, y proponer a futuro nuevos blancos terapéuticos que mejoren la calidad de vida de los pacientes.

Para realizar este estudio, es necesario recolectar muestras de biopsia de mucosa intestinal y sangre periférica de 30 pacientes con colitis ulcerosa, junto con 15 pacientes controles (sin colitis ulcerosa). Adicionalmente, a los pacientes con colitis ulcerosa, se le tomará otra muestra de biopsia de mucosa intestinal y sangre 6 meses después de la primera toma. Este último procedimiento será costado por el proyecto por lo que no le generará ningún costo como participante. **Usted pertenece al grupo de pacientes con colitis ulcerosa**, por lo que le solicitamos su cooperación y autorización para realizar los siguientes procedimientos:





### Procedimientos

Si usted acepta participar en este estudio, se le solicitará lo siguiente:

1. Permitir el acceso a sus datos clínicos y de tratamiento relacionados a la Colitis Ulcerosa.
2. La donación de 7 muestras (biopsias) de tejido inflamado que se obtendrán durante el procedimiento colonoscópico ordenado por su médico tratante, las cuales serán estudiadas en el laboratorio de Inmunidad Innata, ubicado en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.
3. Le solicitaremos además que done una muestra de sangre de 8 ml (equivalente a la mitad de una tacita de café), la que será obtenida por una enfermera desde una vena de su brazo, usando la vía venosa que se instala durante la colonoscopia. A partir de esta muestra obtendremos el suero para evaluar moléculas asociadas a la inflamación.
4. Por último, seis meses posterior a la primera colonoscopia, le solicitaremos que se realice un nuevo procedimiento colonoscópico de control, donando 3 biopsias de mucosa intestinal y una muestra de sangre para determinar procesos involucrados en la curación de la mucosa intestinal y la disminución de la inflamación. Este procedimiento será realizado por su médico tratante en Clínica Las Condes y no tendrá costo para usted.

### Beneficios

Los beneficios de dicho estudio se relacionan con el avance en el conocimiento de la colitis ulcerosa y el beneficio futuro que esto pudiera aportar en el control y tratamiento de otros enfermos.

### Riesgo, Stress o Incomodidad

**Riesgo de la Toma de Muestra (sangre):** La toma de la muestra de sangre puede causar alguna incomodidad y en muy raras ocasiones una equimosis (moretón), sin embargo, se tomarán todas las precauciones universales y estandarizadas para reducir su riesgo.

**Riesgo de la Toma de Muestra (biopsia de mucosa intestinal):** las muestras que se extraerán para este estudio son una muestra superficial de la mucosa del colon y se obtendrá durante el procedimiento colonoscópico para el diagnóstico o de seguimiento de su enfermedad, por lo tanto, no implica un riesgo extra para usted y tampoco ninguna demora o procedimiento anexos a su examen.

**Tensión y Ansiedad:** Es posible que a usted le inquiete discutir su historia médica. Alguno de los investigadores conversará con usted para aclarar sus dudas, si existen.

### Complicaciones

En el caso de que usted presente algún efecto inesperado como molestias en el punto donde tomaron la muestra sanguínea, o molestias intestinales no usuales para su enfermedad, debe contactarse con su médico tratante Dr. Rodrigo Quera Pino ó el Dr. Patricio Ibañez.





#### **Costos**

El costo de la primera colonoscopia realizada para el diagnóstico o control de su patología, así como también exámenes con fines clínicos deben ser cubiertos por usted de acuerdo a su seguro de salud. Sin embargo, las muestras de tejido a utilizar en este estudio y su procesamiento en el laboratorio de Inmunidad Innata no tendrán ningún costo para usted.

La colonoscopia de seguimiento que se llevará a cabo en 6 meses no tendrá ningún costo para usted, lo cual incluye la anestesia (en caso de ser necesaria) y el análisis histopatológico de las muestras junto con otros ensayos con objetivos científicos.

#### **Privacidad**

Los resultados de este estudio, sólo serán entregados a las pacientes participantes de este estudio, si lo solicitan, y no se entregará información ni a familiares ni a ninguna otra persona. Sólo los miembros del grupo de investigación se contactarán con los pacientes y tendrán acceso a la información, manteniendo de esta manera la máxima confidencialidad de su participación. Cada paciente tendrá un código, el que se establecerá previo a la obtención de los datos. El personal de colaboración será entrenado para que conserve un comportamiento ético respecto de la información. Cualquier publicación científica de los resultados de esta investigación será completamente anónima.

#### **Utilización de la muestra de tejidos**

Las muestras obtenidas y los datos entregados serán utilizados sólo para los fines de la investigación propuesta. Finalizando este estudio, podrían usarse para investigaciones relacionadas con el tema. Si las muestras se utilizaran para investigar en otras áreas, se le solicitará el consentimiento respectivo. Las muestras se mantendrán por tiempo indefinido en el laboratorio de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, bajo la custodia de Dra. Marcela Hermoso Ramello.

#### **Comunicación**

La investigación a la cual se le esta invitando a participar es un proyecto multicéntrico, en el que participan equipos de la Clínica Las Condes y el Laboratorio de Inmunidad Innata de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. En caso de dudas o consultas de este proyecto usted se podrá contactar con el médico a cargo, información que se indica en la primera página de este consentimiento.

Este estudio fue aprobado por los Comité de Ética de la Clínica Las Condes y la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.





### Voluntariedad y derechos del participante

Su participación será totalmente voluntaria en esta investigación. En caso de rechazar esta invitación, se garantiza que la atención y dedicación entregada por su médico tratante no será afectada. En caso que usted ingrese a este proyecto, tendrá el derecho de retirarse del estudio en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones y sin que se altere la calidad de la atención que tiene derecho a recibir.

### Otros derechos del participante

En caso de dudas sobre sus derechos debe comunicarse con el presidente del Comité de ética de investigación en seres humanos, Dr. Manuel Oyarzún G., Teléfono: 2-9789536, email: [comiteceish@med.uchile.cl](mailto:comiteceish@med.uchile.cl), cuya oficina se encuentra ubicada a un costado de la biblioteca central de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile en Av. Independencia 1027, Comuna de Independencia.

### Declaración del participante

Datos del/da la paciente y de su representante en caso de incapacidad del paciente:

APellidos y nombre, del paciente	RUT:
APellidos y nombre del representante	RUT:

Profesionales que intervienen en el proceso de información y/o consentimiento:

APellidos y nombre	Fecha	Firma



YO, Sr. (a) \_\_\_\_\_, manifiesto que estoy conforme con la información anterior. He leído y podido preguntar y aclarar todas mis dudas. Por eso he tomado consciente y libremente la decisión de autorizarla. Me queda claro que cualquier pregunta que desee hacer a futuro acerca de la investigación me será respondida por alguno de los investigadores. También sé que puedo retirar mi consentimiento cuando lo estime oportuno.



**Márquese con una X**

(  SI  NO ) Autorizo la conservación y utilización posterior de mis muestras biológicas para investigación relacionada directamente con la enfermedad que se estudia.

(  SI  NO ) Autorizo que, en caso de que mis muestras biológicas vayan a ser utilizadas en otras investigaciones diferentes, los investigadores se pongan en contacto conmigo para solicitar me consentimiento.

(  SI  NO ) Autorizo la difusión del conocimiento científico.

**REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO:**

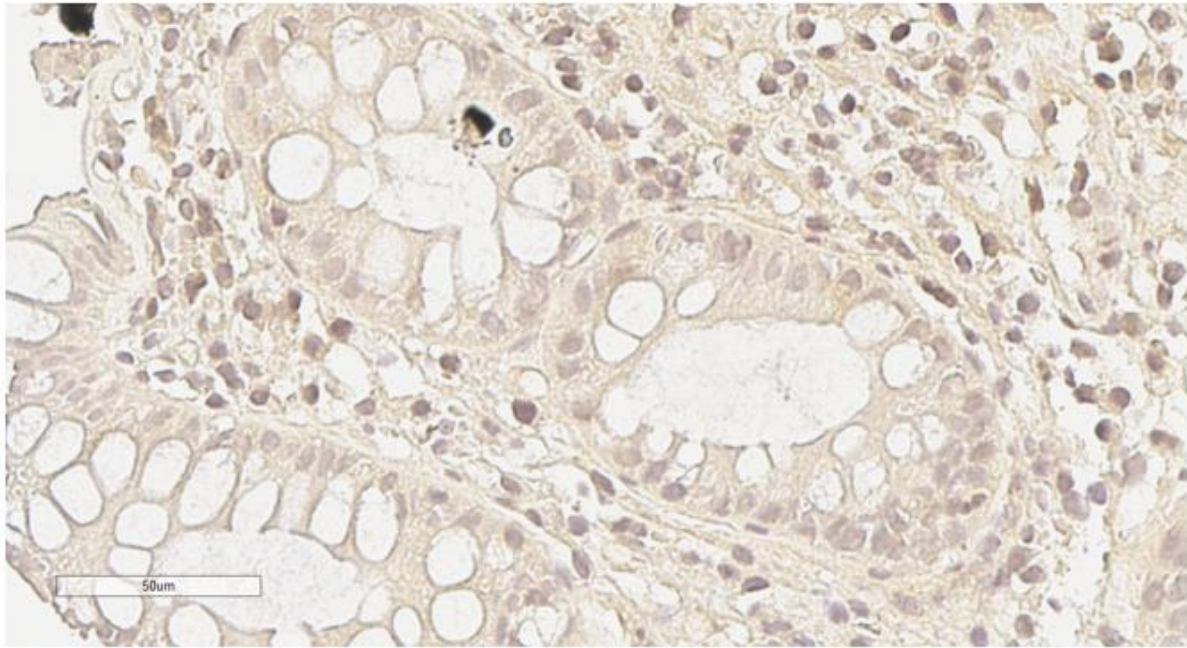
YO, Sr. (a) \_\_\_\_\_, de forma libre y consciente he decidido retirar el consentimiento para este estudio.

En Santiago a \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_\_.

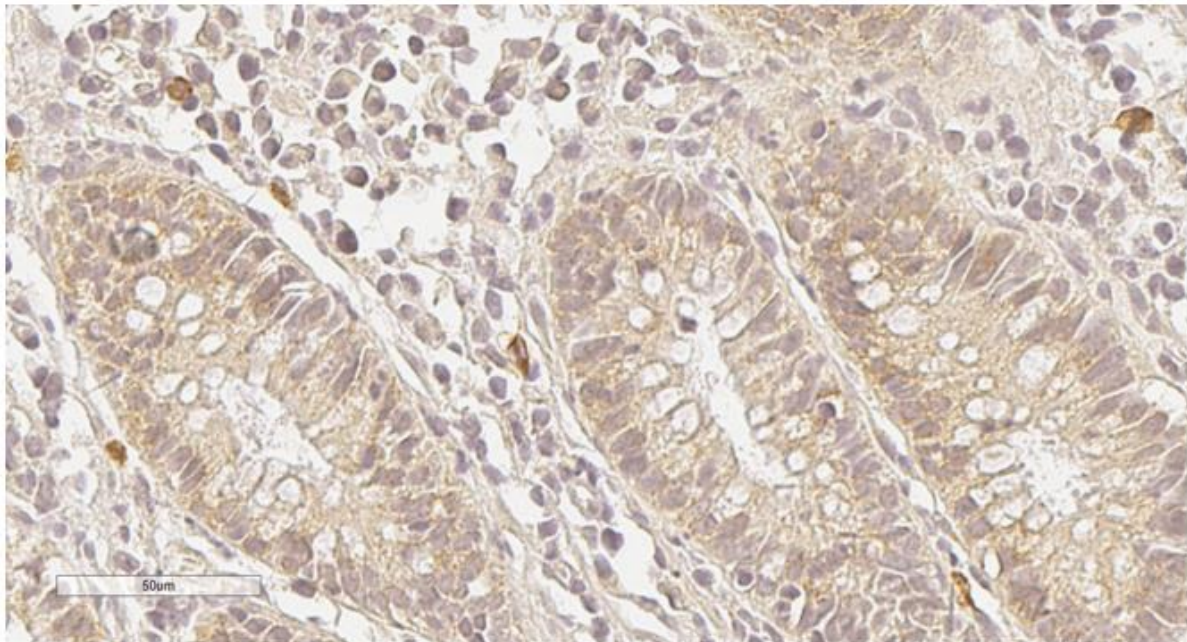


### Anexo 3

A



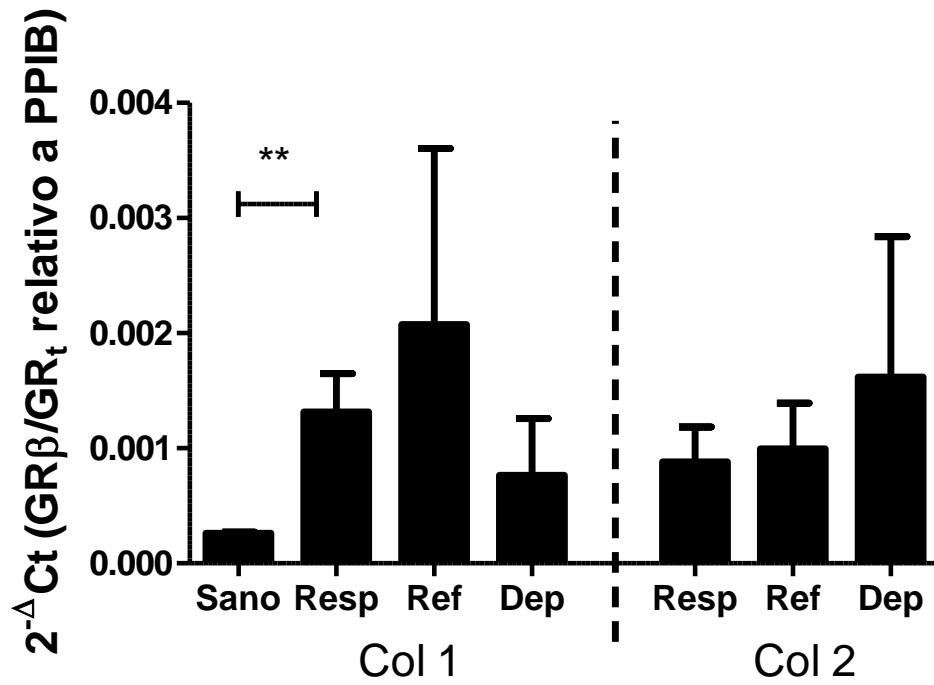
B



Anexo 3. Detección mediante IHQ de CYP11B1 (A) y CYP11A1 (B) en mucosa intestinal de paciente con CU.

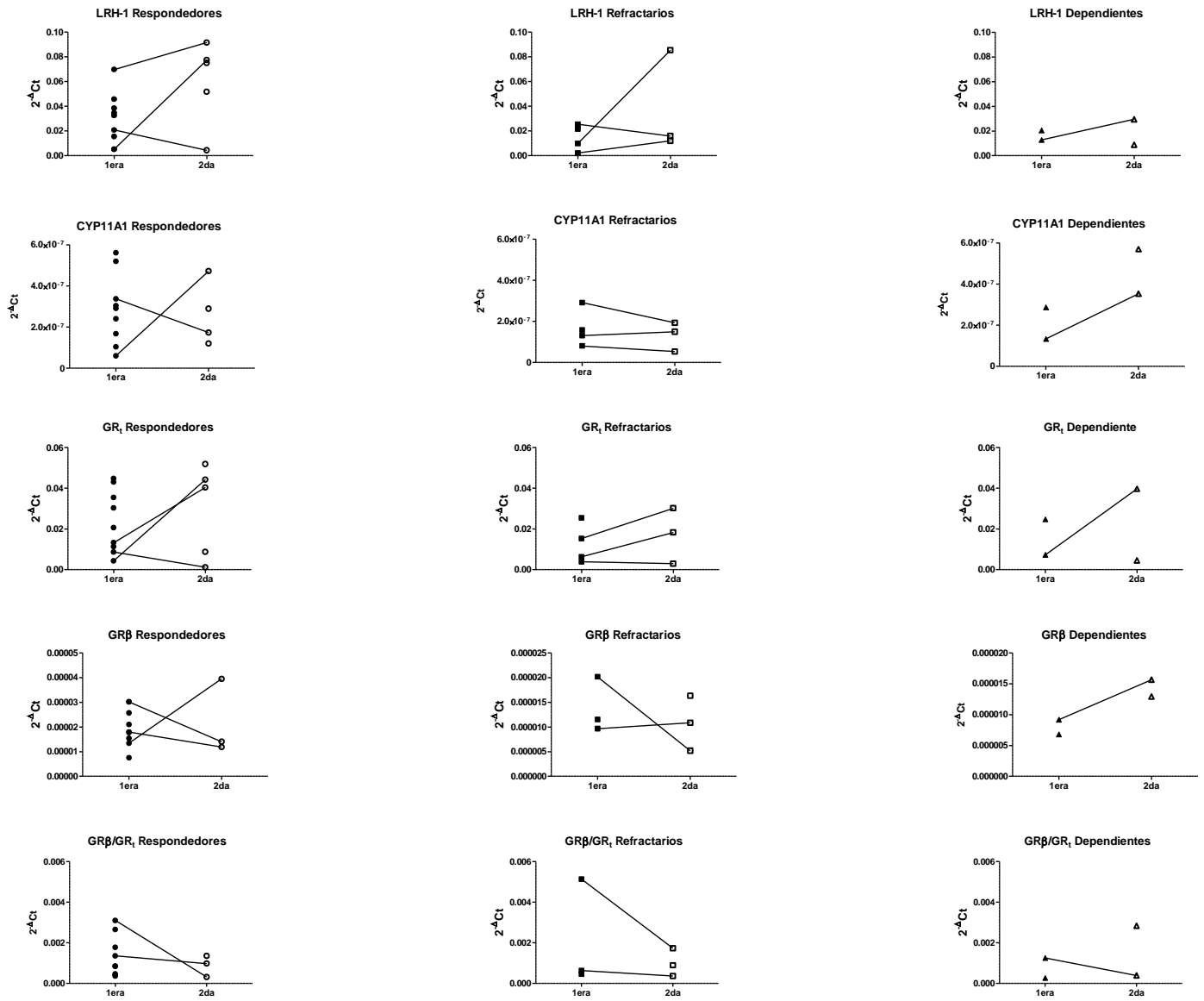


Figura Suplementaria 1



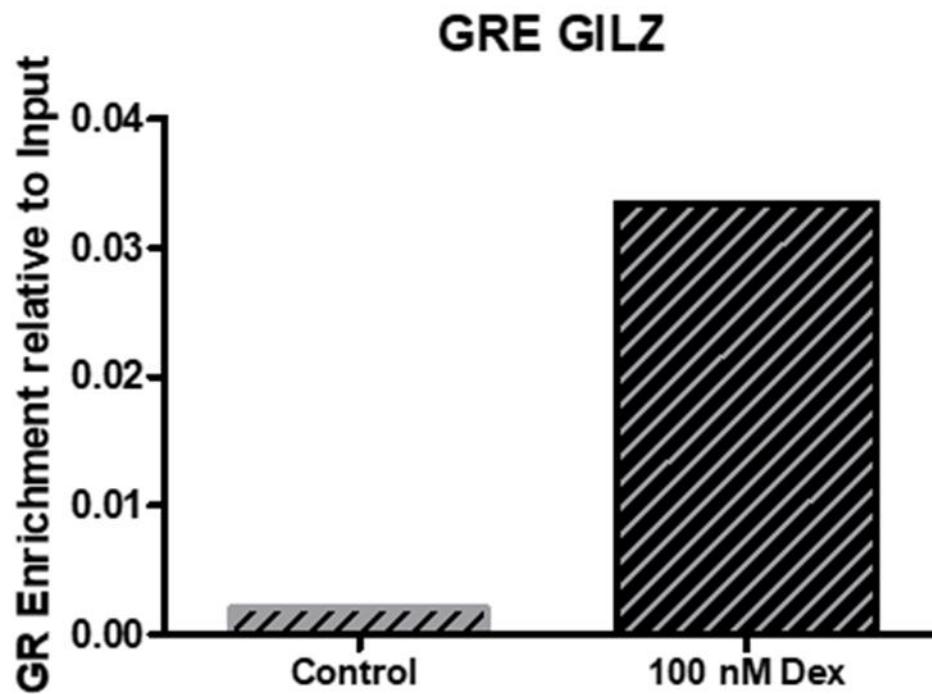
**Figura Suplementaria 1.** Expresión de GR $\beta$  normalizado a la expresión de GR total en la mucosa de individuos sanos (Sano) y pacientes con CU (Resp, Ref y Dep) en muestras obtenidas previo al inicio del tratamiento con GC (col 1) y posterior al tratamiento (col 2)

## Figura Suplementaria 2



**Figura Suplementaria 2.** Comparación pareada de la expresión de cada uno de los componentes de la vía esteroidogénica entre la colonoscopia 1 (1era) y la colonoscopia 2 (2da) para cada paciente con CU estudiado y en cada grupo de pacientes.

Figura Suplementaria 3



**Figura Suplementaria 3.** Enriquecimiento del GRE del gen GILZ relativo a la muestra input al comparar lo obtenido para la condición sin tratamiento (Control) y lo obtenido en el DNA de células tratadas por 2 horas con dexametasona 100 nM (100 nM Dex) a modo de control positivo.

Figura Suplementaria 4

	Cortisol basal col 1	Cortisol basal col 2	Cortisol post-dex col 1	Cortisol post-dex col 2	LRH-1 col 1	LRH-1 col 2
LRH-1 col 1	r=-0,2078 p=0,4398	-	r=0,3015 p=0,2396	-	-	r=0,2143 p=0,6615
LRH-1 col 2	-	r=-0,3206 p=0,3664	-	r=-0,1879 p=0,6032	r=-0,1190 p=0,7930	-
GR total col 1	r=-0,1358 p= 0,6032	-	r=0,0 p= 1,000	-	<b>r=0,4262 p=0,0778</b>	-
GR total col 2	-	r=-0,1119 p=0,7589	-	r=-0,1636 p= 0,6567	-	<b>r=0,7576 p=0,0149</b>
CYP11A1 col 1	r= -0,05697 p= 0,8281	-	<b>r=0,4464 p=0,0725</b>	-	r=-0,02478 p=0,9222	-
CYP11A1 col 2	-	r= -0,05941 p= 0,8801	-	r=0,06667 p=0,8801	-	r=-0,2833 p=0,4630

	GR total col 1	GR total col 2	CYP11A1 col 1	CYP11A1 col 2
LRH-1 col 1	<b>r=0,4262 p=0,0778</b>	-	r=-0,02478 p=0,9222	-
LRH-1 col 2	-	<b>r=0,7576 p=0,0111</b>	-	r=0,06667 p=0,8548
GR total col 1	-	r= 0,07143 p=0,9063	r=0,9816 p=0,6961	-
GR total col 2	r= 0,3810 p= 0,3599	-	-	r=-0,01667 p=0,9816
CYP11A1 col 1	r=-0,02788 p=0,9126	-	-	r=0,1172 p=0,7756
CYP11A1 col 2	-	r=-0,01667 p=0,9816	r=0,3214 p= 0,4976	-

**Figura Suplementaria 4.** Tabla resumen de coeficientes de Spearman (r) y valores p (p) para las correlaciones estadísticas analizadas entre la expresión de los componentes de la vía esteroidogénica evaluados en mucosa intestinal (biopsias colonoscópicas humanas de individuos sanos y pacientes con CU).