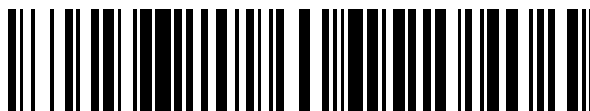


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 590**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/37** (2006.01)

**C07K 14/81** (2006.01)

**G01N 33/573** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.09.2013 PCT/US2013/058296**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.03.2014 WO14039699**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2013 E 13834474 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.01.2018 EP 2893032**

54 Título: **Métodos y composición para detectar la disfunción de la barrera celular intestinal**

30 Prioridad:

**05.09.2012 US 201261697190 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**26.04.2018**

73 Titular/es:

**MAXIMUS DIAGNOSTIC TECHNOLOGIES LLC  
(100.0%)**

**412 Miramar Boulevard  
Little Rock, AR 72223 , US**

72 Inventor/es:

**IRVIN, RANDALL, THOMAS;  
LIU, JULIA y  
DAVIS, ELISABETH, MELIKA**

74 Agente/Representante:

**ROEB DÍAZ-ÁLVAREZ, María**

ES 2 665 590 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Métodos y composición para detectar la disfunción de la barrera celular intestinal

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos y una composición para detectar disfunciones de la barrera celular asociadas con el síndrome del intestino irritable (SII) y la enfermedad inflamatoria intestinal (EII).

**10 Antecedentes de la invención**

El síndrome del intestino irritable (SII) es una afección clínica común caracterizada por cambios en la frecuencia del intestino, consistencia y malestar abdominal. Estudios epidemiológicos que usan los criterios de Roma II indican que la prevalencia de SII varía del 5 % al 12 % en Norteamérica, 1 % al 22 % en Asia, y 1 a 8 % en Europa. Hay un predominio femenino observado en la mayoría de los estudios, particularmente de países Occidentales. Uno de los principales conductores del SII puede ser la extrusión anormal de la célula epitelial intestinal (IEC).

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es un grupo de afecciones inflamatorias del colon y el intestino delgado. Los principales tipos de EII son la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. Tanto SII como EII pueden ser debidas a, o agravadas por la extrusión anormal de la célula epitelial intestinal (IEC) que conduce a la disfunción de la barrera celular en el paciente.

**Compendio de la invención**

La invención incluye, en una realización, un método para detectar el síndrome del intestino irritable (SII) o la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) en un paciente (a) tiñendo las células epiteliales intestinales, orofaríngeas, o bucales del paciente con una sonda que tiene un marcador detectable conjugado con un inhibidor de la caspasa-1, y (b) examinando las células epiteliales intestinales, orofaríngeas o bucales teñidas para la presencia de niveles elevados del marcador detectable, en relación con las células epiteliales intestinales, orofaríngeas o bucales similarmente teñidas de un individuo normal, respectivamente, como evidencia de los niveles por encima de lo normal de caspasa-1 asociada a las células epiteliales intestinales, orofaríngeas o bucales del paciente.

Niveles elevados de caspasa-1 en las células epiteliales intestinales (IEC) del paciente, células epiteliales orofaríngeas (OEC) o células epiteliales bucales (BEC) es un indicador de disfunción de la barrera celular asociada al síndrome del intestino irritable (SII) o la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) en el paciente.

En una realización, se obtienen IEC del paciente a partir de una biopsia o aspiración del revestimiento intestinal de los pacientes, se tiñen *in vitro* con un marcador de fluorescencia, y se analizan para el nivel de fluorescencia. En otra realización, se obtienen OEC del paciente a partir de una biopsia dental o aspiración de las células de la orofaríngeas en el paciente, se tiñen *in vitro* con un marcador de fluorescencia y se analizan para el nivel de fluorescencia. En una tercera realización, se obtienen BEC del paciente, por ejemplo, mediante hisopado suave de la mejilla, se tiñen *in vitro* por un marcador de fluorescencia, y se analizan para el nivel de fluorescencia. La detección de fluorescencia puede ser por microscopía de fluorescencia, lectores de placa de fluorescencia, citometría de flujo, u otros métodos adecuados para detectar y medir los niveles de fluorescencia.

En otra realización general, niveles elevados de caspasa-1 en OEC o BEC es diagnóstico de enfermedad de Crohn, un tipo fundamental de EII.

La sonda puede ser un conjugado del inhibidor de la caspasa-1, tal como el tetrapéptido YVAD, y un fluorocromo. Una sonda como ejemplo tiene la estructura de Alexa Fluor 488-GGGG-YVAD-FMK.

En una realización como ejemplo las células se tiñeron (a) una primera sonda que comprende un primer marcador detectable conjugado con un inhibidor de la caspasa-1, y (b) una segunda sonda que comprende un segundo marcador detectable diferente del primer marcador conjugado con un inhibidor de la caspasa 3y7. Las células se analizaron para determinar la relación del marcador asociado con caspasa-1 y el marcador relativo al marcador asociado con la caspasa-3y7. La relación de los marcadores de caspasa-1 y caspasa 3y7 es significativamente menor, por ejemplo, al menos 40 % menor, en sujetos sanos que en los sujetos con SII o EII. Una segunda sonda como ejemplo es un conjugado del inhibidor de la caspasa 3/7 I y un fluorocromo cuya absorción pico y longitudes de onda de emisión son diferentes de aquellas del primer fluorocromo sonda.

El método se puede usar para indicar el tratamiento al paciente por un inhibidor de caspasa-1, un agente antiinflamatorio, un probiótico o una combinación de estos agentes cuando el nivel de la caspasa-1 en las IEC es significativamente elevado por encima de los niveles normales.

En otra realización general, las IEC, OEC o BEC se tiñen *in situ*, y se ven por endomicroscopía láser confocal basada en sonda (pCLE).

En otro aspecto, la invención incluye un método de detección de la disfunción de la barrera celular intestinal en un paciente mediante las etapas de obtención de una imagen *in situ* de las IEC de un paciente por endomicroscopía láser confocal basada en sonda (pCLE), y recuento de las IEC en la imagen para determinar el número de huecos en las IEC captadas en imagen. Una densidad de hueco mayor de aproximadamente 2 por cien células es indicativo de disfunción de la barrera celular, y se puede usar como indicador para el tratamiento del paciente, por ejemplo, por un agente probiótico.

También se describe una composición sonda para su uso en la detección de la disfunción de la barrera celular intestinal. La composición incluye (a) una primera sonda que comprende un primer marcador detectable conjugado con un inhibidor de la caspasa-1, y (b) una segunda sonda que comprende un segundo marcador detectable diferente del primer marcador conjugado con un inhibidor de la caspasa-3/7. La primera sonda puede ser un conjugado del tetrapéptido YVAD y un fluorocromo, tal como una sonda que tiene la estructura de Alexa Fluor 488-GGGG-YVAD-FMK. La segunda sonda puede ser un conjugado del inhibidor I de la caspasa-3/7 y un fluorocromo diferente de ese en la primera sonda.

Estos y otros objetivos y características de la invención llegarán a estar más completamente claros cuando la siguiente descripción detallada de la invención se lea junto con los dibujos adjuntos.

### Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Activación de caspasa-1 de extrusión celular inducida de IEC en la monocapa de T84 polarizada. (a) tinción con FLICA 1 representativa (verde) de caspasa-1 activada en células T84 cultivadas tratadas con nigericina (50  $\mu$ M). Rojo, Colorante ZO-1; azul, DAPI, verde, colorante FLICA 1 (barras de escala, 50  $\mu$ m). (b) expresión incrementada de caspasa-1 activa (p10) en células T84 tratadas con nigericina (50  $\mu$ M). (c) apariencia en TEM de las células T84 tratadas con nigericina: condensación de cromatina alrededor de la membrana nuclear, vacuolas claras pequeñas y grandes con cuerpos densos en el citoplasma, y mitocondria intacta con incremento de la densidad de la matriz. A, superficie apical, B, superficie basal, N, núcleo (barras de escala, 2  $\mu$ m).

Figura 2. Permeabilidad alterada de las monocapas polarizadas después de la activación de la caspasa-1. (a) reducción dependiente de la dosis en RET ( $\pm$ D.T.) de las monocapas de T84 tratadas con nigericina, invertido con Ac-YVAD-CMK (a nigericina 25  $\mu$ m). (b) reducción dependiente del tiempo en RET medida por ECIS de monocapas de T84 tratadas con nigericina, invertido con Ac-YVAD-CMK (a nigericina 25  $\mu$ m). (c) movimientos de microesferas Fluoresbrite® YG y *E. coli* TMW2.497 a través de la monocapa tratada con nigericina 10  $\mu$ M durante la noche. Rojo, colorante ZO-1; verde imagen del centro, microesferas de 1  $\mu$ m, verde imagen de la derecha, *E. coli* TMW2.497 (barras de escala, 50  $\mu$ m). Los datos son representativos de tres experimentos independientes. \*P<0,05.

Figura 3. Activación incrementada de la caspasa-1 en ratones IL-10 KO en comparación con WT. (a) expresión incrementada de la caspasa-1 activa (p10) en los IL-10 KO por análisis por transferencia Western. (b) IL-1 $\beta$  activa incrementada en tejido intestinal de los IL-10 KO (N=5). (c) Imágenes representativas de secciones intestinales teñidas con PCNA de ratones WT y IL-10 KO (barras de escala, 50  $\mu$ m). (d) número de células con tinción PCNA positiva por cripta de tejido intestinal de roedor. \*P<0,05.

Figura 4. Permeabilidad incrementada para micropartículas y microbios del lumen en los ratones IL-10 KO. (a) permeación de FITC-dextrano oralmente administrado en muestras de sangre (N=4). (b) presencia de microesferas Fluoresbrite® de 0,5  $\mu$ m oralmente administradas en las muestras de sangre (N=6). (c) translocación de *E. coli* TMW2.497 a hígado y bazo (N=4). (d) imágenes representativas de *E. coli* TMW2.497 que entra en una zona de extrusión en el intestino de ratón. \*P<0,05, \*\*P<0,01.

Figura 5. Modulación de la caspasa-1 en la extrusión de IEC y permeación de microesferas *in vivo*. (a) tratamiento con Ac-YVAD-CMK 10 mg/kg sobre la extrusión de IEC en ratones IL-10 KO medida por densidad de hueco epitelial usando endomicroscopía confocal con el tiempo (N=5). (b) presencia de microesferas Fluoresbrite de 0,5  $\mu$ m oralmente administradas en las muestras de sangre de ratones IL-10 KO (N=6). (c) sondaje orogástrico de pili tipo IV de *P. aeruginosa* 0,33 mg/kg durante 1 día sobre la extrusión de IEC en ratones WT (N=3) medida por la densidad de hueco. \*P<0,05.

Figura 6. Activación de caspasa-1 y caspasa-3y7 de IEC en pacientes. (a) machas de caspasa-1 y caspasa-3y7 activadas representativas de muestras de biopsia de mucosa, indicando las puntas de flecha blancas IEC positivamente teñidas (barras de escala, 50  $\mu$ m). (b) células teñidas con FLICA 1 o 3y7 normalizadas al número total de células epiteliales ( $\pm$ D.T.) en muestras de biopsia de mucosa en pacientes control (N=3) y con EII (N=3). (c) células epiteliales e inmunes representativas del bloque de citología preparado a partir de aspirados del lumen de pacientes con EII (colorante H&E, aumento 400x). (d) número de IEC extruidas ( $\pm$ D.T.) en aspirados de lumen de pacientes control (N=7) y con EII (N=11). (e) la relación de células extruidas positivas caspasa-1 activada y caspasa 3y7 en los aspirados de lumen. \*P<0,05.

Figura 7. Expresión de caspasa 1 y IL-1 $\beta$  activadas en el tejido mucoso de pacientes control asintomáticos (N=3) y con EII (N=3). (a) expresión incrementada de IL-1 $\beta$  activa en pacientes con EII en comparación con control medida por ELISA. (b) análisis por transferencia Western que confirma la expresión incrementada de IL-1 $\beta$  activa en íleo terminal de pacientes con EII. (c) expresión incrementada de caspasa-1 (p10) activa en pacientes con EII por análisis por transferencia Western. \* P<0,05.

Figura 8. Imagen de pCLE representativa del íleo terminal de un paciente usada para el recuento de células

epiteliales y huecos. No se observaron huecos en esta imagen. Indicando las flechas blancas las células epiteliales individuales usadas en el recuento de células.

Figura 9. Imagen de pCLE del íleo terminal de los pacientes. a) imagen representativa del íleo terminal de un paciente control sano (izquierda) y un paciente con SII (derecha). La *lamina propria* y el lumen de las vellosidades están marcados. Las cabezas de flecha blancas indican dos huecos epiteliales adyacentes que aparecen como áreas hiperdensas en el revestimiento del epitelio. b) Tres imágenes de pCLE consecutivas usadas en el análisis para el paciente control. c) Tres imágenes de pCLE consecutivas usadas en el análisis para el paciente con SII. Barra de escala: 20  $\mu$ m.

Figura 10. Comparación de la densidad de hueco epitelial en el íleo terminal de pacientes control y con SII (media  $\pm$  amplitud intercuartil). La densidad de hueco epitelial se expresa como el número de hueco epitelial por 1.000 células contadas. \* indica  $p < 0,001$ .

La Figura 11 muestra los niveles de expresión de Caspasa-1, determinados por análisis por transferencia Western, en células epiteliales ofaríngeas de una biopsia dental en un paciente normal y un paciente con enfermedad de Crohn.

## Descripción detallada de la invención

### A. Método de detección de la disfunción de la barrera celular mediante tinción de Caspasa-1

#### A.1. resultados de extrusión de IEC mediada por Caspasa-1 en brechas en la monocapa epitelial

Para investigar la morfología de la extrusión de IEC inducida por caspasa-1, aplicamos nigericina, un activador de inflammasoma dependiente de Nlrp3 bien establecido a monocapas de T84 polarizadas. Usando tinción con FLICA 1, observamos caspasa-1 activada y extrusión celular incrementadas en las monocapas a las 3 horas después del tratamiento (Figura 1a). La expresión de la caspasa-1 activa en células T84 tratadas con nigericina se confirmó por análisis por transferencia Western (Figura 1b). La apariencia morfológica de las células extruidas de las monocapas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) reveló distinta condensación de cromatina en el núcleo, mitocondria intacta y pequeñas o grandes vacuolas claras en el citoplasma (Figura 1c).

Para determinar si esta forma de extrusión celular da como resultado o no pérdida de función de barrera, medimos la resistencia eléctrica transepitelial (TER). Después de la exposición a nigerina, desarrolló disfunción de la barrera dependiente de la dosis, la cual se abrogó mediante el pretratamiento con un inhibidor de caspasa-1 selectivo, potente e irreversible Ac-YVAD-CMK a las 3 horas (Figura 2a) y después de tratamiento durante la noche (Figura 2b). Dado que la brecha en las monocapas de T84 parecía ser de 1 a 2  $\mu$ m de diámetro en las imágenes de TEM, evaluamos la integridad epitelial a micropartículas (Microesferas Fluoresbrite® de 1  $\mu$ m) y microbios (*E. coli* TMW2.497) usando la dosis más baja del tratamiento con nigericina. Se observaron movimientos de microesferas y *E. coli* desde la cámara superior a través de la monocapa a la cámara inferior de Transwell (Figura 2c). Las microesferas Fluoresbrite y *E. coli* TMW2.947 se recuperaron en los medios del pocillo basolateral.

#### A.2. Modulación de la caspasa-1 sobre la extrusión celular e integridad epitelial *in vivo*

Para entender el efecto de la extrusión de IEC inducida por caspasa-1 sobre la permeabilidad del intestino *in vivo*, primero examinamos si la extrusión celular incrementada (medida por la densidad incrementada de huecos epiteliales) observada en ratones IL-10 KO en comparación con 129/SvEv (WT) era o no debida a la activación incrementada de la caspasa-1. La expresión incrementada de caspasa-1 activa en el intestino delgado de ratones IL-10 KO se vio en el análisis por transferencia Western (Figura 3a) y se confirmó con expresión incrementada de IL-1 $\beta$  activa por ELISA (Figura 3b). Para determinar si la proliferación celular reducida en IL-10 KO contribuía a las diferencias en las densidades de hueco epiteliales observadas, teñimos las muestras intestinales de dos cepas de ratón con PCNA. IL-10 KO tenía una reducción del 38 % en proliferación celular en comparación con ratones WT (Figuras 3c y d).

El efecto de la extrusión incrementada de IEC sobre la permeabilidad intestinal se investigó con permeación de macromoléculas (dextrano) y micropartículas (Microesferas Fluoresbrite®) en la sangre, y translocación de microbios (*E. coli* TMW2.497) a hígado y bazo en los ratones IL-10 KO y WT. Extrusión de IEC incrementada correlacionada con permeación aumentada de dextrano (Figura 4a) y microesferas de 0,5  $\mu$ m (Figura 4b) en la sangre, y translocación de *E. coli* (Figura 4c) determinada por cultivos de tejido. Microscopía confocal de tejidos del íleo de ratones sometidos a sondaje gástrico con *E. coli* marcada con GFP reveló la presencia de bacterias cerca de las zonas de extrusión en el intestino de IL-10 KO (Figura 4d).

Para evaluar el efecto de la inhibición de la caspasa-1 sobre la extrusión de IEC con el tiempo *in vivo*, tratamos los ratones IL-10 KO con un inhibidor de caspasa-1 selectivo Ac-YVAD-CMK (10 mg/kg) durante 4, 7 y 10 días (5 veces la vida útil media de los enterocitos de roedor<sup>40</sup>) por inyecciones intraperitoneales. El grupo de IL-10 KO control recibió 10 días el mismo volumen de DMSO al 2 % (v/v). La reducción dependiente del tiempo en la extrusión de IEC medida por disminución en la densidad de hueco epitelial resultó (Figura 5a) en los ratones IL-10 KO tratados con YVAD. La reducción en la densidad de hueco estaba acompañada por la normalización de la permeación de microesferas de látex inerte de 0,5  $\mu$ m introducidas por sonda orogástrica en sangre el día 7 (Figura 5b).

El efecto de la activación de la caspasa-1 sobre la extrusión de IEC y la integridad epitelial se examinó con administración de pili tipo IV de *P. aeruginosa* - un activador de inflammasoma factor de activación de proteasa ICE (IPAF) que se podría dar oralmente para inducir la activación de la caspasa-1. Elegimos pili tipo IV de *P. aeruginosa* puesto que la nigericina se podía administrar oralmente y estaba asociada con toxicidad sistémica significativa. En ratones WT que se sometieron a sondaje orogástrico con pili tipo IV (0,33 mg/kg) durante un día, observamos una tendencia hacia la extrusión incrementada de IEC medida por densidad de hueco epitelial mayor en comparación con ratones control sometidos a sondaje gástrico con el mismo volumen de solución salina (Figura 5c).

### A3. La extrusión de IEC no apoptótica en el intestino humano es medida por la activación de caspasa-1

Para explorar si la activación de caspasa-1 de IEC representa o no un mecanismo fundamental de extrusión celular en seres humanos recogimos biopsias de mucosa y aspirados de lumen de íleo terminal de apariencia normal de pacientes con EII y control asintomático. Las muestras de la biopsia de mucosa se tiñeron con FLICA-1 y 3y7 para identificar IEC positivas para manchas de caspasa-1 (piroptótica) o caspasa-3y7 (apoptótica) activada (Figura 6a). La relación de células caspasa-1 y caspasa-3y7 positivamente teñidas en controles era de 1,16:1; lo cual se incrementó a 1,7:1. En los pacientes con EII (Figuras 6b). Para el análisis de aspirados de lumen, los pacientes control tenían material insuficiente para la preparación del bloque de citología. En los pacientes con EII, el número total de células nucleadas vistas sobre los bloques de citología oscilaban de 12 a 155 células, con recuento de IEC entre 41 y 100 % de las células (Figura 6c). Cuantificamos el número total de células extruidas en los aspirados de lumen recogidos sobre el filtro se observaron recuentos celulares significativamente mayores en aspirados de lumen de pacientes con EII en comparación con los controles (Figura 6d). Las células extruidas y los restos celulares se tiñeron con FLICA para caspasa-1 y caspasa-3y7 activadas. Las imágenes de los aspirados de lumen teñidos con FLICA se valoraron basándose en la intensidad de la tinción con caspasa de las células y los restos celulares presentes en las dos membranas, similares a una escala de clasificación usada para las muestras histológicas. A cada imagen se asignó un valor de 0 a 4 dependiendo de la intensidad del colorante y el número de células teñidas o restos celulares. Usando este sistema de valoración, la relación de células caspasa-1 y caspasa-3y7 positivamente teñidas en los controles era aproximadamente 1:1, lo cual se incrementó a 2:1 en los pacientes con EII (Figura 6e).

La expresión de IL-1 $\beta$  activa en muestras de biopsia de mucosa se midió con ELISA y era significativamente mayor en pacientes con EII (Figura 7a). La expresión incrementada de caspasa-1 y IL-1 $\beta$  activas en muestras de biopsia de mucosa se confirmaron con análisis por transferencia Western (Figuras 7b y c). Tomándolo juntos, estos resultados sugieren que la activación de la caspasa-1 representa un mecanismo significativo de extrusión de IEC en intestino humano sano y parece ser responsable de la mayoría del incremento en la extrusión celular observada en los pacientes con EII. En este estudio, describimos una forma inflamatoria de extrusión de IEC mediada por activación de caspasa-1 que conduce a brechas en el epitelio *in vitro* e *in vivo*. Esta forma de extrusión de IEC permitió movimiento de micropartículas y microbios a través de las monocapas polarizadas. La extrusión de IEC en el intestino de roedor se podía modular mediante la activación o inhibición de la enzima caspasa-1. La extrusión incrementada de IEC en los ratones IL-10 KO estaba asociada a la permeación incrementada de macromoléculas (dextrano), micropartículas y translocación de bacterias comensales. La modulación de la actividad de la caspasa-1 *in vivo* dio como resultado alteraciones en la extrusión de IEC con cambios acompañantes en la integridad epitelial medida por permeación de microesferas de látex inertes. En los pacientes, la separación de IEC mediada por caspasa-1 se podía observar en el intestino delgado de pacientes sanos y con EII, con incremento pronunciado en pacientes con EII. Nuestros resultados experimentales proporcionan nuevas perfecciones fundamentales en el mecanismo subyacente de la extrusión de IEC previamente notificado que compromete la integridad epitelial.<sup>7</sup>

Coherentes con el análisis morfológico previo de aspirados duodenales que muestran células extruidas con características de piroptosis y apoptosis, nuestros estudios de aspirado de lumen revelaron activación de tanto caspasa-1 como caspasa-3y7 en células extruidas. Nuestros resultados del análisis de la biopsia de mucosa están de acuerdo con un estudio anterior en el que la apoptosis se encontró en el 44 % de las IEC separadas usando tinción de caspasa-3 activada de los especímenes intestinales humanos. En este estudio, observamos activación de caspasa-3y7 en el 46 % de las IEC a extruir.

Nuestros resultados de análisis de células extruidas y muestras de biopsia del paciente son complementarios y coherentes, y están de acuerdo con estudios previos de IEC extruidas. El análisis de aspirados de lumen puede estar limitado por el hecho de que las IEC extruidas se pueden romper en fragmentos después de la separación, por lo tanto, los resultados del análisis de la biopsia de mucosa eran esenciales para confirmar la relación relativa de células caspasa-1 y 3y7 positivas. Puesto que las zonas de extrusión celular mediada por caspasa-1 pueden ser permeables a microbios, su aumento drástico en pacientes con EII puede contribuir a la carga bacteriana incrementada intramucosa y asociada a nudo linfático observada en estudios previos. En el presente estudio no se examinó la función de la barrera en los pacientes. Puesto que los defectos epiteliales parecen permitir la entrada de micropartículas y microbios, el ensayo apropiado en los pacientes para examinar la integridad epitelial requirió estudios de validación rigurosos. Además, no hemos investigado el mecanismo de cierre o curación de la zona de extrusión después de la separación celular mediada por caspasa-1, lo cual es crítico para definir la pérdida de integridad epitelial observada. En extrusión celular inducida por apoptosis, la contracción de células circundantes y la reorganización de las uniones fuertes se requieren para prevenir la pérdida de función de la barrera. Estudios futuros para definir los sucesos bioquímicos del proceso de separación celular en piroptosis facilitarán nuestro

entendimiento del papel de las modificaciones de la unión fuerte, proteínas contráctiles implicadas en la extrusión, y el(los) mecanismo(s) de cierre en esta forma de extrusión celular. Se puede necesitar un entendimiento básico del mecanismo de cierre después de la extrusión celular mediada por caspasa-1 para facilitar el desarrollo de un ensayo apropiado para valorar la integridad epitelial en pacientes.

La apariencia morfológica de las células extruidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) es coherente con informes previos de células piroptóticas (Figura 1c), y fija la descripción de la forma de extrusión de IEC asociada a la integridad epitelial comprometida en seres humanos. Los resultados del estudio por RET sugieren que las brechas en el revestimiento epitelial inducidas por esta forma de extrusión celular son dependientes de la caspasa-1. Nuestros datos además sugieren que las zonas de extrusión celular resultantes de la activación de la caspasa-1 pueden proporcionar sitios de entrada para microbios y antígenos del lumen. Se observaron espacios intracelulares como sitios de entrada microbiana en epitelios que se sometieron a estrés metabólico y en un sistema de co-cultivo de 3 dimensiones de enterocitos, monocitos y células dendríticas. En este punto, observamos el desarrollo de defectos de barrera similares en el epitelio con activación de inflammasoma/caspasa-1 en IEC solas.

En modelos de roedores, la modulación de la actividad de la caspasa-1 alteró la extrusión de IEC con cambios asociados en la integridad del revestimiento epitelial. En comparación con la extrusión celular mediada por apoptosis en la que se conserva la función de barrera del epitelio, encontramos que la piroptosis mediada por extrusión de IEC introdujo brechas en el epitelio que favoreció la entrada microbiana y de micropartículas en la mucosa. La inducción de piroptosis con tratamiento durante la noche de pili tipo IV de *P. aeruginosa* dio como resultado mayor extrusión de IEC con incremento acompañante en la permeación de microesferas en los ratones WT. A la inversa, la inhibición de la actividad de la caspasa-1 en los ratones IL-10 KO dio como resultado una reducción dependiente del tiempo en la extrusión de IEC medida por densidad de hueco epitelial. Basándose en estas observaciones, estimamos que el tiempo para alcanzar la actividad farmacológica de estado estable (5 veces la semivida) para colitis sería aproximadamente 35 días para los ratones IL-10 KO. Por lo tanto, elegimos el uso de permeación de microesferas de látex introducidas por sondaje orogástrico - una valoración de la integridad epitelial como un criterio de valoración subrogado para estudiar el efecto fisiológico de la extrusión celular reducida, en lugar del criterio de valoración clínico habitual - mejoramiento en la valoración de colitis. En nuestro estudio, la normalización de la permeación de microesferas introducidas por sondaje gástrico se alcanzó después de 7 días de tratamiento.

En dirección 5' a IL-1 $\beta$ , se expresa Nlrp3 en tanto células inmunes como epiteliales, y parece jugar un importante papel en la homeostasis intestinal. Los ratones Nlrp3<sup>-/-</sup> eran más susceptibles a colitis experimental inducida por DSS, sulfonato de 2,4,6-trinitrobenzoceno (TNBS), o infección de *Citrobacter rodentium*. Coherentes con estudios previos, nuestros resultados indican que la extrusión de IEC inducida por la activación de la caspasa-1, mediada o bien por Nlrp3 u otras rutas puede ser vital para la homeostasis intestinal en la salud. Se ha demostrado que la producción de IL-1 $\beta$  e IL-18 resultante de la activación de caspasa-1 contribuye a la inflamación intestinal en algunos informes, mientras que estudios recientes sugieren que caspasa-1 confirió protección frente a colitis y cáncer asociado a colitis. Las discrepancias en los resultados experimentales pueden deberse en parte a las diferencias en el trasfondo genético, género de los animales usados, o variancias en la flora microbiana de las instalaciones animales.

En resumen, los resultados de nuestro estudio indican que la activación de la caspasa-1 de las IEC puede inducir extrusión celular que contribuye al desarrollo de disfunción de la barrera en el epitelio intestinal, lo cual puede favorecer la entrada microbiana en la mucosa. Esta forma de extrusión celular parece ser el mecanismo responsable para sucesos de separación previamente observados para introducir brechas en el revestimiento epitelial.

#### A4. Niveles de caspasa-1 elevados en OEC y BEC son diagnósticos de la enfermedad de Crohn

Para determinar si la activación de la caspasa-1 de OEC es diagnóstico o no de la enfermedad de Crohn, obtuvimos biopsias dentales de la región orofaríngea de individuos con enfermedad de Crohn y normales, usando procedimiento normalizado. Las células epiteliales biopsiadas se tiñeron *in vitro* con marcador de caspasa-1, como anteriormente, y se examinaron por microscopía de fluorescencia para determinar los niveles de caspasa-1. Como se ve a partir de la gráfica de barras en la Figura 11, los niveles de caspasa-1 en los pacientes de Crohn se elevaron aproximadamente dos veces por encima de los niveles normales.

Los datos demuestran que la valoración de los niveles de caspasa-1 en seres humanos, por detección *in vitro* de OEC teñidas proporciona un método simple de detección de la enfermedad de Crohn. El método de diagnóstico que implica OEC se puede realizar con BEC, por ejemplo, obtenidas por un hisopado suave de la mejilla, y también es aplicable a otras afecciones de EII e SII, y se puede llevar a cabo por tinción *in vivo* de OEC o BEC, seguido de la detección *in situ*, por ejemplo, usando una herramienta fluoroscópica para determinar los niveles de fluorescencia de célula teñida en la cavidad oral.

#### B. Método de detección de la disfunción de la barrera celular por pCLE

Se reclutaron un total de 35 pacientes (17 con SII y 18 controles) dentro del estudio, un paciente que se pensaba que tenía SII se excluyó de análisis adicional debido a la presencia de colitis microscópica en las biopsias de colon.

Las características del paciente iniciales se muestran en la Tabla 1. La edad media para los 16 pacientes con SII era de 42,8 + 18,5 años. Había 7 pacientes femeninos y 9 masculinos. Los pacientes control (n=18) tenían una edad media de 47,4 ± 10,1 años, con 10 pacientes femeninos y 8 masculinos. Las indicaciones para la colonoscopia en los controles eran de cribado de cáncer colorrectal (n=9) y prueba de sangrado rectal o de sangre oculta fecal positiva (n=9). El grupo con SII incluía 12 pacientes con SII con diarrea predominante y 4 con SII con estreñimiento predominante. Para la evaluación de otras causas de sus síntomas, realizamos historial detallado de todos los pacientes para excluir intolerancia a la lactosa/fructosa. Todos excepto uno de los pacientes con SII con diarrea predominante tenían anticuerpos en el suero (anticuerpo anti-tTG o antiendomisial) o EGD con biopsia para descartar la celiaquía. El único paciente que no tuvo estudio de serología o EGD estaba en un grupo de bajo riesgo para celiaquía. Todos excepto dos pacientes tenían TSH en suero comprobado para descartar la disfunción tiroidea como una causa de sus síntomas. La colonoscopia normal era el resultado endoscópico más común en pacientes tanto con SII como control. Otros resultados eran pólipos (n=8), diverticulosis (n=4) y hemorroides (n=8). Las biopsias aleatorias del íleo terminal y el colon realizadas en todos los pacientes con SII y controles estaban dentro de los límites normales. Las imágenes de pCLE representativas de los pacientes control y con SII con las tres vistas consecutivas usadas en el recuento se muestran en la Figura 2.

Los pacientes con SII tenían densidades de hueso significativamente mayores en comparación con los controles (Figura 3): la densidad de hueso media de los pacientes con SII era de 32 (17 a 42) huecos/1.000 células frente a 6 (0 a 13) huecos/1.000 células para los controles (p<0,001). Puesto que los valores de densidad de hueso no estaban normalmente distribuidos (p=0,005, prueba de Shapiro-Wilk), usamos el análisis de regresión media para cuantificar las diferencias entre grupos. La diferencia media estimada en la densidad de hueso entre SII y controles era de 26 (IC al 95 %: 12, 39) huecos/1.000 células. Controlando la edad y el género, los valores de densidad de hueso media se mantuvieron significativamente mayor en el grupo de SII en relación con el grupo control (p<0,001), con una diferencia media estimada de 25 (IC al 95 %: 18, 32) huecos/1.000 células.

Examinamos las relaciones de la densidad de hueso epitelial con respecto al género, la edad y los subtipos de SII. En los pacientes control, notamos una tendencia hacia la correlación negativa entre la densidad de hueso epitelial y la edad, con un coeficiente de correlación de Spearman (rho) de -0,43 (p=0,07). Además, encontramos una tendencia hacia una mayor densidad de hueso media en mujeres en comparación con hombres (11 frente a 0 huecos/1.000 células, p=0,07). En los pacientes con SII, no se observaron estas tendencias. Con respecto a los subtipos de SII, los pacientes con SII con diarrea predominante (n=12) tenían una densidad de hueso media similar en comparación con los pacientes con SII con estreñimiento predominante (n=4): 32 frente a 38 huecos/1.000 células, respectivamente.

El 90º percentil estimado de los valores de densidad de hueso del grupo control sano era de 30 huecos/1.000 células. Usando 30 huecos/1.000 células como el límite de corte para una densidad de hueso normal, la sensibilidad de diagnóstico de la densidad de hueso para SII es del 62 %, la especificidad es del 89 %, con un valor predictivo positivo del 83 %, y un valor predictivo negativo del 73 %. La precisión de diagnóstico de la densidad de hueso para SII se muestra en la Tabla 2.

En este estudio, encontramos que los pacientes con SII tenían densidad significativamente mayor de huesos epiteliales en el íleo terminal medida por pCLE en comparación con los controles sanos. Este descubrimiento sugiere que los huesos epiteliales elevados en el intestino de pacientes con SII, un marcador subrogado para la extrusión celular epitelial incrementada en el intestino delgado, puede contribuir a disfunción de la barrera e inflamación de mucosa a bajo grado previamente notificado en SII. Aunque nuestros resultados se basan en un número pequeño de pacientes, proporciona potenciales nuevas perspectivas mecánicas dentro de la patogénesis de la enfermedad.

Hay evidencia creciente que indica que la permeabilidad intestinal incrementada en SII está asociada con alteraciones en las uniones fuertes epiteliales y los cambios en los perfiles de la citoquina. La expresión alterada y la distribución celular de las proteínas de la unión fuerte, incluyendo claudina-1 y ocludina se han notificado en pacientes SII. Los cambios en los perfiles de la citoquina además soportan la idea de permeabilidad intestinal aumentada en pacientes con SII. Los descubrimientos de nuestro estudio indican que la extrusión celular epitelial incrementada puede ser un mecanismo potencial para la disfunción de la barrera y la inflamación mucosa observada en los pacientes con SII.

En nuestro análisis secundario, encontramos que los pacientes control femeninos tenían una tendencia hacia una densidad de hueso mayor que los masculinos. Este descubrimiento puede proporcionar una explicación potencial para el mayor predominio de SII en mujeres. Con huesos epiteliales mayores en el inicio, las mujeres son más susceptibles del desarrollo de la enfermedad. Además, observamos una tendencia en los controles sanos de una correlación negativa de la densidad de hueso con la edad, lo cual se ha notificado previamente. Estos descubrimientos se deberían investigar más en estudios mayores. No observamos una diferencia en la densidad de hueso epitelial entre SII con diarrea predominante o estreñimiento predominante. Sin embargo, solamente había cuatro pacientes con SII con estreñimiento predominante incluidos en este estudio. Cambios significativos en la permeabilidad intestinal de pacientes con SII con diarrea predominante se han notificado previamente, y no en pacientes con SII con estreñimiento predominante.

Hasta la fecha, no hay descubrimientos endoscópicos específicos que puedan discriminar pacientes con SII de sanos. Actualmente, hasta el 50 % de los pacientes con SII se someten a colonoscopia durante su valoración, con el 25 % de colonoscopias realizadas en los Estados Unidos para síntomas relacionados con SII. La mayoría de las colonoscopias se realizan para descartar otras etiologías de diarrea, tales como colitis microscópicas. En nuestro estudio, usando pCLE durante colonoscopia rutinaria para localizar y cuantificar huecos epiteliales en el intestino delgado de pacientes con SII y controles sanos, fuimos capaces de demostrar que los pacientes con SII tienen una densidad significativamente mayor de huecos epiteliales. Nuestros descubrimientos de huecos epiteliales incrementados en el intestino delgado no solamente proporcionan un mecanismo potencial de patogénesis de SII, sino también unos posibles criterios endoscópicos para el diagnóstico de la enfermedad. En este estudio, una densidad de hueco elevada tenía una sensibilidad del 62 % y especificidad del 89 % para el diagnóstico de SII. A nuestro entender del desarrollo de la patogénesis de SII, pCLE puede ser otra prueba de diagnóstico que puede además definir este grupo complejo de enfermedades. Aunque la densidad de hueco es significativamente mayor en pacientes con SII en comparación con los controles en nuestro presente estudio, el incremento en la densidad de hueco es mucho más baja en comparación con los pacientes con EII en nuestro informe previo. Una comparación de las densidades de hueco en los pacientes control, con SII y EII se muestra en la Figura 1 complementaria.

Hay un número de limitaciones a nuestro estudio. Esto es un estudio pequeño de 34 pacientes en un único centro de derivación terciaria con experiencia en endomicroscopía láser confocal y en la cuantificación de huecos epiteliales. Los pacientes con SII en nuestro estudio representan un grupo heterogéneo de pacientes. No restringimos lo sujetos de estudio a pacientes con SII con diarrea predominante o estreñimiento predominante. El objetivo del estudio era identificar cualquier diferencia en la densidad de hueco entre pacientes con SII y control. Podía haber errores en la cuantificación de los huecos epiteliales y células usando las imágenes de pCLE. Sin embargo, puesto que los revisores desconocían las indicaciones para los procedimientos, estos errores se deberían distribuir igualmente entre los pacientes con SII y control. Se necesitan futuros grandes estudios con múltiples centros para confirmar los descubrimientos preliminares de nuestro presente estudio. En este estudio, solamente tomamos la imagen del intestino delgado con pCLE para cuantificar la densidad de hueco epitelial. Previamente hemos realizado un estudio de validación que caracteriza la variabilidad interobservador e intraobservador de la densidad de hueco epitelial del íleo terminal usando modelos de roedor. No somos conscientes de tales estudios de validación para la toma de imagen por CLE del colon.

En conclusión, hemos demostrado que la densidad de hueco epitelial del íleo terminal, determinada por pCLE durante la colonoscopia, es significativamente mayor en pacientes con SII que los controles sanos. Este descubrimiento sugiere que la extrusión celular epitelial incrementada, medida por la densidad de hueco epitelial, puede representar un mecanismo potencial para la permeabilidad intestinal alterada observada en pacientes con SII.

#### C1. Experimental: Métodos de caspasa-1

##### **Ratones**

Se usaron ratones IL-10 KO (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine) y los ratones 129/SvEv antecedentes (Taconic Farms Inc. Cambridge City, Indiana) alimentados en nuestras instalaciones para animales durante al menos 10 generaciones entre 24 a 28 semanas de vida para todos los experimentos. Los ratones se alojaron en instalación de alojamiento convencional con ciclos de luz y oscuridad. El protocolo animal fue aprobado por el "Animal Care and Use Committee for Health Sciences" de la Universidad de Alberta.

##### **Muestras de paciente**

El protocolo de estudio fue revisado y aprobado por el "Human Ethics Research Review Board" de la Universidad de Alberta", y el estudio se registró en "ClinicalTrial.Gov" (NCT00988273). Los pacientes que se sometieron a colonoscopia proporcionaron un consentimiento informado por escrito para participar en el estudio. En los pacientes con EII (N=11, 6 con enfermedad de Crohn, 5 con colitis ulcerosa) y control asintomático (N=8) que se sometieron a colonoscopia, se recogieron aspirados de lumen del íleo terminal de apariencia normal después de lavado suave de la superficie intestinal con solución de NaCl al 0,9 % usando un método previamente descrito<sup>7</sup> y se analizaron inmediatamente (<15 minutos). Los bloques de citología se prepararon a partir de 25 ml de aspirados de lumen recogidos después del lavado de solución salina, y se tiñeron con hematoxilina y eosina para la identificación morfológica de células epiteliales o inmunes. Para teñir con FLICA, las células de 5 ml de fluido aspirado se inmovilizaron sobre una membrana Membra-fil Nucleopore de policarbonato con tamaño de poro 5,0 µm (Whatman, GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ) usando filtración al vacío y se lavó mediante la filtración de unos 20 ml adicionales de PBS (pH 7,4) que contenían 0,5 % (p/v) de BSA. Inhibidores irreversibles dirigidos a sitios activos fluorescentes específicos de caspasa-1 y caspasa-3y7 activadas (Kit de Detección de Apoptosis por Carboxyfluorescein FLICA; Immunochemistry Technologies LLC, Bloomington, MN) se usaron para teñir las células aspiradas directamente sobre la membrana Nucleopore. La membrana con células aspiradas inmovilizadas se cortó por la mitad y se tiñó con dilución 1:700 de colorante FAM-YVAD-FMK(FLICA-1) para detectar caspasa-1 activada o colorante FAM-DEVD-FMK (FLICA 3y7) para detectar caspasa 3y7 activada. Se obtuvieron cuatro muestras de biopsia de mucosa de íleo terminal de apariencia normal para el análisis (control N=3, EII N=3), se colocaron dos muestras de biopsia en nitrógeno líquido, y se almacenaron a -80 °C hasta su uso para los ensayos de citoquinas.



Se embebieron dos muestras de biopsia en OCT (Tissue-Tek, Torrence, CA), se colocaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta que se prepararon las secciones.

## Reactivos

5 Se adquirieron Nigericina (Invitrogen, Burlington, ON), Ac-YVAD-CMK (Alexis Biochemicasl, Farmingdale, NY), diámetros variantes (0,5 a 6 µm) de Microesferas de Carboxilato Fluoresbrite™ Yellow Green (Polysciences Inc, Warrington, PA). Se prepararon pili tipo IV de cepa K de *Pseudomonas aeruginosa* con un método previamente descrito, caracterizados en términos de pureza por SDS-PAGE, capacidad de unirse a asialo-GM1 pero no a GM1, y capacidad de unirse a acero inoxidable. La preparación de pili contenía baja cantidades de serotipo 05 LPS de *P. aeruginosa* que no era detectable en geles de SDS-PAGE tenidos con plata. *Escherichia coli* TMW2.497 era un derivado de *E. coli* JM109 que llevaba el gen que codifica la proteína verde fluorescente (GFP) en el plásmido pQBI-63 y fue cortesía del Dr. M. Gantze.

## 15 Cultivo celular y medida de permeabilidad *in vitro*

Las células epiteliales cancerosas de colon humano T84 se mantuvieron en placas de cultivo de tejido (10 cm) en medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM)/F-12, suero bovino fetal (FBS) inactivado por calor al 10 % (v/v), penicilina-estreptomina al 1 % (p/v). Las células se sembraron en placa sobre Transwells (2x10<sup>5</sup> células/pocillo, 6,5 mm de diámetro; tamaño de poro 0,4 µm; Corning Life Sciences, Tewksbury, MA) y cultivadas hasta el desarrollo de complejos por unión apical (indicado por una resistencia transepitelial de >2.000 Ω cm<sup>2</sup>) para los estudios. Para el experimento de inhibición de caspasa-1, antes del tratamiento con nigericina, se sacó el medio de cultivo de tejido y se introdujo medio fresco con inhibidor de caspasa 50 µM (Ac-YVAD-CMK). Se añadió nigericina (10, 25, 50 µM) a tanto el aspecto apical como basolateral de Transwell. La resistencia transepitelial (TER) se midió antes y 3 h después del tratamiento con Nigericina, usando un Voltímetro Millicell-ERS y electrodos "chopstick" (Millipore, Bedford, MA). Para los experimentos de microesferas y *E. coli*, después de incubación durante la noche con nigericina, se añadieron 10<sup>7</sup>/ml de Microesferas de 1 µm o 10<sup>9</sup>/ml de *E. coli* TMW2.497 al aspecto apical de Transwell. Una hora después de la incubación con las microesferas o *E. coli*, las células se fijaron en metanol frío durante 5 minutos. A continuación, las células se permeabilizaron en Triton X-100 al 0,2 % (v/v) durante 15 min y se bloqueó durante una hora en PBS con suero de cabra al 0,2 % (v/v) y BSA al 1 % (p/v).

## Extracción de proteína

35 Las muestras de biopsia humana y tejidos del íleo de roedor se homogeneizaron en tampón de lisis (PBS 0,01 M, Tween 20 al 0,5 % (v/v), e inhibidor de proteasa Halt (que contiene dimetil sulfóxido y 4-(2-aminoetil)-bencenosulfonil fluoruro, Thermo Scientific, Pittsburgh, PA) sobre hielo para la extracción de proteína. El sobrenadante que contenía proteína se separó por centrifugación a 13.000 g durante 30 min a 4 °C y se almacenó a -70 °C hasta análisis.

## Ensayos de expresión de citoquina

40 Se midió la concentración de IL-1β activa de muestras humanas con el "Human IL-1β Ultra-Sensitive kit" (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). Se midió la expresión de IL-1β activa en tejido intestinal de ratón con el "Proinflammatory 7-Plex Ultra-Sensitive kit" de Ratón (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). Las citoquinas resultantes se normalizaron para el contenido de proteína total de cada muestra individual determinado por ensayo de ácido bicinónico (Pierce, Rockford, IL).

## Análisis por transferencia Western

50 Los tejidos de biopsia humana, raspados de mucosa de íleo de ratón y células T84 se sometieron a lisis en Reactivo de Extracción de Proteína de Mamífero M-PER (Thermo Scientific, Pittsburgh, PA) que contenía inhibidores de proteasa. Los lisados celulares totales (50 µg de proteína normalizada para las muestras) se cargaron en gel de SDS-PAGE al 15 % y se sometieron posteriormente a transferencia electroforética de proteínas a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con tampón de bloqueo ODYSSEY (Sistema de toma de imagen por infrarrojos, Marysville, OH) durante 1 hora a temperatura ambiente (TA) y se sondaron durante la noche a 4 °C con anticuerpo de IL-1β (Tecnología de señalización celular, Danvers, MA) o anticuerpo de caspasa-1 (Abcam, Cambridge, MA) con anticuerpo de β-actina que sirve como un control de carga (Tecnología de señalización celular, Danvers, MA). Después de lavar, las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios fluorescentes durante 1 hora a TA y se analizaron por el LI-COR Odyssey\* (Sistema de toma de imagen por infrarrojos, Marysville, OH).

## 60 Análisis por inmunofluorescencia del cultivo celular y las muestras intestinales

65 Las muestras del cultivo celular de los experimentos de activación de caspasa-1 y permeabilidad se fijaron en metanol frío durante 5 minutos, se incubaron con el anticuerpo anti-ZO-1 de conejo primario (Invitrogen, Burlington, ON) durante la noche a 4 °C. Después del lavado, las células se incubaron con o bien dilución 1:150 de colorante FLICA-1 para la activación de caspasa-1 o anticuerpo anti-IgG Alex546 de conejo de cabra (Invitrogen, Burlington, ON) y se sometieron a tinción de contraste con DAPI. A continuación, se escindieron las membranas que soportaban

las monocapas y se montaron sobre portaobjetos de vidrio (Medio de montaje DakoCytomation, Carpinteria, CA). Las muestras de biopsia humana congeladas se partieron en secciones de 5  $\mu\text{m}$ , se secaron al aire, y se fijaron con acetona antes de teñir con dilución 1:50 de FLICA-1 para caspasas-1 activadas, y dilución 1:50 de FLICA3y7 para caspasas-3y7 activadas (Immunochemistry Technologies LLC, Bloomington, MN). A continuación, las secciones se

5 fijaron posteriormente con paraformaldehído al 4 % durante 15 min a TA y se tiñeron con Rodamina-faloidina (Invitrogen, Burlington, ON) para la F-actina y DAPI para núcleos.

Los bloques de tejido congelado intestinal de roedor se partieron en secciones de 5  $\mu\text{m}$  usando criostato, se colocaron a TA durante 30 minutos, se fijaron en paraformaldehído al 4 % preparado de nuevo en PBS durante 30

10 minutos. Los portaobjetos se lavaron con PBS a 10 min, se bloquearon con suero de cabra al 2 % y BSA al 1% en PBS durante 1 hora a TA, se permeabilizaron en Triton-X100 al 0,2 % en suero de cabra al 2 % y BSA al 1 % en PBS durante 30 minutos. Los portaobjetos se tiñeron mediante incubación con faloidina acoplada a Alexa568 diluida 1:40 en PBS durante una hora, se separó el fluorocromo en exceso por 3x 15 min de aclarado con 50 ml de PBS, se sometieron a tinción de contraste con DAPI. Los portaobjetos se montaron para examen por microscopía usando

15 reactivo FluorSave (Calbiochem) como medio de montaje.

### Colorante de antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA)

Se tiñó tejido de íleo terminal de ratón con anticuerpo anti-PCNA de conejo (AbCam, Cambridge, MA) usando un

20 método previamente publicado. Después de teñir para PCNA, las secciones se tiñeron con DAPI y se tomó la imagen con microscopio invertido Zeiss (Zeiss, Toronto, Ontario). Se contaron las células PCNA positivas mediante dos revisores en un ensayo con ocultación (*blinded*) en un medio de 5 vellosidades por animal.

### Ensayos de permeabilidad *in vivo*

Se valoraron la permeabilidad *in vivo* con estudios de permeación de FITC-dextrano, microesferas fluorescentes y de translocación bacteriana. Para los estudios de dextrano, después de un ayuno durante la noche con libre acceso a agua, los ratones se sometieron a sondaje gástrico con 0,6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de FITC-dextrano (FD-4, 4 kD; Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Se recogieron muestras de sangre a las 4 horas después de la punción cardiaca, el suero se centrifugó

30 a 1.957 xg en 4 °C durante 20 minutos. La emisión de fluorescencia del sobrenadante se midió usando láser de 488 nm sobre el "Typhoon Variable Mode Imager" (GE Healthcare, Piscataway, NJ).

Para los estudios de microesferas, los ratones se sometieron a sondaje gástrico con una mezcla que contenía  $10^7$  Microesferas Fluoresbrite® YG con diámetro de 0,5, 1,0, 2,0, 3,0 y 6,0  $\mu\text{m}$  en 200  $\mu\text{l}$  de solución como se describió

35 previamente después de un ayuno durante la noche. Las muestras de sangre se recogieron 4 horas después de la administración de las perlas. La mezcla de sangre entera, a continuación, se centrifugó a 1.250 xg en tubos preheparinizados durante 10 min a TA, la parte de plasma de las muestras se separó y se centrifugó a 1.250 xg durante 5 min antes del análisis por citometría de flujo. La capa leuco-plaquetaria restante y el hematocrito de las muestras se sometieron a lisis con 5 ml de tampón de lisis (4,15 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,84 g de  $\text{NaHCO}_3$ , 1 ml de EDTA 0,5 mM a pH 8, y 500 ml de  $\text{ddH}_2\text{O}$ ) a TA, se mezclaron y se centrifugaron a 1.250 xg durante 5 min a 4 °C x 3. Se descargó el sobrenadante. El sedimento de GB se resuspendió en 400  $\mu\text{l}$  de PBS al 0,03 % con Albúmina Bovina Fetal. Las muestras de plasma y sedimento de GB se analizaron con citometría de flujo para la determinación de los recuentos de microesfera.

Para los estudios de translocación bacteriana, los ratones se sometieron a sondaje gástrico con  $1 \times 10^{10}$  UFC de *E. coli* marcada con GFP suspendidas en 0,17 ml de caldo LB. Después de 20 horas, se recogieron muestras de bazo e hígado bajo condiciones de cirugía estériles. Los órganos se suspendieron en tubos pesados previamente con caldo LB, se homogeneizaron con manos de mortero de plástico libres de ARNasa estériles durante 5 a 10 minutos. Se centrifugó el homogeneizado, y el sobrenadante se sembró en placas sobre cuatro placas a diluciones variantes

50 para el cultivo.

### Endomicroscopía láser confocal y microscopía confocal

La endomicroscopía láser confocal del íleo de ratón y la microscopía confocal de tejidos intestinales de ratón de

55 preparación completa para la determinación de la densidad de hueco epitelial se realizaron usando métodos previamente descritos. Se tomó la imagen de los portaobjetos de intestino humano y de ratón de cultivo celular usando un microscopio confocal de disco giratorio (Quorum Technologies Inc. Guelph, ON) usando métodos previamente descritos.

### Microscopía electrónica

Células T84 control y tratadas con nigericina se fijaron con glutaraldehído al 2 % (v/v) tamponado con cacodilato-HCl 0,1 M a pH 7,4 durante la noche 4 °C. Después de la fijación, se lavaron en tampón de cacodilato y se fijaron

65 posteriormente durante 2 h en tetróxido de osmio al 1 % (p/v), a continuación, se volvieron a lavar en tampón de cacodilato. Después de la deshidratación en una serie graduada de concentraciones de etanol, los especímenes se colocaron en varios lavados de óxido de propileno, y posteriormente se embebieron en resina Epoxi (EPON 12). Las

secciones ultrafinas se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo, y se examinaron con un microscopio electrónico de transmisión Hitashi 7650 a un voltaje de aceleración de 60 kV. Los campos de visión se grabaron y se imprimieron a aumentos finales entre 1.000 y 4.800, se calibraron con la ayuda de réplicas de rejilla de carbono.

## 5 **Análisis estático**

La prueba de suma de rangos de Wilcoxon computarizada por GraphPad (La Jolla, CA) Prism 4 se usó para comparar las muestras. Se consideraron que P-valores de dos lados de menos de 0,05 eran significativos. Se realizaron los ajustes de Bonferroni para comparaciones múltiples.

10

### C2. Experimental: Métodos de hueco de IEC

#### **Métodos**

15 Esto era un estudio de cohorte prospectivo registrado en "ClinicalTrial.Gov" (NCT00988273). El protocolo de estudio fue revisado y aprobado por el "Human Ethics Research Review Board" de la Universidad de Alberta. El grupo de estudio consistía en pacientes con síntomas coherentes con SII basándose en los criterios de Roma III. El grupo control consistía en pacientes que se someten a colonoscopia para otras indicaciones sin síntomas de SII, lo más comúnmente cribado de cáncer colorrectal y ensayo oculto fecal positivo. Los criterios de inclusión para el estudio eran: pacientes por encima de la edad de 18 años y capacidad de dar consentimiento informado por escrito. Los criterios de exclusión incluían: pacientes con alergias conocidas a fluoresceína o crustáceos, función renal alterada (creatinina en suero por encima de 1,5 mg/dl), y embarazadas o que estuvieran amamantando. Todos los pacientes dieron el consentimiento informado por escrito para participar en el estudio. Se registraron los resultados del examen demográfico, de historial, físico, y los resultados endoscópicos en una base de datos prospectiva.

25

Realizamos colonoscopia estándar con intubación del íleo terminal en todos los pacientes. Los pacientes tenían monitorización cardiopulmonar estándar y recibieron sedación intravenosa con midazolam y fentanilo. Un agente antiespasmódico (glucagón) se usó según era necesario para reducir la peristalsis y los artefactos de movimiento. Después de la intubación del íleo terminal, se administró 5 ml de solución de fluoresceína al 10 % intravenosamente.

30

Las imágenes confocales del íleo terminal se obtuvieron con sonda de endomicroscopía láser confocal basada en sonda (pCLE) de ultra alta definición (UHD Coloflex, Mauna Kea Technologies, París, Francia) seguido de un protocolo previamente publicado. Las imágenes confocales plano a plano del íleo terminal a aproximadamente 10 cm proximal a la válvula ileocecal se recogieron y se almacenaron digitalmente para el análisis. Se tomó la imagen de un mínimo de cinco sitios diferentes en el íleo terminal usando pCLE. La toma de imagen por pCLE normalmente se comenzó a 10 cm proximales de la válvula ileocecal, con posterior muestreo de los 5 a 10 sitios desde las superficies intestinales en entre 5 a 10 cm proximales al sitio inicial de la toma de imagen. Grabaciones continuas de los vídeos de imágenes de pCLE se realizaron durante aproximadamente 10 minutos en todos los pacientes, con más de 4.000 imágenes grabadas por paciente. Aunque el endoscopista que realizó la pCLE no desconocía al estado del paciente, los revisores de las imágenes de pCLE desconocían el estado del paciente y la indicación para la colonoscopia para minimizar el sesgo.

40

La revisión y el análisis de las imágenes de pCLE se llevaron a cabo de una manera a posteriori como se describió previamente. Vellosidad adecuadamente captada en imagen se define como la vellosidad con más del 75 % del área de superficie visualizada en las imágenes de pCLE, con un mínimo de tres visiones consecutivas de las vellosidades vistas se seleccionan por análisis de células epiteliales y huecos. De estas imágenes de vellosidades, se contaron la célula epitelial y los huecos en las vellosidades que tenían la mayor frecuencia de huecos vistos (intervalo: 3 a 100 vellosidades por paciente) para cualquier paciente individual. Una imagen representativa de una vellosidad contada se muestra en la Figura 1. Las células epiteliales y los huecos se contaron manualmente en vellosidades y se usó la mayor frecuencia de huecos epiteliales para cualquier paciente individual para determinar la densidad de hueco (intervalo: 3 a 10 vellosidades evaluadas por paciente). La densidad de hueco se calculó como el número de huecos epiteliales por 1.000 células epiteliales contadas en las vellosidades captadas en imagen adecuadamente.

45

50

El criterio de evaluación del estudio primario era la comparación de cohorte de las densidades de hueco epitelial determinadas por pCLE en los pacientes con SII y control. También realizamos análisis exploratorio para examinar las relaciones entre la densidad de hueco epitelial y el género, la edad, y los subtipos de SII (SII con diarrea predominante contra SII con estreñimiento predominante).

55

#### **Análisis estadístico**

##### 60 **Calculo de tamaño de muestra:**

El cálculo de tamaño de muestra se realizó basándose en los datos de densidad de hueco epitelial de pacientes asintomáticos y con SII de nuestro estudio previo<sup>24</sup>. Asumiendo una diferencia en la densidad de hueco media de 10 huecos/1.000 células y una desviación típica de 10 huecos/1.000 células, se requeriría un total de 32 pacientes (16 por grupo) para alcanzar el 80 % de poder estadístico con error tipo I ( $\alpha$ ) de 0,05. Puesto que se anticiparon métodos no paramétricos para ser empleados, la inscripción del paciente se incrementó por aproximadamente el 10 %, para

65

un total de 35 pacientes.

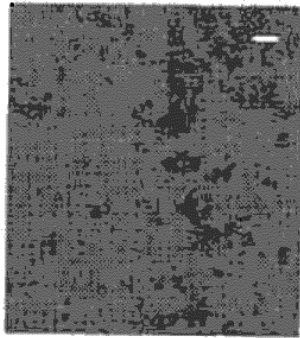
5 El criterio de valoración primario del estudio era la densidad de hueso epitelial, con la comparación entre pacientes control y con SII llevada a cabo usando la prueba de suma de rangos de Wilcoxon. Se expresaron variables continuas que estaban normalmente distribuidas como media  $\pm$  desviación típica, mientras que las variables continuas no distribuidas normalmente se expresaron como media (amplitud intercuartil). Se usó la prueba de Shapiro-Wilk para valorar la normalidad de la distribución de la densidad de hueso epitelial. Análisis adicionales emplearon métodos no paramétricos, incluyendo la prueba de suma de rangos de Wilcoxon, correlación de Spearman, y regresión media. Para el análisis primario, se consideraron que P-valores de dos lados de menos de 10 0,05 eran significativos. Todos los análisis se condujeron usando el análisis de datos STATA y el programa informático estadístico (StataCorp LP, College Station, Texas).

Aunque la invención se ha descrito con respecto a aspectos, realizaciones y aplicaciones específicas, se comprenderá que se pueden realizar diversos cambios y modificaciones sin desviarse de la invención reclamada. 15

**REIVINDICACIONES**

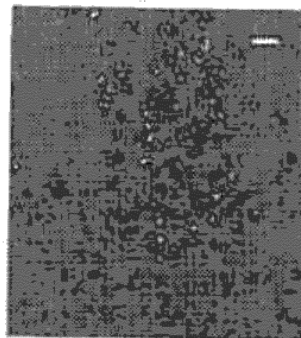
1. Un método *in vitro* para detectar el síndrome del intestino irritable (SII) o la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) en un paciente que comprende
- 5
- (a) teñir células epiteliales intestinales, orofaríngeas o bucales del paciente con una sonda que tiene un marcador detectable conjugado con un inhibidor de caspasa-1, en particular en el que el marcador detectable es fluorescente, y
- 10
- (b) examinar las células epiteliales intestinales, orofaríngeas o bucales teñidas, en particular por microscopía de fluorescencia, un lector de placa de fluorescencia o una citometría de flujo de fluorescencia, para la presencia de niveles elevados del marcador detectable, en relación con células epiteliales intestinales, orofaríngeas o bucales similarmente teñidas de un individuo normal, respectivamente, como evidencia de niveles por encima de lo normal de caspasa-1 asociada a las células epiteliales intestinales, orofaríngeas o bucales del paciente,
- 15
- (c) en el que los niveles elevados de caspasa-1 en las células epiteliales intestinales, orofaríngeas o bucales del paciente es un indicador de disfunción de la barrera celular asociada al síndrome del intestino irritable (SII) o la enfermedad inflamatoria de intestino (EII) en el paciente.
2. El método *in vitro* de la reivindicación 1, en el que dicha tinción se lleva a cabo sobre
- 20
- (i) células epiteliales intestinales del paciente obtenidas del paciente por biopsia o aspiración, o
  - (i) células epiteliales orofaríngeas obtenidas del paciente por una biopsia dental, o
  - (i) células epiteliales bucales obtenidas de un hisopado de mejilla del paciente.
3. El método *in vitro* de la reivindicación 1, en el que la sonda es un conjugado del tetrapéptido YVAD y un fluorocromo, en particular en el que la sonda tiene la estructura de Alexa Fluor 488-GGGG-YVAD-FMK.
- 25
4. El método *in vitro* de la reivindicación 1, que incluye además teñir las células epiteliales intestinales, orofaríngeas o bucales con una segunda sonda detectable específica para caspasa-3y7, y determinar la relación del marcador asociado con la caspasa-1 y el marcador asociado con la caspasa-3y7, en particular en el que la segunda sonda es un conjugado del inhibidor I de la Caspasa3/7 y un fluorocromo.
- 30
5. El método *in vitro* de la reivindicación 4, en el que la relación de marcadores de caspasa-1 y caspasa-3y7 es significativamente inferior, en particular al menos aproximadamente 40 % inferior, en sujetos sanos que en sujetos con SII o EII.
- 35
6. El método *in vitro* de la reivindicación 1, en el que un nivel elevado de caspasa-1 se usa como indicador para el tratamiento del paciente por un inhibidor de caspasa-1 o un agente antiinflamatorio.

FIGURA 1A-1



control

FIGURA 1A-2



Nigericina 50µM

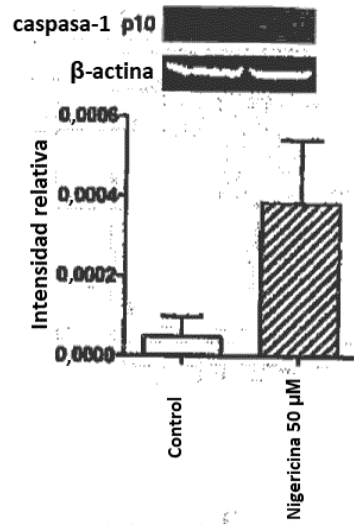
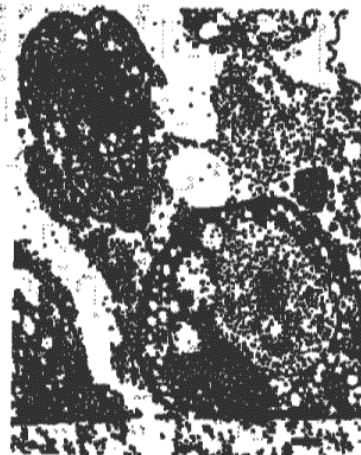


FIGURA 1B



Control

FIGURA 1C-1



Nigericina 50µM

FIGURA 1C-2

FIGURA 2A

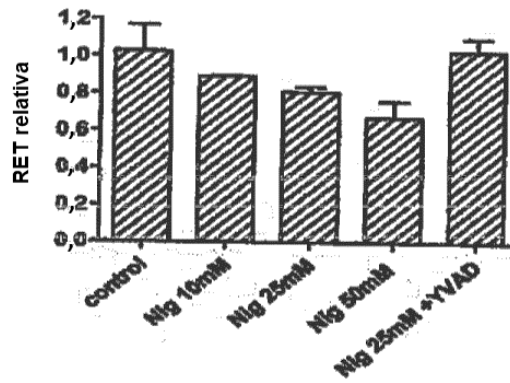
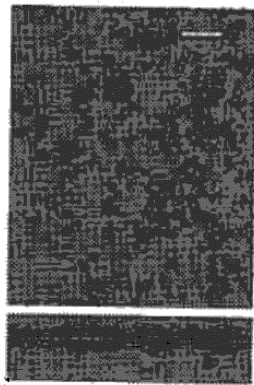
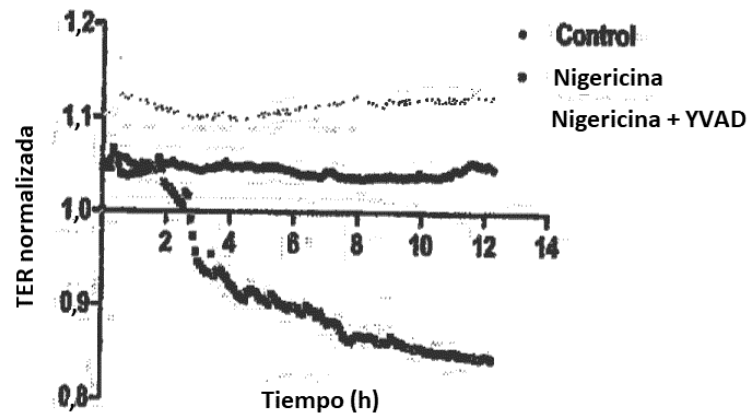


FIGURA 2B



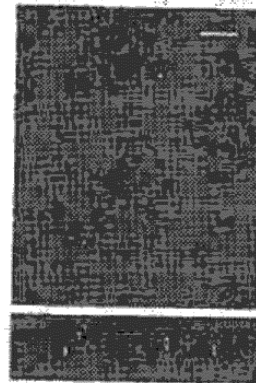
control

FIGURA 2C-1



Nigericina + *E.coli*

FIGURA 2C-2



Nigericina + microsferas

FIGURA 2C-3

FIGURA 3A

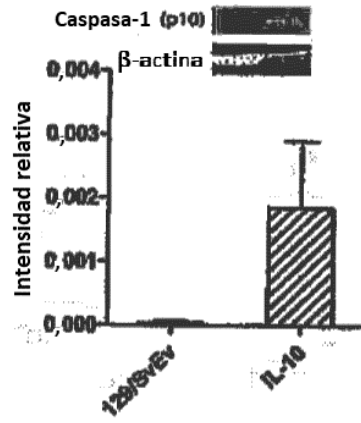


FIGURA 3B

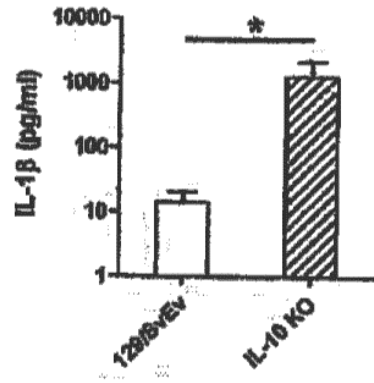


FIGURA 3C-1

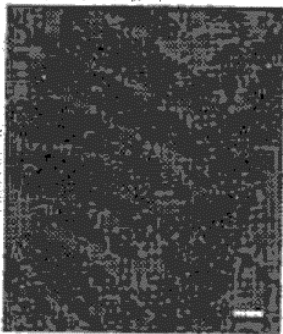
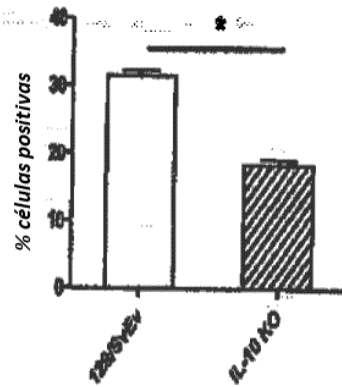


FIGURA 3C-2



IL-10 KO

FIGURA 3D





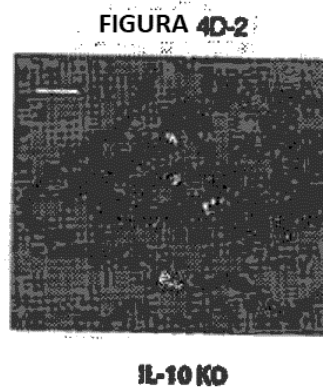
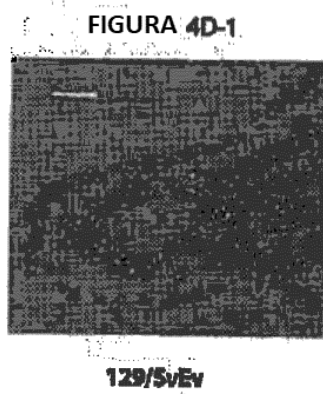
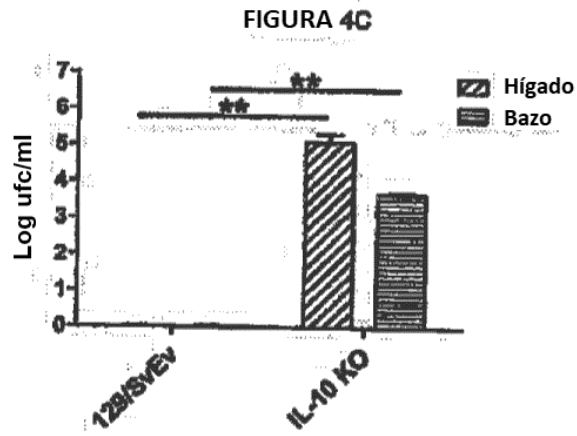
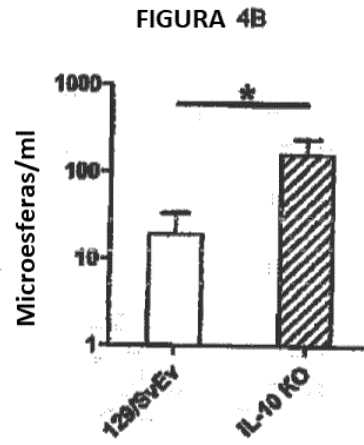
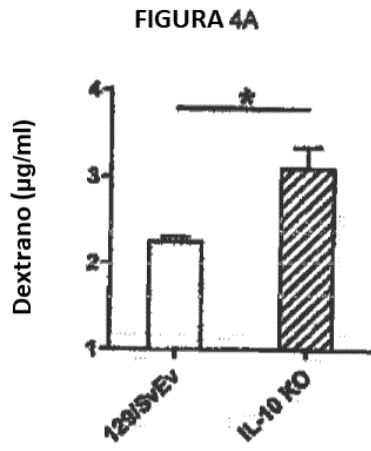


FIGURA 5A

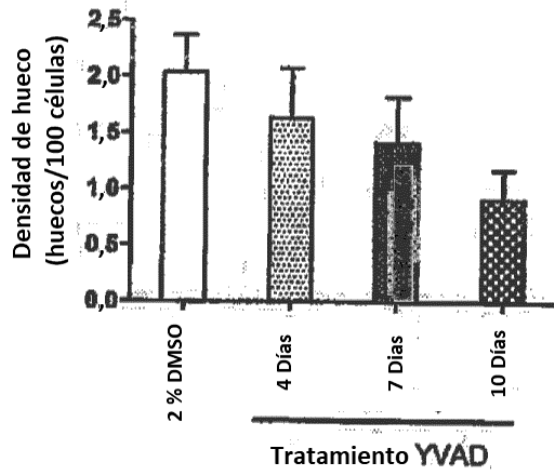


FIGURA 5B

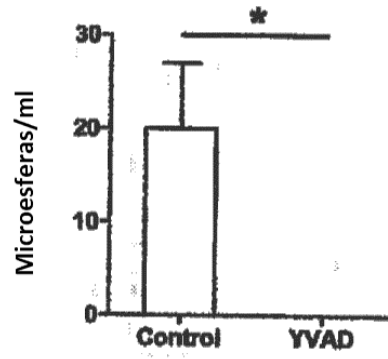


FIGURA 5C

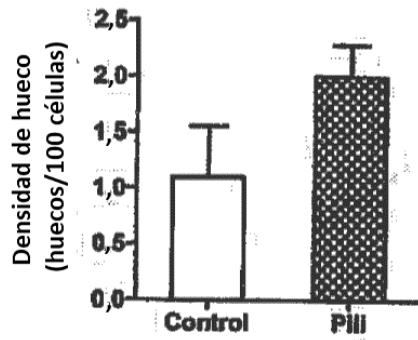
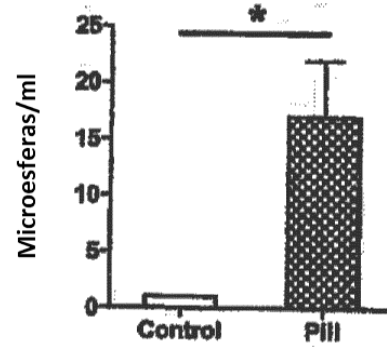


FIGURA 5D



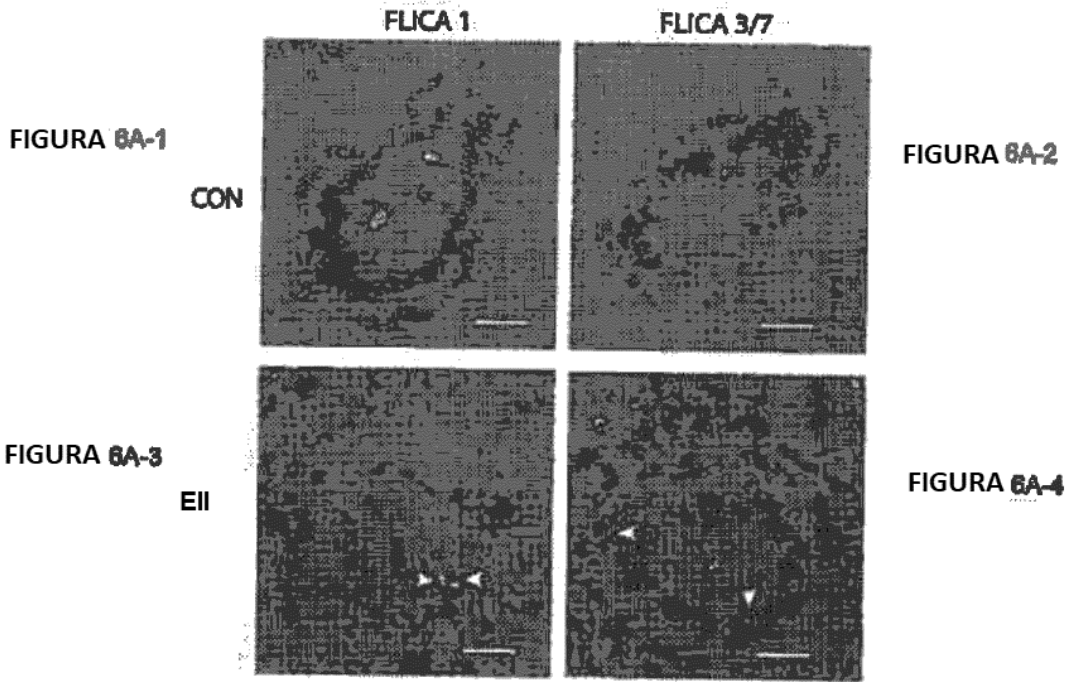


FIGURA 6B

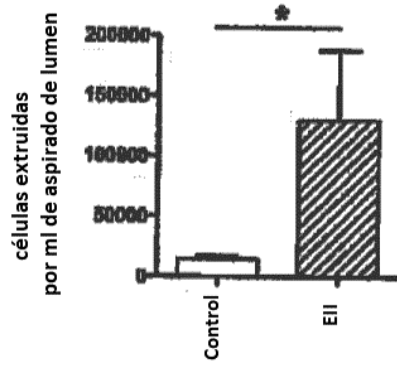
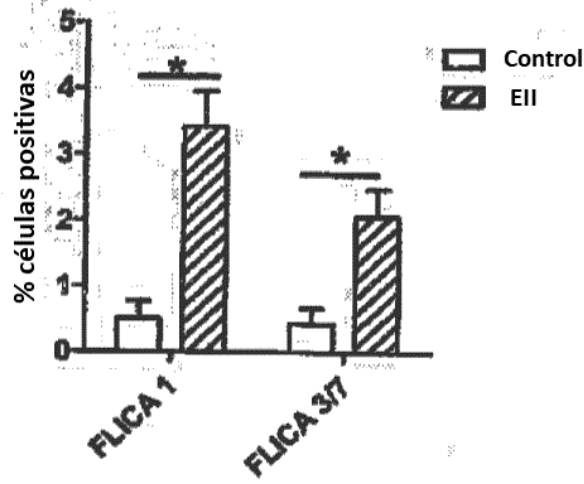


FIGURA 6C

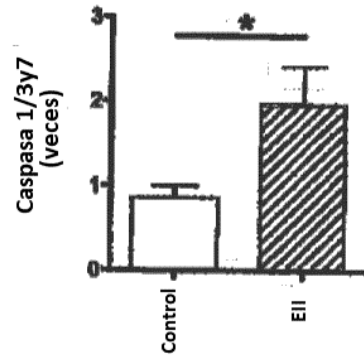


FIGURA 6D

FIGURA 7A

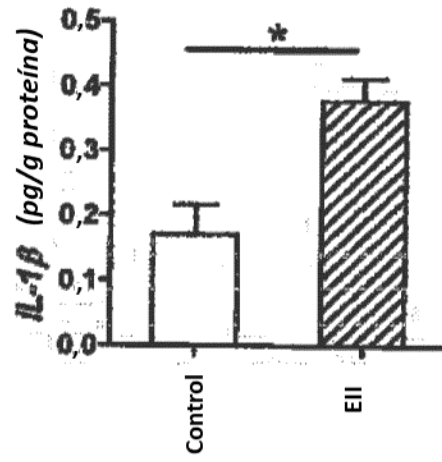


FIGURA 7B

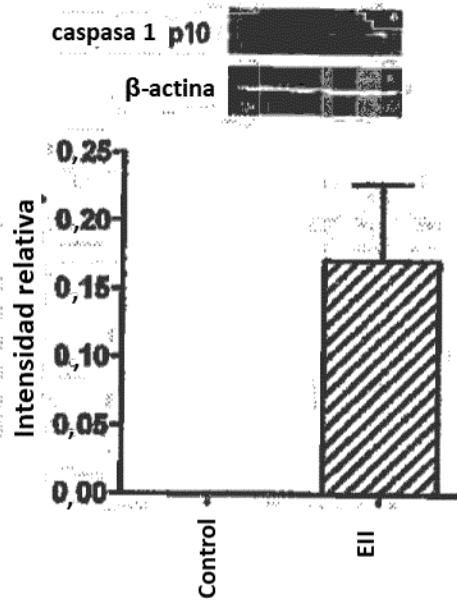
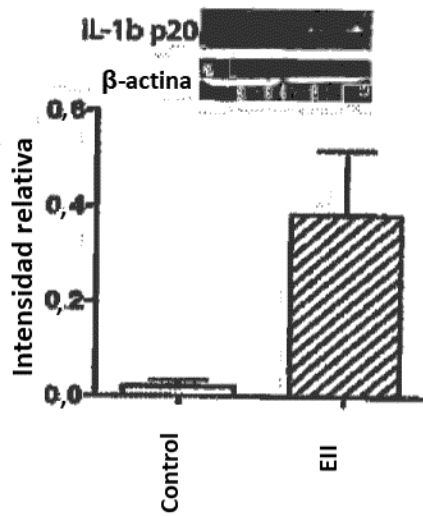


FIGURA 7C



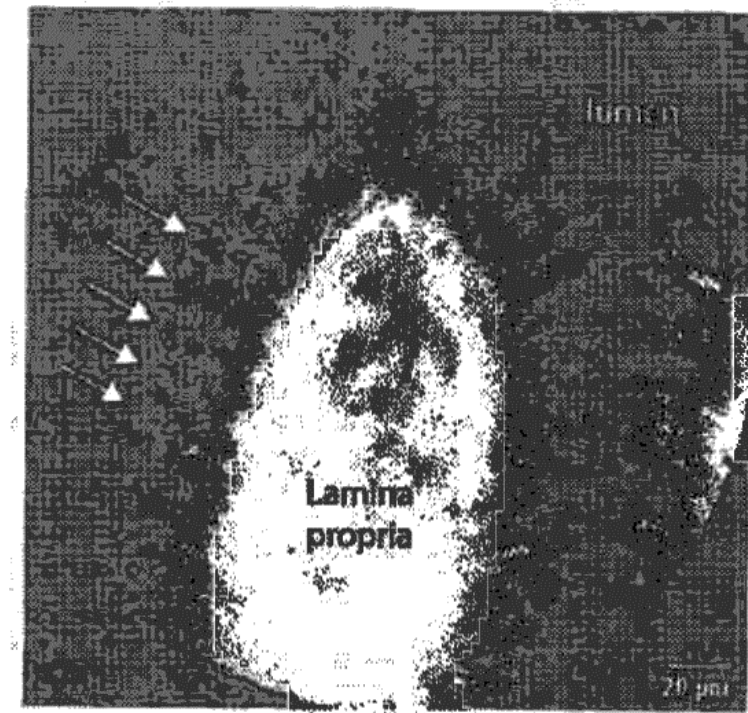


FIGURA 8

FIGURA 9A



FIGURA 9B

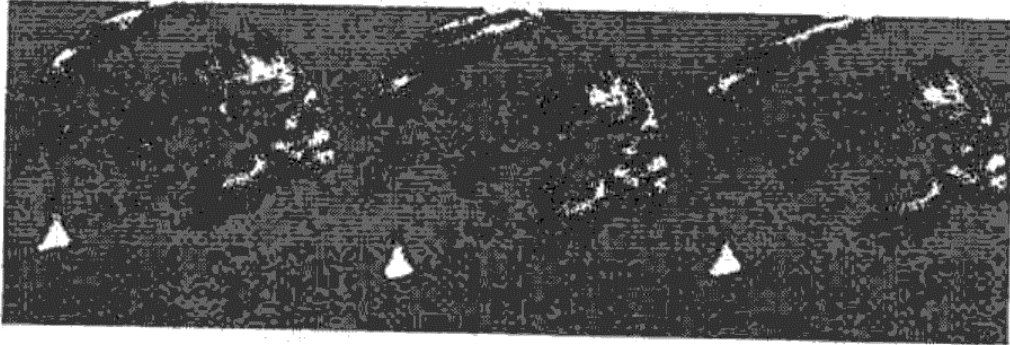
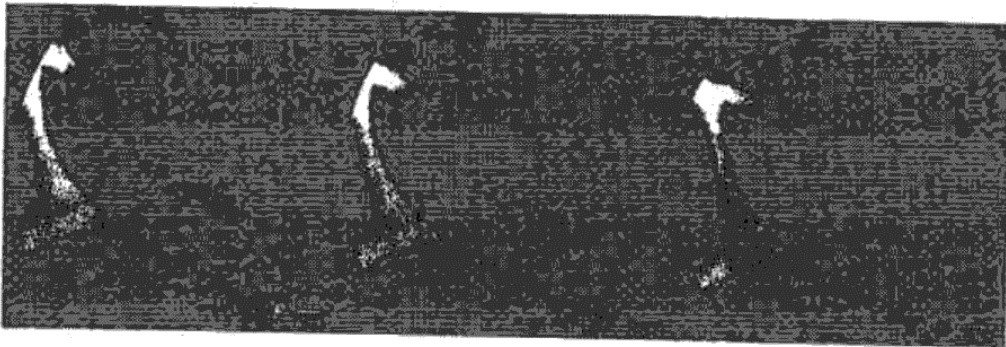


FIGURA 9C



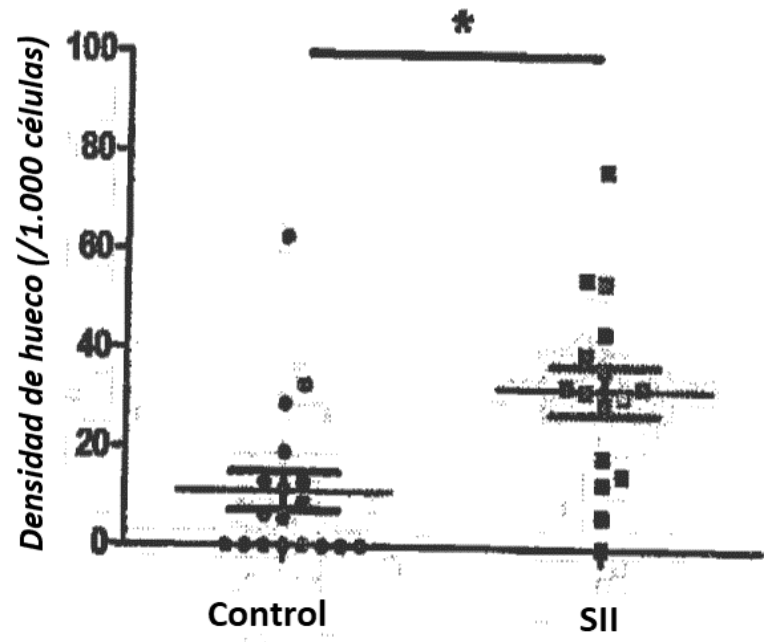


FIGURA 10

Expresión de caspasa-1 por análisis por transferencia Western

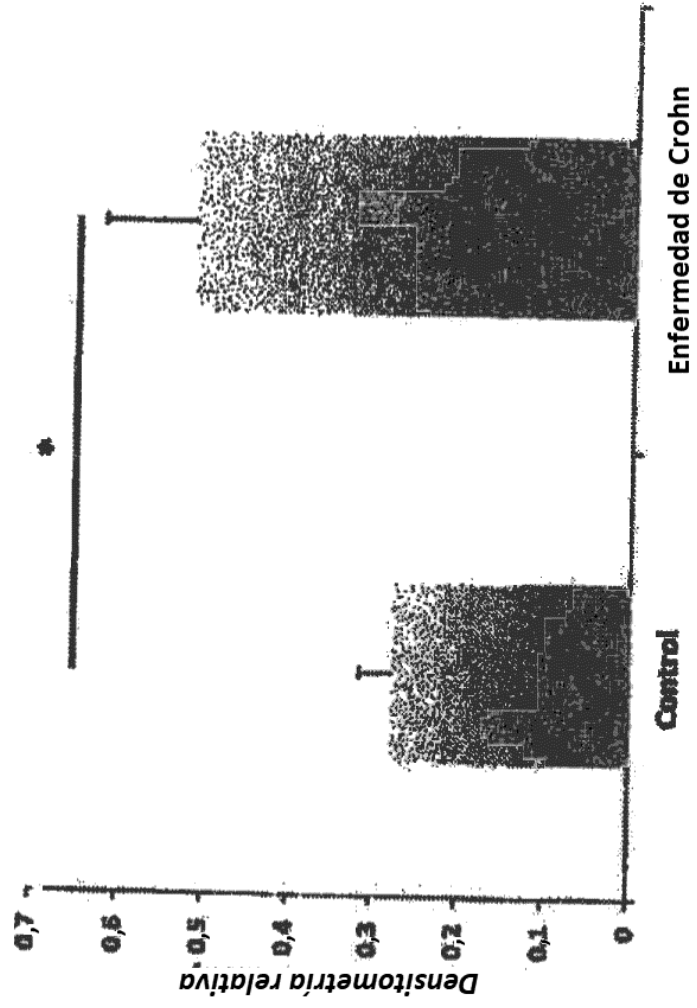


FIGURA 11

\*=P<0,05