

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



**ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN
DE GENES EN CÉLULAS EPITELIALES
INTESTINALES EN RESPUESTA A LOS
FENÓMENOS DE DIFERENCIACIÓN Y APOPTOSIS**

TESIS DOCTORAL

RAÚL DE LA TORRE MEDINA

Granada, 2006

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Raúl de la Torre Medina
D.L.: Gr. 129 - 2005
ISBN: 84-338-3702-8

**ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE LA
EXPRESIÓN DE GENES EN CÉLULAS
EPITELIALES INTESTINALES EN RESPUESTA
A LOS FENÓMENOS DE DIFERENCIACIÓN Y
APOPTOSIS.**

Memoria que presenta D. Raúl de la Torre Medina para aspirar al grado de Doctor
en Farmacia.

Prof. Dr. D. Antonio Suárez García

Dr. D. José María Vieites Fernández

Ldo. D. Raúl de la Torre Medina

D. Antonio Suárez García, Doctor en Farmacia, Profesor Titular de Universidad.

CERTIFICA:

Que Don Raúl de la Torre Medina ha realizado el trabajo de investigación titulado “Estudio de la regulación de la expresión de genes en células epiteliales intestinales en respuesta a los fenómenos de diferenciación y apoptosis” bajo mi dirección, y que la presente memoria corresponde fielmente a los resultados obtenidos.

En cumplimiento de la normativa vigente, me complace informar favorablemente la presentación de esta Tesis Doctoral ante el Tribunal que se designe.

Granada, enero de 2006.

D. José María Vieites Fernández, Doctor en Ciencias Biológicas.

CERTIFICA:

Que Don Raúl de la Torre Medina ha realizado el trabajo de investigación titulado “Estudio de la regulación de la expresión de genes en células epiteliales intestinales en respuesta a los fenómenos de diferenciación y apoptosis” bajo mi dirección, y que la presente memoria corresponde fielmente a los resultados obtenidos.

En cumplimiento de la normativa vigente, me complace informar favorablemente la presentación de esta Tesis Doctoral ante el Tribunal que se designe.

Granada, enero de 2006.

El presente trabajo de investigación contiene parte de la labor experimental realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada. Este trabajo fue compatibilizado con otras investigaciones en el grupo.

El trabajo ha sido financiado por los proyectos de investigación . El autor ha disfrutado de una beca de Formación de Personal Docente e Investigador de la Junta de Andalucía.

Parte de los resultados de estos trabajos han sido presentados en los Congresos de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular de 2002 (XXV Congreso de la SEBBM), 2004 (XXVII Congreso de la SEBBM) y 2005 (XXVIII Congreso de la SEBBM), y en el artículo “Characterization of human cd200 glycoprotein receptor gene located on chromosome 3q12-13”, en *Gene*, 2003;311:99-104.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
Estructura y fisiología del epitelio intestinal.....	1
Desarrollo embrional.....	1
Órgano maduro.....	3
Composición de la membrana basal.....	6
Componentes de la membrana basal.....	7
Contactos focales e integrinas.....	9
Regulación de la expresión de genes en el intestino.....	14
Cambios en la expresión de genes durante el desarrollo y la diferenciación.....	15
Cambios en la expresión de genes durante la apoptosis y/o anoikis.....	26
Cambios en la expresión de genes durante la enfermedad.....	27
La familia de GTPasas pequeñas Rho.....	31
Introducción.....	31
Estructura del gen <i>RND3</i> y actividad de la proteína Rnd3.....	33
Expresión del gen <i>RND3</i>	34
Función de Rnd3.....	35
Modelos de diferenciación y apoptosis de animales y líneas celulares intestinales.....	37
Cultivos celulares generados en animales experimentales.....	38
IEC-6 (ATCC CRL-1592).....	38
IEC-18 (ATCC CRL-1589).....	39
Líneas establecidas a partir de cánceres de colon humanos.....	40
Caco-2 (ATCC HTB-37).....	40
HT29 (ATCC HTB-38).....	43
Cultivos establecidos a partir de intestino humano normal.....	45
HIEC.....	45
TsFHL.....	45
PCDE.....	46
OBJETIVOS.....	47

ÍNDICE

MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
Materiales.....	49
Bacterias.....	49
Plásmidos.....	49
Animales.....	52
Líneas celulares.....	52
Anticuerpos.....	53
Enzimas.....	54
Productos químicos.....	55
Soluciones generales.....	55
Equipamientos generales.....	57
Métodos.....	60
Procedimientos generales de trabajo con líneas celulares de mamíferos.....	60
Cultivo.....	60
Subcultivo y expansión.....	60
Tripsinización.....	60
Contaje.....	60
Congelación y descongelación.....	61
Transfección transitoria de células.....	61
Establecimiento de clones estables.....	62
Materiales.....	63
Inducción de apoptosis.....	63
Inducción de diferenciación.....	64
Análisis de la actividad de la región promotora.....	66
Procedimientos de trabajo con <i>Escherichia coli</i>	68
Cultivo de bacterias.....	68
Preparación de bacterias competentes.....	69
Electroporación.....	70
Estudio sistemático de colonias.....	71
Procedimientos de trabajo con RNA.....	72
Extracción de RNA.....	72
Tratamiento con TURBO DNAsa.....	75

Cuantificación de DNA y RNA.....	76
Reacción de transcripción inversa (RT).....	76
Extensión de cebadores.....	78
<i>Northern blot</i>	81
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	88
Amplificación de DNA.....	88
Estudio de la expresión de genes por RT-PCR.....	90
Procesamiento y manipulación de DNA.....	93
Preparación de DNA plasmídico.....	93
Preparación de DNA genómico.....	94
Electroforesis en geles de agarosa.....	94
Purificación de DNA de geles de agarosa.....	96
Empleo de enzimas de restricción.....	96
Clonación de fragmentos de DNA.....	97
Análisis de proteínas.....	99
Medición de la concentración de proteínas.....	99
Electroforesis de proteínas en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE).....	100
Técnica de inmunoprecipitación.....	101
<i>Western Blot</i>	103
Citometría de flujo.....	104
Determinación de actividad de la fosfatasa alcalina.....	107
Medición de la concentración de nucleósidos y nucleótidos.....	107
Técnicas de microscopía.....	109
Microscopio electrónico.....	109
Microscopio de fluorescencia.....	110
Aislamiento de células de la mucosa de intestino de rata.....	110
Generación de formas mutadas del promotor.....	111
Secuenciación del DNA.....	113
Análisis <i>in silico</i>	114

ÍNDICE

RESULTADOS.....	117
Cambios en los niveles del RNA mensajero de Arhe por efecto del Matrigel y los nucleósidos añadidos al medio.....	117
Determinación del componente del Matrigel responsable de los cambios en los niveles del mensajero de Arhe.....	120
Efectos de la confluencia en los niveles de Arhe y otras GTPasas de pequeño tamaño.....	122
Cambios en los niveles de Rnd3 en células epiteliales intestinales sometidas a anoikis.....	127
La expresión de RND3 es regulada a nivel transcripcional.....	133
Determinación del extremo 5' del mRNA: enfoques informáticos y de laboratorio.....	133
Aislamiento y estudio de la región promotora.....	135
El empleo de anticuerpos activadores de las integrinas β 1 disminuye la anoikis y los cambios de Rnd3 asociados a ella.....	139
El uso de un inhibidor de la vía de la fosfoinositol-3-quinasa (PI3K) elimina el efecto protector de la activación de las integrinas β 1.....	142
Actividades de versiones mutadas en sitios de unión de factores de transcripción predichos por programas informáticos.....	145
Cambios en la expresión de Arhe in vivo en células de intestino de rata aisladas en suspensión y en el intestino de ratas tratadas con sulfato de dextrano sódico.....	147
Los cambios en la expresión de Rnd3 asociados a anoikis se producen también en células MCF7 y MG63.....	150
DISCUSIÓN.....	153
CONCLUSIONES.....	163
BIBLIOGRAFÍA.....	165
ANEXO.....	227

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Estructura y fisiología del epitelio intestinal

1.1.1.- Desarrollo embrionario

El desarrollo ontogénico del intestino de los mamíferos es un proceso muy organizado desde los puntos de vista temporal y espacial, y presenta dos momentos de especial importancia. Uno es el nacimiento, que significa el paso de un entorno intrauterino a uno extrauterino, con la consiguiente entrada en contacto con diferentes microorganismos, mientras que el otro es el paso de la lactancia al destete, lo que representa la transición de una dieta monótona de leche materna a la ingesta de la dieta adulta, hecho que se acompaña de grandes modificaciones en las funciones digestivas y de transporte, perdiéndose las características neonatales del intestino y adquiriéndose las del órgano maduro.

En el feto, el tracto digestivo, al igual que otros órganos de vertebrados, se forma a partir de un primordio embrionario heterogéneo. La capa germinal endodérmica da lugar al tubo epitelial intestinal, en tanto que el mesénquima que la rodea produce el tejido conectivo y la musculatura subyacentes. Los procesos de morfogénesis y diferenciación celular intestinales son similares en diferentes especies de mamíferos, variando sólo en el ritmo con el que se dan. El intestino delgado humano adquiere los principales rasgos morfológicos y funcionales durante la vida fetal, a diferencia de lo que ocurre en modelos murinos, donde el desarrollo comienza al final de la gestación y se completa en la tercera semana postparto durante el destete (Traber, 1998). Así, las especies con desarrollo más lento, como la rata y el ratón, sólo alcanzan la madurez tras el destete (Henning, 1981), frente a las especies precoces, como el cerdo, la oveja o el humano, que alcanzan un mayor desarrollo en el útero (Attaix and Meslin, 1991; Smith, 1981; Weaver and Carrick, 1989). Los procesos que marcan el desarrollo intestinal son:

- Formación de vellosidades primitivas al doblarse el endodermo embrionario debido a la presencia de invaginaciones en el mesénquima (Beaulieu and Calvert, 1985).

INTRODUCCIÓN

- Diferenciación progresiva de las células del endodermo en los diferentes tipos de células especializadas del intestino.
- Formación de criptas en la base de las vellosidades con células de Paneth residentes.

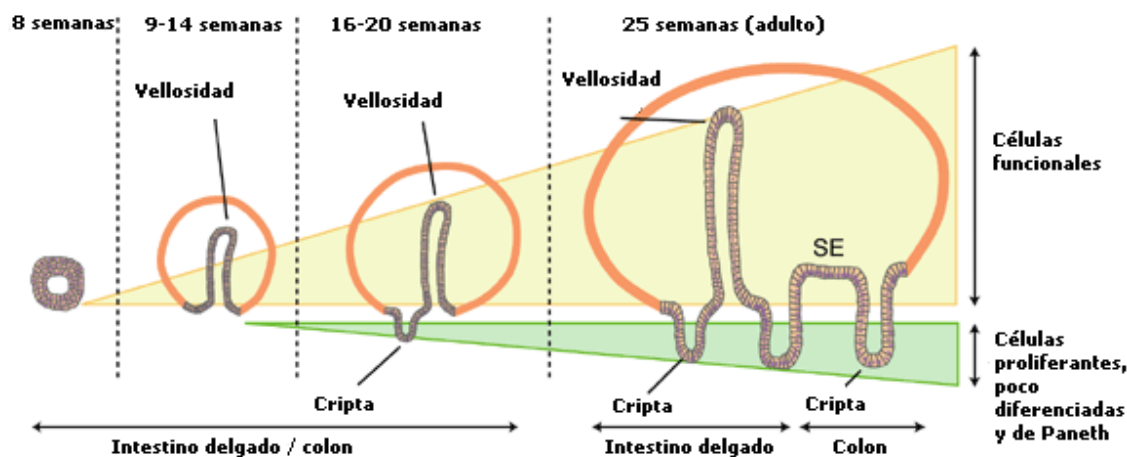


Figura 1.- Desarrollo y características del epitelio intestinal humano en desarrollo. (Teller and Beaulieu, 2001)

En el caso del intestino humano (Figura 1), a las 7-10 semanas de gestación, las paredes intestinales consisten en un epitelio estratificado de dos o cuatro capas de células, rodeado de capas de mesénquima. Esas células epiteliales son poco diferenciadas, con microvellosidades cortas e irregulares y una gran actividad mitótica. La formación de vellosidades y el paso a un intestino monocapa empieza en la semana 9 en el intestino proximal y posteriormente se extiende a la zona más distal del intestino delgado completándose en las semanas 11-12 (Teller and Beaulieu, 2001). En el colon también se forman vellosidades entre las semanas 9 y 16 con actividades típicas del intestino delgado (Potter and Burlingame, 1986; Potter *et al.*, 1983; Smith and James, 1979), aunque desaparecen durante la segunda mitad de la gestación (tras el destete en roedores) (Menard *et al.*, 1994b). Las criptas del intestino delgado empiezan a formarse en la semana 16, y contienen un grupo de células madre proliferantes indiferenciadas (Schmidt *et al.*, 1985). El desarrollo temprano de las criptas es típico de especies con un período de gestación largo (Moxey and Trier, 1978; Trahair and Robinson, 1986a-b,

Trahair *et al.*, 1986a-c), a diferencia de los roedores, en los que las criptas se forman tras el nacimiento (Hirano and Kataoka, 1986).

La expresión de enzimas digestivas marcadoras de la diferenciación intestinal (fosfatasa alcalina, leucinaminopeptidasa, disacaridasas, dipeptidasas y tripeptidasas) se produce en paralelo a los cambios morfológicos y el paso del epitelio multiestratificado a uno de una sola capa de células. A mediados de la gestación (semanas 18-22), la mucosa del intestino delgado humano se asemeja a la del adulto en morfología y capacidades digestivas (Beaulieu, 1997), mientras que la morfogénesis del colon se retrasa 2-3 semanas (Teller and Beaulieu, 2001).

1.1.2.- Órgano maduro

El intestino maduro se divide longitudinalmente en duodeno, yeyuno, íleon (que conforman el intestino delgado), ciego, colon y recto (que forman el intestino grueso). Todo el recorrido está cubierto de un epitelio de una sola capa de células que, en condiciones normales, se encuentra ininterrumpido. Este epitelio actúa como una barrera selectiva a los contenidos del lumen y presenta proteínas que permiten la degradación y absorción de los nutrientes (Van Beers *et al.*, 1995).

En cuanto a su organización transversal, se distinguen cinco capas transversales que son, desde la superficie luminal al interior:

- La mucosa, formada por un epitelio que se invagina en el corion o lámina propia (que es tejido conjuntivo laxo) dando lugar a las criptas intestinales.
- La *muscularis mucosa*, que consta de dos capas de musculatura lisa, una interna y circular y otra externa y longitudinal.
- La submucosa, formada por tejido conjuntivo elástico en el que se encuentran lóbulos de tejido adiposo donde se localizan las glándulas de Brünner, que sólo están en el duodeno y producen sustancias que protegen la mucosa duodenal de la acidez del jugo gástrico.
- La capa muscular, que presenta una estructura similar a la *muscularis mucosa*.

INTRODUCCIÓN

- La capa conjuntiva externa, constituida por la serosa peritoneal, salvo en ciertos puntos del duodeno y el colon, donde está sustituida por una adventicia (Poirier, 1985).

Como hemos indicado, la mayor parte de la superficie intestinal, sobre todo en el duodeno y la porción proximal del yeyuno, se encuentra plegada formando vellosidades y criptas, lo que incrementa el área útil para la absorción de

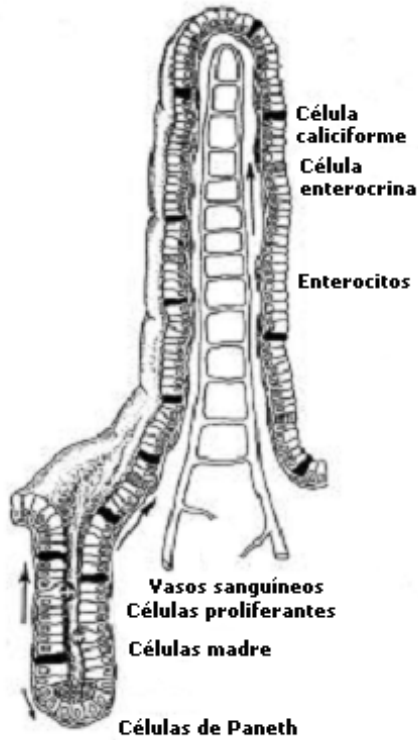


Figura 2.- Representación del epitelio del intestino delgado, en el que se representan los cuatro tipos fundamentales de células intestinales (Van Beers *et al.*, 1995).

nutrientes (Van Beers *et al.*, 1995). En el intestino delgado existen células madre en la parte inferior de cada cripta que se dividen asimétricamente para dar lugar a nuevas células madre y a células proliferantes. Cuando las células proliferantes se han dividido unas cuatro veces, se diferencian dando lugar a células especializadas, que pueden ser enterocitos, células enterocrinas, células caliciformes y células de Paneth. Si se transforman en células de Paneth migran al fondo de la cripta, pero si se transforman en cualquiera de los otros tres tipos celulares, migran hacia lo alto de la vellosidad, donde serán

eliminadas varios días después (Traber and Silberg, 1996; Karam, 1999). Esa

eliminación en lo alto de la vellosidad se piensa que se debe a un proceso especial

de apoptosis por pérdida de sustrato, que es llamado anoikis. Este proceso es facilitado por la composición de la membrana basal, la expresión de TGF- β y el patrón de integrinas expresadas a ese nivel (Beaulieu, 1992; Wang *et al.*, 1995). Además las células proliferativas de la cripta pueden entrar en un proceso de apoptosis espontánea que permite la eliminación de aquellas células defectuosas o dañadas (Potten, 1997).

Los enterocitos (Figura 2, células blancas) constituyen el 90% de las células dirigidas hacia el lumen. Son células polarizadas con fuertes uniones intercelulares y con una membrana apical en borde de cepillo con pequeñas proyecciones llamadas microvellosidades. Estas células tienen funciones absorptivas e hidrolíticas. Poseen hidrolasas como la lactasa y la sacarasa-isomaltasa y otras proteínas encargadas del transporte de nutrientes. Muchas de estas proteínas y rasgos morfológicos aparecen durante un proceso de diferenciación que se da durante la migración desde la cripta a lo alto de la vellosidad (Van Beers *et al.*, 1995; Karam, 1999).

Las células enterocrinas (Figura 2, células rayadas) representan un pequeño porcentaje de las células intestinales, pero pueden producir hasta quince tipos diferentes de hormonas. Durante el proceso de diferenciación celular estas células pasan de producir varias hormonas a acabar produciendo un tipo predominante (Traber and Silberg, 1996).

Las células caliciformes (Figura 2, células negras) producen grandes cantidades de mucinas que cubren todo el epitelio del intestino, formando un gel que constituye una barrera contra macromoléculas. La cantidad de células caliciformes varía a lo largo del tracto gastrointestinal desde un 5% en el intestino delgado a un 50% en el colon (Van Beers *et al.*, 1995).

Las células de Paneth (Figura 2, células punteadas) están presentes en las criptas del intestino delgado. Producen polipéptidos antimicrobianos como lisozima y defensinas, que eliminan bacterias y virus. Presentan una tasa de recambio mucho más baja que los otros tres tipos celulares (tres semanas frente a unos pocos días) (Traber and Silberg, 1996).

En el caso del colon, aunque éste tiene un diámetro mayor que el intestino delgado, existe una área epitelial mucho más pequeña debido a su menor longitud y a que la superficie epitelial no se encuentra tan plegada. En el colon no existen vellosidades, aunque sí criptas donde se encuentran las células proliferativas. El colon presenta gran cantidad de mucus, y su función fundamental es regular el intercambio de líquidos y electrolitos entre el lumen y el cuerpo. El colon carece

INTRODUCCIÓN

de enzimas digestivas salvo durante el desarrollo temprano del intestino y determinadas condiciones especiales (Van Beers *et al.*, 1995; Beaulieu, 1997).

1.1.3.- Composición de la membrana basal

Como se ha indicado previamente, el epitelio intestinal es un tejido altamente dinámico, que se renueva cada 3-5 días. La regulación de su crecimiento y funcionalidad depende de gran cantidad de factores tanto en el órgano maduro como durante el desarrollo embrionario. Asimismo, desde hace tiempo se ha hecho cada vez más evidente que las proteínas de la matriz celular están implicadas en la regulación de los movimientos morfogénéticos, la diferenciación y la migración de las células epiteliales a través de receptores de membrana celulares (Hynes, 1992; Adams and Watt, 1993).

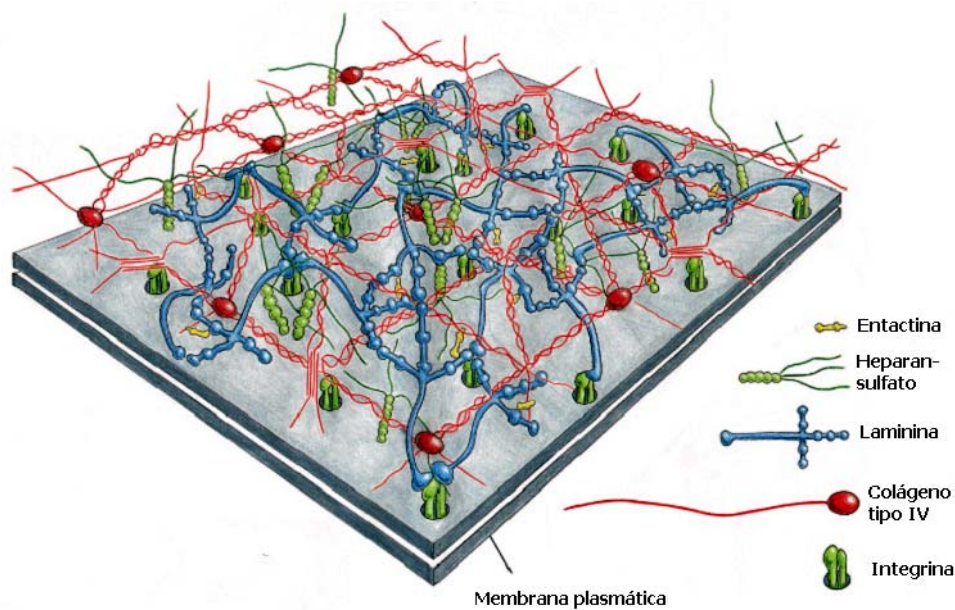


Figura 3.- Modelo de la membrana basal en el que se señalan sus principales componentes, así como algunas de las interacciones entre ellos. En este modelo se puede observar que el colágeno, la laminina y los proteoglicanos interaccionan entre ellos y con las integrinas de la membrana celular. (Yurchenco *et al.*, 1990).

Las membranas basales son estructuras finas, continuas y flexibles de matriz extracelular que se encuentran bajo las capas de células endoteliales y epiteliales y rodeando determinadas células individuales, como miocitos, adipocitos y células de Schwann. Dividen los tejidos en diferentes compartimentos y filtran la comunicación entre epitelio y mesénquima. Aparte de sus labores como estructura de base o de filtro, las membranas basales influyen en la proliferación celular y los procesos de diferenciación, polarización y apoptosis, determinan la expresión de genes y actividades metabólicas, ayudan a la organización de proteínas en las membranas celulares y sirven como sustrato durante la migración celular (Timpl and Brown, 1996; De Arcangelis *et al.*, 1996). Todas esas funciones son mediadas por diferentes tipos de receptores celulares de membrana, entre los que destacan las integrinas (Giancotti and Ruoslahti, 1999).

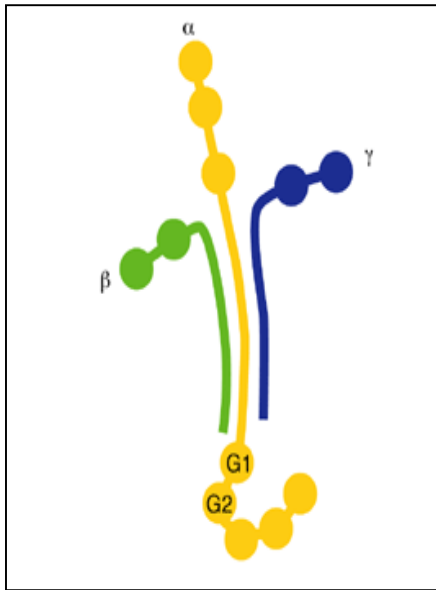
La composición de las membranas basales varía dependiendo del tejido, y en el caso del intestino existen cambios durante la función normal del intestino (Beaulieu, 1997), a lo largo del eje cripta-vellosidad (Beaulieu, 1992; Simon-Assmann and Kedinger, 1993), durante el desarrollo intestinal (Simon-Assmann and Kedinger, 1993; Perreault *et al.*, 1995; Rao *et al.*, 1994) y en la enfermedad (Riedl *et al.*, 1992; Aigner *et al.*, 1997; Hauptmann *et al.*, 1995; Murch *et al.*, 1993; Goulet *et al.*, 1995). Sin embargo, existen ciertos componentes que se mantienen en todas las membranas basales. Así, las lamininas están siempre presentes y son necesarias para el correcto ensamblaje de la matriz extracelular. Además, la mayoría de las membranas maduras contienen una red de colágeno IV, heparansulfato y entactina (Ekblom *et al.*, 1998; Simon-Assmann *et al.*, 1994) (Figura 3).

1.1.4.- Componentes de la membrana basal

Las lamininas forman una familia multigénica de moléculas de la matriz extracelular, cuyo primer miembro fue descrito por primera vez hace más de 20 años (Timpl *et al.*, 1979). Constan de tres cadenas (α , β y γ) que se unen en paralelo entre sí por las regiones de las colas y forman una T (Colognato and Yurchenco, 2000) (Figura 4). Cuantitativamente las lamininas son el componente predominante de la matriz extracelular, donde se encuentran polimerizadas (Figura 3). Desde el punto de vista funcional, las lamininas son importantes

INTRODUCCIÓN

porque determinan la organización de la matriz extracelular (Timpl and Brown, 1996; Paulsson, 1986; Yurchenco and Cheng, 1993; Smyth *et al.*, 1999; De



Arcangelis *et al.*, 1996) y promueven la adhesión (Johansson *et al.*, 1981; Terranova *et al.*, 1982), crecimiento, polarización, migración (McCarthy *et al.*, 1983) y diferenciación celular (Colognato and Yurchenco, 2000; McGowan and Marinkovich, 2000). Recientemente se ha descrito la existencia de lamininas intracelulares en linfocitos, monocitos y plaquetas (Geberhiwot *et al.*, 2000; Pedraza *et al.*, 2000), aunque su función no está clara todavía.

Figura 4.- Estructura general de las lamininas. Los dominios globulares de las cadenas β y γ son importantes en su polimerización. La unión a las integrinas puede darse por los dominios globulares de la cadena α . (Teller *et al.*, 2001)

Algunas lamininas se encuentran tanto en el intestino adulto como en el fetal, en tanto que otras sólo se expresan en uno de los estadios, por lo que parecen candidatas a regular el

desarrollo intestinal. Éste es el caso de la laminina 2, que sólo se encuentra en el humano a partir de la 8^a semana de gestación, mientras que las lamininas 4 y 7 sólo están presentes en el adulto (Simon-Assmann *et al.*, 1998). También es importante el confinamiento espacial y/o temporal de algunas de las lamininas, lo que puede ser importante en la diferenciación de los enterocitos durante su migración en el eje cripta-vellosidad: la laminina 1 sólo se halla en las vellosidades, lo mismo que las lamininas 5 (Leivo *et al.*, 1996; Sordat *et al.*, 1998) y 10 (Teller and Beaulieu, 2001), mientras que la laminina 2 sólo está presente en las criptas (Beaulieu and Vachon, 1994; Simon-Assmann *et al.*, 1994, 1998) (Figura 6). Además, las cadenas de las lamininas pueden ser producidas por los enterocitos, las células del mesénquima o por ambas (Simon-Assmann *et al.*, 1998); éste es el caso de la cadena $\gamma 2$, que forma parte de la laminina 5, que es producida al principio por células epiteliales y más tarde por las mesenquimales (Orian-Rousseau *et al.*, 1996).

En cuanto a la distribución temporal, existe un confinamiento gradual de la laminina 1 a las zonas entre las vellosidades durante la formación de éstas (semanas 8-10) para posteriormente ser reemplazada por la laminina 2. También se produce una redistribución de las lamininas 5 y 10, que son ubicuas en un principio, y acaban pasando a la zona apical del eje cripta-vellosidad (Teller and Beaulieu, 2001) (Figura 6).

La laminina 1 es de especial interés para la diferenciación intestinal, pues la adición de anticuerpos contra la cadena $\alpha 1$ produce una inhibición de actividad lactasa, mientras que el uso de laminina 1 como sustrato aumenta la expresión de lactasa y sacarasa-isomaltasa (Simon-Assmann *et al.*, 1998) y la expresión de *Cdx2* (Lorentz *et al.*, 1997).

El colágeno IV forma una red más rígida y mecánicamente más fuerte que las lamininas. Se une a éstas a través de heparansulfatos como el nidógeno o entactina y el perlecán, que son capaces de unirse a colágeno y lamininas simultáneamente y actúan así como mediadores entre componentes de la membrana. Se encuentra fundamentalmente en la base de la cripta (Beaulieu, 1997).

1.1.5.- Contactos focales e integrinas

Las integrinas son una gran familia de glicoproteínas receptoras de membrana conservadas evolutivamente compuestas por heterodímeros de una cadena α y una cadena β , y pueden unirse a diferentes ligandos, fundamentalmente componentes de la membrana extracelular, y modular señales intracelulares en respuesta a esa unión. Tras la unión al ligando, se produce el agrupamiento de las integrinas en sitios especializados de la membrana celular llamados contactos focales. En estos sitios, las integrinas se unen a complejos del citoesqueleto intracelulares y de este modo transducen información posicional de la matriz a la célula (Turner and Burridge, 1991; Yamada and Miyamoto, 1995). Las integrinas también pueden cooperar en asociación lateral directa con otros receptores de membrana (transactivación), como en el caso del receptor CD98 (Boudreau and Jones, 1999; Schwartz *et al.*, 2002; Cai *et al.*, 2005).

INTRODUCCIÓN

Desde un punto de vista estructural, las cadenas α de las integrinas tienen sitios de unión de Ca^{++} y $\text{Mg}^{++}/\text{Mn}^{++}$ (Leitinger *et al.*, 2000) que están implicados en la unión a los ligandos. Además, presentan un motivo KxGFFKR en el extremo citoplásmico que modula la unión a los ligandos (Willians *et al.*, 1994; Dedhar and Hannigan, 1996) al que se une la calreticulina, uno de los pocos ligandos intracelulares conocidos de estas cadenas (Rojiani *et al.*, 1991).

Las cadenas β también tiene un sitio conservado de unión de $\text{Mg}^{++}/\text{Mn}^{++}$ y presentan grandes dominios extracelulares de 700-1100 aminoácidos que forman una estructura globular en su extremo N-terminal y contienen las regiones de unión de ligandos (Humphries, 2000). En cambio, presentan colas citoplásmicas de sólo 30-50 aminoácidos a excepción de la porción intracelular de la β_4 , que contiene 1000 aminoácidos (Hemler *et al.*, 1990). La unión de las integrinas al citoesqueleto se da fundamentalmente a través de la unión de las cadenas β a las proteínas talina y filamina (Calderwood *et al.*, 2000; Critchley, 2000), que interaccionan con vinculina y paxilina, que interactúan con la FAK y activan esta vía (Almeida *et al.*, 2000). Las cadenas β_1 , β_2 y β_3 de las integrinas también pueden interaccionar directamente con una serintreoninquinasa (ILK, *integrin-linked kinase*) que está implicada en la adhesión celular, el crecimiento celular anclaje-dependiente (Hannigan *et al.*, 1996) y la anoikis (Attwell *et al.*, 2000).

Las integrinas reconocen a sus ligandos dependiendo de las subunidades que las forman. Estos ligandos son fundamentalmente algunas proteínas de la matriz extracelular. Algunas integrinas pueden interaccionar igualmente con otros receptores en otras células o en el plasma, como ocurre durante la cicatrización en las plaquetas al interaccionar sus integrinas con el fibrinógeno plasmático (Hynes, 1992; Clemetson and Clemetson, 1998).

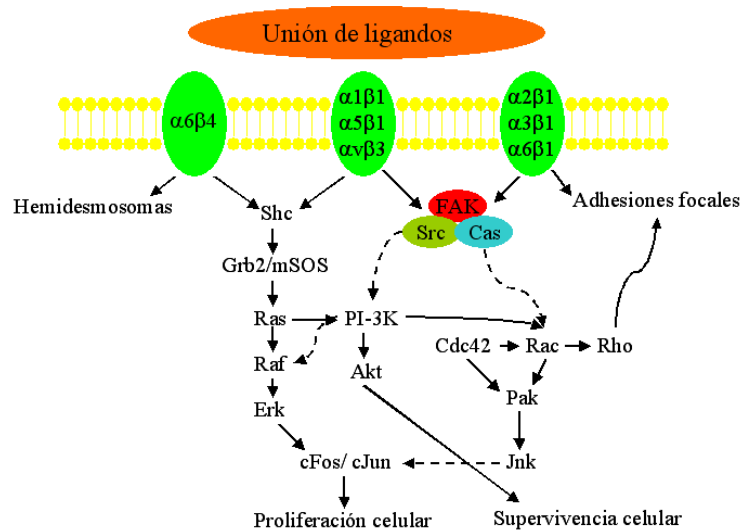


Figura 5.- Esquema que muestra las principales vías de transducción de señales a partir de la unión de las integrinas a sus ligandos.

Las integrinas llevan información extracelular al interior de las células dando señales que producen fosforilaciones en tirosinas (Dedhar, 2000; Schlaepfer and Hunter, 1998) a través de las vías de la quinasa de la adhesión focal (*focal adhesion kinase*, FAK), Ras, la quinasa activada por mitógenos MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) y la quinasa Jnk (*C-jun-amino-terminal kinase*) (Howe and Juliano, 1998; Giancotti, 2000; Giancotti, 1996; Cary and Guan, 1999; Cary *et al.*, 1999; Giancotti and Ruoslahti, 1999), y las vías de la fosfoinositol-3-quinasa (PI3K), fosfolipasa C (PLC) y las pequeñas GTPasas Rho, Rac y Cdc42 (Howe and Juliano, 1998; Longhurst and Jennings, 1998; Boudreau and Jones, 1999; Schoenwaelder and Burridge, 1999; Dib, 2000). En respuesta a esas señales se produce la regulación de la expresión de genes, el crecimiento celular, la migración, y de este modo la diferenciación (Hynes, 1992; Miranti and Brugge, 2002; Aplin *et al.*, 1999) (Figura 5). Del mismo modo participan en el desarrollo embrionario, angiogénesis, cicatrización de heridas, hemostasis, respuesta inmune e inflamatoria (Hynes, 1992) y también están implicados en la metástasis (Clezardin, 1998). Finalmente, la unión de las integrinas a sus ligandos proporciona señales de supervivencia para prevenir la apoptosis, fundamentalmente a través de la vía de la FAK (Meredith *et al.*, 1993; Sun *et al.*, 1999; Sonoda *et al.*, 1999; Brassard *et al.*, 1999). Así, la ruptura de la adhesión

INTRODUCCIÓN

celular a través de las integrinas produce un proceso de apoptosis que es denominado anoikis (Grossmann, 2002).

Muchas integrinas están normalmente en un estado de baja afinidad que requiere la activación para ejercer sus funciones adhesivas. La activación puede producirse como consecuencia de una señal intracelular: R-Ras produce la activación (Zhang *et al.*, 1996), mientras que H-Ras puede tener efectos activadores o inhibidores (Hughes *et al.*, 1997; Shibayama *et al.*, 1999). Rho, otro miembro de la familia Ras, también puede influir en la activación de las integrinas a través de su efecto regulador sobre el citoesqueleto (Laudanna *et al.*, 1996; Nguyen *et al.*, 2000). Además, la presencia de iones divalentes puede influir en la actividad de las integrinas (Leitinger *et al.*, 2000; Humphries, 2000; Plow *et al.*, 2000). De este modo, la presencia de calcio inhibe la unión de las integrinas a sus ligandos, mientras que la de magnesio o manganeso favorece esa unión (Smith *et al.*, 1994).

Las integrinas, al igual que sus ligandos las lamininas, son expresadas diferencialmente a lo largo del desarrollo intestinal y del eje cripta-vellosidad en el adulto (Beaulieu, 1999) (Figura 6), aunque algunas, como la $\alpha6\beta1$, parecen encontrarse en todos los enterocitos (Beaulieu and Vachon, 1994). Las integrinas $\alpha2\beta1$ y $\alpha3\beta1$ se encuentran en la membrana basal de los enterocitos siguiendo un patrón de complementariedad: la 1ª está en las criptas y la 2ª en las vellosidades (Perreault *et al.*, 1995; Beaulieu, 1992a). La integrina $\alpha7\beta1$ se encuentra paralela a la adquisición de las características de la diferenciación durante el desarrollo y el eje cripta-vellosidad, encontrándose en la parte superior de la cripta y la inferior de la vellosidad (Basora *et al.*, 1997). También existen diferentes isoformas de la cadena $\beta4$ de la integrina $\alpha6\beta4$ a lo largo del eje cripta-vellosidad con diferentes funciones y ligandos (Beaulieu and Vachon, 1994; Simon-Assmann *et al.*, 1994; Leivo *et al.*, 1996; de Melker and Sonnenberg, 1999; Basora *et al.*, 1999; Lussier *et al.*, 2000).

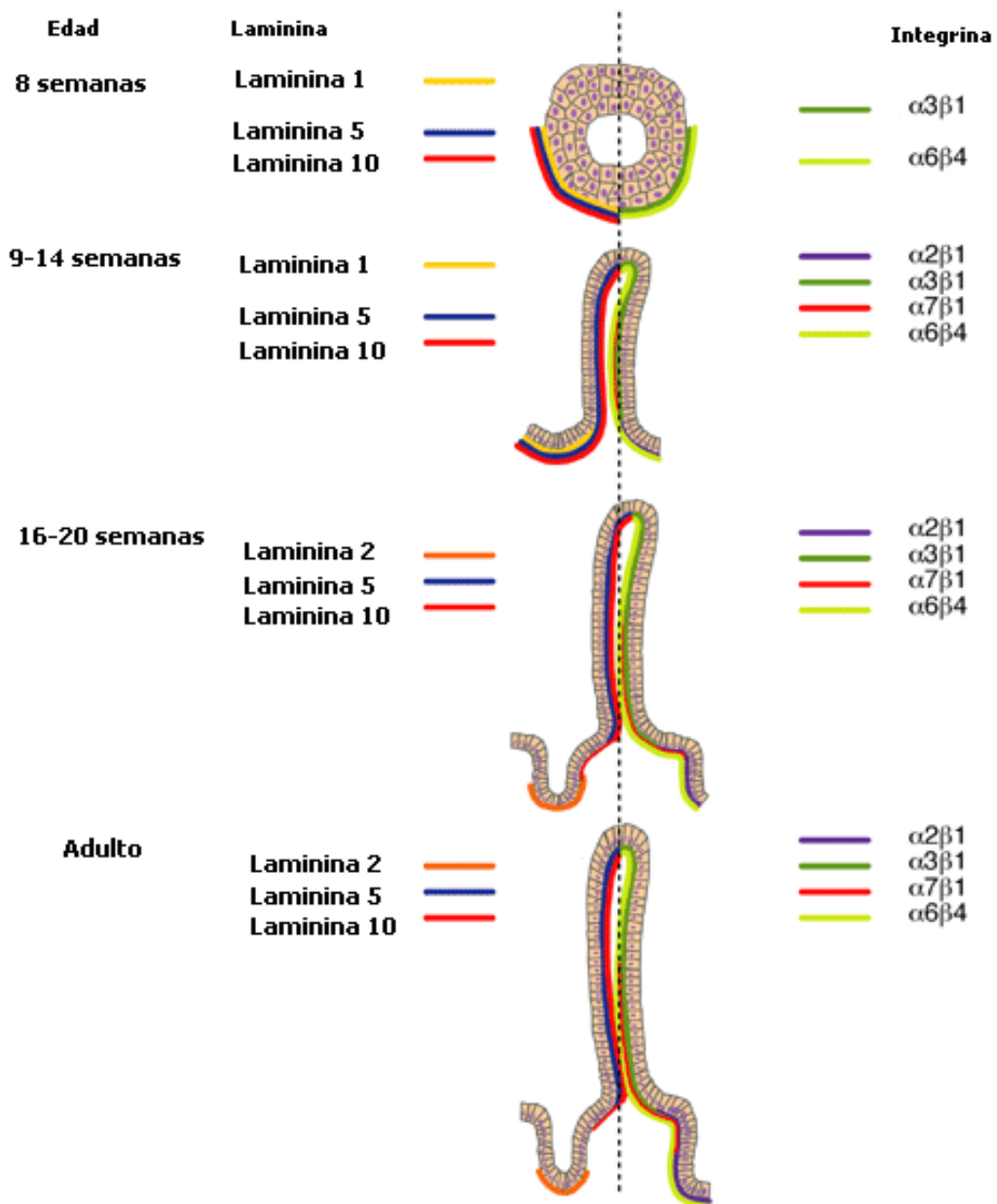


Figura 6.- Expresión de lamininas e integrinas a lo largo del eje cripta vellosidad en el feto y el adulto. (Teller *et al.*, 2001)

Existen importantes evidencias de la implicación de las integrinas en los procesos de diferenciación de los enterocitos. Haciendo estudios en cultivos celulares de células Caco-2, Levy *et al.* (1998) demostraron que la transcripción y la cantidad de integrina $\beta1$ presente en la membrana celular disminuyeron como consecuencia de la diferenciación de las células, lo que se acompañaba de una disminución en la señalización a través de la vía de la FAK. Esa disminución en $\beta1$ también ha sido observada en células Caco-2 que sobreexpresan *Cdx2* (Lorentz *et al.*, 1997).

INTRODUCCIÓN

Además, la activación de la integrina $\alpha 2$ produce un aumento en parámetros de diferenciación, tales como la actividad de fosfatasa alcalina y dipeptidildipeptidasa, en tanto que la estimulación de la subunidad $\alpha 6$ produce disminución de esos parámetros (Basson *et al.*, 2000).

1.2.- Regulación de la expresión de genes en el intestino

La regulación de la expresión de genes en el intestino es un proceso altamente ajustado cuyo propósito es controlar temporal y espacialmente la expresión de proteínas que permitan a las células, por un lado, acomodarse a los cambios del entorno y, por otro, llevar a cabo los procesos de proliferación, migración y diferenciación celular a lo largo del eje cripta-vellosidad y durante el desarrollo embrionario (Arnone and Davidson, 1997). Esta regulación se puede realizar a diferentes niveles (Orphanides and Reinberg, 2002), que incluyen el empaquetamiento del DNA, la existencia de factores de transcripción que se unan a determinados elementos del DNA, y la estabilidad de los mRNA sintetizados.

La cromatina es un complejo de DNA y proteínas que en las células en división se empaqueta en los cromosomas, mientras que en las células que no están en división se distribuye difusamente por el núcleo de forma más condensada (heterocromatina) o más abierta (eucromatina). La estructura de la cromatina está relacionada directamente con la expresión de los genes y se encuentra regulada por las histonas (Weintraub and Groudine, 1976). La modificación de las histonas, o de las estructuras que forman (los nucleosomas), por los complejos de remodelación de la cromatina, determina el que una área específica sea o no activa transcripcionalmente en un momento dado (Dillon and Festentein, 2002; Robertson, 2002; Felsenfeld and Groudine, 2003; Cunliffe, 2003). Las modificaciones de las histonas incluyen acetilación, metilación, fosforilación y ubiquitinización de aminoácidos.

La regulación transcripcional de la expresión de genes depende de la interacción entre elementos *cis* de DNA con proteínas reguladoras *trans*. Por ello, la activación transcripcional de un gen depende del paso de información entre las enzimas que remodelan la cromatina y los factores de transcripción que pueden tener un papel activador o represor (Traber, 1996; Martínez, 2002). El papel

crítico de las proteínas reguladoras, incluidos los factores de transcripción, en el control de la expresión de genes, se ha hecho más evidente con la secuenciación del genoma humano, ya que aproximadamente un 10% de los genes codificantes del genoma son de proteínas implicadas en la transcripción y la traducción (Lander *et al.*, 2001), y las proteínas reguladoras clave se han conservado a lo largo de la evolución (Davidson *et al.*, 2002).

También es importante la estabilidad de los RNA mensajeros (mRNA), que puede variar dependiendo de la unión de distintas proteínas y de la presencia de diferentes secuencias en los mRNA que pueden estabilizarlos o desestabilizarlos o afectar a la traducción (Address *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1997; Davis *et al.*, 2001). Cada vez cobra más importancia la presencia de RNA no codificantes (ncRNA) que pueden estabilizar los mensajeros o marcarlos para su degradación, *splicing* o traducción (Storz, 2002).

1.2.1.- Cambios en la expresión de genes durante el desarrollo y la diferenciación

Para determinar el grado de diferenciación de una célula se utilizan diferentes criterios cuyas metodologías son distintas. Existe un criterio morfológico, basado en las observaciones macroscópicas o microscópicas de una célula o tejido para identificar sus características y compararlas con otras, determinando de este modo su grado de diferenciación. El empleo de la microscopía electrónica permite mejorar el análisis de las células identificando estructuras subcelulares, con lo cual se hace más detallado el estudio. Otro criterio es el bioquímico, analizando la presencia de proteínas específicas de un determinado grupo celular. Un tercer criterio es el fisiológico, aplicado en aquellos tipos celulares que presentan, en estado adulto, funciones bien definidas, identificables en forma cuantitativa.

La regulación del desarrollo y diferenciación intestinales depende de las hormonas locales -factores autocrinos y factores paracrinos proporcionados por las células mesenquimales (Duluc *et al.*, 1994; Kedinger *et al.*, 1981)- y sistémicas, factores de crecimiento, neurotransmisores e interacciones complejas con los nervios entéricos de la mucosa y células inmunes de la lámina basal y las interacciones entre las propias células y de éstas con la matriz extracelular (Beaulieu, 1999;

INTRODUCCIÓN

Gordon and Hermiston, 1994; Montgomery *et al.*, 1999; Podolsky *et al.*, 1993). Algunos de esos mediadores producidos por células epiteliales, mesenquimales y del sistema inmune de la mucosa, son angiotensina (Campbell and Habener, 1986; Jin *et al.*, 1998), dopamina (Eisenhofer *et al.*, 1997), encefalina (Dupont, 1984), histamina y serotonina (Autore *et al.*, 1984), sustancia P (Hokfelt *et al.*, 2001; Qian *et al.*, 2001b), péptido vasoactivo intestinal (Dupont, 1984; Qian *et al.*, 2001a), prostaglandinas (Dupont, 1984) y diversos leucotrienos (Cominelli *et al.*, 1989; LeDuc *et al.*, 1994) e interleuquinas (Lawson and Powell, 1987).

Sin embargo, es la regulación de la transcripción lo que finalmente controla los cambios en las células. En el intestino se ha observado la existencia de programas complejos que dirigen los patrones de expresión de genes en líneas epiteliales intestinales y a lo largo de los ejes cripta-vellosidad y craneo-caudal en el tracto intestinal (Bry *et al.*, 1994; Crossman *et al.*, 1994; Gordon, 1989; Gordon *et al.*, 1992; Hermiston and Gordon, 1993; Markowitz *et al.*, 1995; Markowitz *et al.*, 1993; Traber, 1996). Varios estudios en roedores durante la lactancia y el destete han demostrado que los cambios relacionados con la edad en transportes nutricionales y enzimas están programados genéticamente, aunque también influenciados por la dieta o las hormonas (Buddington, 1992; Henning, 1978; Leeper and Henning, 1990; Nanthakumar and Henning, 1993; Toloza and Diamond, 1992; Vega *et al.*, 1992).

Se han descrito diversos cambios que se dan durante el desarrollo fetal intestinal. Esos cambios se dan fundamentalmente en dos niveles: expresión de genes implicados en vías de señalización y transcripción de genes, y expresión de genes implicados en la función absortiva del intestino. Esos cambios en la expresión pueden resumirse en:

- Genes implicados en vías de señalización: Existen cambios durante el desarrollo de la expresión de los homeogenes *Cdx1* y *Cdx2* en el intestino, aunque éstos se expresan no sólo en el intestino inmaduro sino también en el maduro (Duprey *et al.*, 1988; James *et al.*, 1994; Subramanian *et al.*, 1998). En el embrión en desarrollo del ratón, *Cdx1* (Duprey *et al.*, 1988; Meyer and Gruss, 1993) y *Cdx2* (James *et al.*, 1994) son expresados cuando el endodermo se transforma en un

epitelio monoestratificado con vellosidades iniciales. En el adulto, ambos genes siguen expresándose a altos niveles en los epitelios de intestino delgado y colon, mientras que los niveles de su mRNA son indetectables en otros tejidos (James and Kazenwadel, 1991; Suh *et al.*, 1994; Silberg *et al.*, 2000) y están implicados en el mantenimiento de un fenotipo diferenciado (Trinh *et al.*, 1999).

Los receptores para TGF- α y su homólogo EGF están presentes tanto en el feto como en el intestino neonato (Kelly *et al.*, 1992; Menard and Pothier, 1991; Thompson *et al.*, 1994b; Toyoda *et al.*, 1986). Así, la expresión del mensajero de TGF- α es muy marcada en el intestino inmaduro y maduro (Dvorak *et al.*, 1994; Dvorak and Koldovsky, 1994; Dvorak *et al.*, 1998), la de EGF aumenta durante el desarrollo (Dvorak *et al.*, 1994; 1998), aunque la abundancia de los receptores de EGF no es dependiente de la edad (Thompson *et al.*, 1994b). Esto indica que la expresión baja del mensajero de EGF en la lactancia se corresponde con una alta concentración de EGF en la leche materna (Grosvenor *et al.*, 1993; Odle *et al.*, 1996), en tanto que la ausencia de TGF- α en la misma se acompaña de una alta concentración de TGF- α en los enterocitos. Del mismo modo, los niveles altos de TGF- β en la leche se corresponden negativamente con la producción de TGF- β endógeno en el intestino delgado, la cual aumenta en el destete (Penttila *et al.*, 1998).

- Genes implicados en el metabolismo: El transporte activo de glucosa está presente en el intestino delgado fetal humano (Levin *et al.*, 1968) y el gradiente de absorción de glucosa duodeno-ileon se establece entre las semanas 17 a 30 de la gestación (Malo and Berteloot, 1991). Los niveles de mRNA del cotransportador *SGLT1* de glucosa y galactosa aumentan durante el desarrollo fetal (Davidson *et al.*, 1992; Freeman *et al.*, 1993; Lescale-Matys *et al.*, 1993; Miyamoto *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1994) y su actividad presenta un gradiente proximal-distal que desaparece con la edad, aparte de una disminución durante el destete (O'Connor and Diamond, 1999; Toloza and Diamond, 1992). También

INTRODUCCIÓN

hay dos transportadores de glucosa, GLUT 1, que sólo está presente en el intestino en la etapa fetal, y GLUT 2, cuya presencia aumenta gradualmente con la desaparición del anterior y la aparición de vellosidades y se coloca en la membrana basolateral (Matsumoto *et al.*, 1993), aunque disminuye con el destete (Miyamoto *et al.*, 1992). El transportador apical de fructosa GLUT 5 también se encuentra modulado durante el desarrollo (Davidson *et al.*, 1992; Mahraoui *et al.*, 1992, 1994; Mesonero *et al.*, 1994) de modo que aumenta en el destete (Shu *et al.*, 1997, 1998).

En el intestino delgado, la *ratio* de las dos isoformas NHE2 y NHE3 del transportador intercambiador de protones (H^+) y sodio (Na^+) depende de la edad, de modo que la capacidad de intercambio H^+/Na^+ aumenta durante el desarrollo y alcanza los máximos valores tras el destete (Collins *et al.*, 1997, 1998a-b, 2000; Kiela *et al.*, 2001, 2003; Xu *et al.*, 2001; Kikuchi *et al.*, 1990). El patrón de desarrollo del intercambiador cloruro (Cl^-)/ bicarbonato (HCO_3^-) es el contrario del anterior (Riedel and Grishan, 1989) y su expresión se regula al nivel de transcripción (Chow *et al.*, 1996).

El incremento durante el desarrollo de la actividad $Na^+-K^+-ATPasa$ sigue la expresión de las subunidades α y β de esta proteína y su expresión alcanza los niveles de adulto al final del destete (Fuller and Verity, 1990; Pacha *et al.*, 1991; Shepherd *et al.*, 1980; Zemanova and Pacha, 1998; Zemelman *et al.*, 1992).

Las subunidades β y γ de los canales de sodio sensibles al diurético amilorida aumentan en el colon como consecuencia del aumento en los niveles séricos de aldosterona (Pacha *et al.*, 1987; Watanabe *et al.*, 1998). Las hormonas tiroideas producen la maduración de otros transportadores (Debiec *et al.*, 1991) y enzimas digestivas (McDonald and Henning, 1992; Yeh *et al.*, 1991). La actividad de la enzima 11β -hidroxiesteroildehidrogenasa colónica es alta desde el nacimiento y no cambia sustancialmente hasta la edad adulta, frente a la actividad ileal, que es baja durante la primera semana tras el nacimiento y aumenta

durante el destete (Pacha and Miksik, 1994, 1996; Pacha *et al.* 1997; Pohlova *et al.*, 1997). A diferencia de los receptores de minerocorticoides, la expresión de los de glucocorticoides en el intestino inmaduro es mayor durante el periodo de lactancia y disminuye a niveles adultos en el destete (Fuller and Verity, 1990; Henning *et al.*, 1975).

También existen diversos estudios que han descrito los cambios en la expresión de genes que se dan durante el proceso de diferenciación celular en líneas celulares de intestino grueso, aunque quizá uno de los más completos es el realizado por Mariadason *et al.* (2002) mediante el uso de *microarrays* en células Caco-2 diferenciadas y sin diferenciar. Los genes con expresión diferencial durante la diferenciación de los colonocitos pueden dividirse en las siguientes clases funcionales:

- Genes relacionados con el citoesqueleto: Con la diferenciación se produce la aparición de microvellosidades, lo que se acompaña de la regulación de genes implicados en la formación de las mismas. Así, se ha observado que con la diferenciación aumentan villina, E-cadherina y claudina 7 (Mariadason *et al.*, 2002). En cambio, la expresión de claudina 2 es mayor en las criptas del colon (Escaffit *et al.*, 2005a). El grupo de Hodin *et al.* (1997) demostró que la regulación de la expresión del mRNA de la villina se da a nivel transcripcional durante la diferenciación post-confluencia en células Caco-2 y HT29.
- Genes relacionados con el ciclo celular: Con la diferenciación de los colonocitos disminuye su capacidad proliferante. De este modo, proteínas implicadas en la progresión del ciclo celular como ciclinas, proteínas del ciclo de división celular (CDC) y quinasas dependientes de ciclinas (CDK) disminuyen; por el contrario, las proteínas implicadas en la detención del ciclo celular como p21 y TOB aumentan. Los factores de transcripción de la familia *E2F*, implicados en la transición de la fase G1 a la S, también disminuyen. Además, disminuyen *K-ras* y *c-myc*, entre otros (Mariadason *et al.*, 2000, 2002). Con la diferenciación de los colonocitos también disminuyen la ciclina

INTRODUCCIÓN

D1, *MAD* y el antígeno proliferativo nuclear (*PCNA*) (Tabuchi *et al.*, 2002). En cuanto a los genes implicados en la apoptosis, en el colon, *Bcl-2*, que es inhibidor de la apoptosis, se expresa a gran nivel en la región de las células de la cripta, mientras que su expresión disminuye considerablemente en la superficie luminal (Sinicrope *et al.*, 1995; Hockenbery *et al.*, 1991). Por otra parte, la expresión de *Bak*, que induce la apoptosis en Caco-2 e IEC-18, es mayor en las células apoptóticas, que en el colon se localizan en el lumen intestinal (Moss *et al.*, 1996).

- Genes relacionados con la replicación y reparación del DNA, así como otras tareas de la división celular: Disminuyen enzimas implicadas en la síntesis de nucleótidos, como la timidilato sintasa, dihidrofolato reductasa, UMP quinasa, adenosin quinasa, y también diferentes enzimas implicadas en la replicación del DNA como MCM (*minichromosome maintenance proteins*), topoisomerasas y DNA polimerasas y supresores de tumor como BRCA 1 y 2; así como diferentes genes implicados en el ensamblaje de la cromatina (histonas y proteínas de ensamblaje del nucleosoma) (Mariadason *et al.*, 2002).
- Genes implicados en procesamiento, *splicing* y transporte de RNA: Son reducidos con la diferenciación, mientras que proteínas implicadas en el silenciamiento de RNA aumentan (Mariadason *et al.*, 2002).
- Genes implicados en la traducción, procesamiento y tráfico de proteínas: La tasa de producción de proteínas disminuye en un 80 % con respecto a células no diferenciadas, lo que puede deberse a una disminución generalizada de los genes implicados en estas funciones (Mariadason *et al.*, 2002).
- Genes relacionados con detoxificación de xenobióticos: Aumentan proteínas de las glutatión-S-transferasas, así como sulfotransferasas y UDP-glucosiltransferasas (Mariadason *et al.*, 2002). El aumento en la expresión de estos genes puede reflejar la activación de mecanismos de defensa en las células epiteliales dependiendo de su posición en el eje

cripta-vellosidad. Asimismo, aumenta la actividad de otros transportadores de xenobióticos como PepT1 y P-gp (Yamashita *et al.*, 2002).

- Genes relacionados con la matriz extracelular y la migración celular: Aumenta la expresión de la cadena de laminina $\beta 2$, diferentes cadenas de fibrinógenos y colágenos, y la vitronectina (Mariadason *et al.*, 2002; Landowski *et al.*, 2004). Aumentan igualmente las cadenas $\alpha 3$ y $\alpha 5$ de integrinas y disminuye la fibronectina, y existen cambios en las familias de las metaloproteasas (MMP) y sus inhibidores (TIMP) (Mariadason *et al.*, 2002). La osteopontina (SPP1), proteína relacionada con la respuesta inmune y la proliferación a través de su interacción con las integrinas, y la cadena $\beta 1$ de la integrina también aumentan su expresión al diferenciarse células Caco-2 con butirato (Tabuchi *et al.*, 2002), aunque estudios previos indicaron la existencia de una disminución de la cantidad de la cadena $\beta 1$ de integrinas con la diferenciación (Lorentz *et al.*, 1997; Levy *et al.*, 1998).
- Genes implicados en el metabolismo: Aumenta la expresión de la dipeptidilpeptidasa IV. En cuanto al metabolismo relacionado con la absorción de agua, lípidos e iones, principal función del colon, varios genes implicados en metabolismo de ácidos grasos (lipasas y deshidrogenasas, fosfatasa alcalina, PPAR y apolipoproteínas) aumentan, pero disminuyen genes implicados en síntesis de ácidos grasos y colesterol (Mariadason *et al.*, 2002). En el caso del transporte de agua también existen diferencias. El canal acuaporina 1 (AQP1) se expresa sólo en las criptas colónicas (Hasegawa *et al.*, 1993), en tanto que otros canales de esta familia se encuentran ausentes en determinados segmentos del intestino (Frigeri *et al.*, 1995a-b; Ishibashi *et al.*, 1995). Además, varios transportadores de aminoácidos e iones disminuyen su expresión fuera de las criptas colónicas (Landowski *et al.*, 2004). El transportador de glucosa GLUT5 aumenta fuertemente su expresión (Anderle, 2003), al igual que diversas proteínas implicadas

INTRODUCCIÓN

en el metabolismo de ATP (Anderle *et al.*, 2003; Landowski *et al.*, 2004).

- Genes implicados en vías de señalización: Los genes de la vía MAPK disminuyen junto a *Ras* y *Junk*, mientras que los factores de transcripción *CEBP* y *kruppel-like factor 4 (KLF4)* aumentan. Entre los receptores aumentan los de la familia de receptores de retinoides (RXR) (Mariadason *et al.*, 2002). El mRNA de la subunidad β_A de la activina, que es un miembro de la superfamilia del TGF- β , se expresa más en células Caco-2 diferenciadas por diferentes métodos, incluida la suplementación con butirato del medio de cultivo (Sonoyama *et al.*, 2000, 2003).

En el caso de la diferenciación de enterocitos se ha demostrado la existencia bastante extendida de un patrón según el cual la máxima expresión de los mRNA se da desde el punto de unión cripta-vellosidad hasta la mitad de la vellosidad, lo que se sigue de un descenso en los niveles de mensajero en la punta de la vellosidad (Traber, 1990). Además se ha demostrado la existencia de un descenso en los niveles de mensajeros de genes específicos, que puede ser debido a la existencia de un programa específico de senescencia (Traber and Silberg, 1996). Finalmente, también se ha observado la degradación de DNA en la punta de la vellosidad, indicativa de apoptosis (Gavrieli *et al.*, 1992). Los cambios en la expresión de genes que, según la bibliografía, se dan durante la diferenciación enterocítica en el intestino delgado se resumen en:

- Genes implicados en vías de señalización: Existen numerosos factores de transcripción para los que se ha demostrado una expresión diferencial a lo largo del eje cripta-vellosidad. Entre ellos destaca el gen con homeobox o caja homeótica *Cdx2*, que es un factor transcripcional que regula la proliferación y diferenciación en células epiteliales intestinales y controla la expresión en el promotor de la sacarasa-isomaltasa tanto *in vitro* (Suh *et al.*, 1994) como en la línea celular intestinal IEC-6, donde la expresión forzada de *Cdx2* produce su diferenciación (Suh and Traber, 1996), y en modelos animales (Adachi *et al.*, 2003). Asimismo, se une a elementos de otros genes

específicos del intestino (anhidrasa carbónica 1 –Drummond *et al.*, 1996-, lactasa –Mitchelmore *et al.*, 2000; Troelsen *et al.*, 1997-, cadena $\gamma 2$ de la laminina y $\alpha 6$ en integrinas -Lorentz *et al.*, 1997-, MOK – Uesaka and Kageyama, 2004- y calbindina-D9K –Lambert *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1999-) y puede actuar en elementos *enhancer* unidos a promotores heterólogos (Taylor *et al.*, 1997).

La expresión de los factores de transcripción HNF también está relacionada con el desarrollo del intestino (Shivdasani, 2002), pudiendo afectar a la expresión de la sacarasa-isomaltasa (Boudreau *et al.*, 2001) y las apolipoproteínas AI y CIII (Fraser *et al.*, 1997).

Además, se han observado cambios en la expresión de los miembros de la familia GATA. Éstos comparten un mismo elemento *cis* en el DNA, al que se unen por medio de dos dedos de zinc (Molkentin, 2000). GATA-1, -2 y -3 se expresan fundamentalmente en células hematopoyéticas (Orkin, 1992), a diferencia de GATA-4, -5 y -6, que se expresan en la mayoría de los tejidos de origen endodérmico y mesodérmico, como el intestino, y están implicados en el desarrollo (Arceci *et al.*, 1993; Laverriere *et al.*, 1994; Ketola *et al.*, 2000; Fujikura *et al.*, 2002). Así, GATA-4 es considerado indispensable en el desarrollo del intestino y tejidos derivados del endodermo intestinal (Bossard and Zaret, 1998; Zaret, 1999; Shivdanasi, 2002). Estos factores pueden interaccionar con otros para regular la transcripción en el intestino: GATA-5 y HNF-1 activan los promotores de sacarasa-isomaltasa y lactasa (Krasinski *et al.*, 2001; van Wering *et al.*, 2002), mientras que GATA-4, HNF-1 y CDX2 regulan el promotor de la sacarasa-isomaltasa (Boudreau *et al.*, 2002).

El factor de transcripción *KLF4*, cuya expresión aumenta en las vellosidades, también está implicado en la regulación de la proliferación intestinal a través de su efecto en la ciclina D1 y *CDK1* (Shie *et al.*, 2000a-b).

INTRODUCCIÓN

Por otro lado, la expresión de TGF- β , factor de crecimiento que inhibe la proliferación en enterocitos y promueve la diferenciación (Kurokawa *et al.*, 1987), es mayor en la vellosidad (Jakowlew *et al.*, 1997; Penttila *et al.*, 1998), mientras que la de TGF- α se restringe a las criptas (Perez-Tomas *et al.*, 1993, 1994; Dvorak *et al.*, 1994, 1998; Dvorak and Koldovsky, 1994). El mRNA de la subunidad β_A de la activina, miembro de la superfamilia del TGF- β , se expresa más en las vellosidades que en las criptas del ileon de ratas, por lo que puede tener un papel en la terminación de la proliferación y el inicio y mantenimiento de la diferenciación de las células epiteliales intestinales (Sonoyama *et al.*, 2000).

- Genes implicados en el metabolismo: Diferentes estudios han demostrado que la expresión de la sacarasa-isomaltasa está restringida al compartimento diferenciado del eje cripta-vellosidad (Markowitz *et al.*, 1993; Traber, 1990; Traber *et al.*, 1992). Del mismo modo, la expresión de la fosfatasa alcalina se da en la vellosidad, al igual que otras proteínas implicadas en el metabolismo lipídico (Mariadason *et al.*, 2005).
- Genes relacionados con la detoxificación de xenobióticos: En el intestino delgado, el nivel de la expresión del gen *MDR1* (*multidrug resistance*) aumenta durante la proliferación a niveles proteico y de mensajero (Trezise *et al.*, 1992). La glicoproteína P (P-gp), codificada por este gen, se localiza en la zona de las microvellosidades donde media la extrusión de diferentes fármacos (Watkins, 1997). Esta proteína se encuentra en las vellosidades fundamentalmente (enterocitos diferenciados) pero no en las criptas.
- Genes implicados en el citoesqueleto: La villina es una proteína dependiente de calcio que se une a la actina y es el componente estructural principal de las microvellosidades. Se encuentra a altos niveles en las células diferenciadas de las vellosidades, y se encuentra a niveles muy bajos en las células indiferenciadas de las criptas. Además, es más abundante en el intestino delgado, mientras que sus

niveles disminuyen a lo largo del intestino grueso (Hodin *et al.*, 1997). Del mismo modo, los mRNA de otras proteínas relacionadas con el citoesqueleto tales como la gelsolina y la α -catenina se encuentran aumentados en las vellosidades (Mariadason *et al.*, 2005). La E-cadherina también se expresa diferencialmente y su presencia es más débil en las células del fondo de la cripta (Escaffit *et al.*, 2005b). Esta proteína forma parte de la familia de las cadherinas, moléculas de adhesión implicadas en la señalización celular, proliferación y diferenciación (Marrs and Nelson, 1996; Knudsen *et al.*, 1998). La expresión forzada de la E-cadherina en células HIEC dio lugar a la formación de uniones entre las células, pero no a la aparición de actividades de enzimas de microvellosidades, por lo que no es suficiente para desencadenar la diferenciación a enterocitos. Sin embargo, sí indujo un aumento en la sensibilidad a la muerte por anoikis (Escaffit *et al.*, 2005b).

- Genes relacionados con la replicación y reparación del DNA, así como otras tareas de la división celular: Usando *microarrays*, Mariadason *et al.* (2005) demostraron que los mRNA de las proteínas implicadas en la replicación del DNA y la progresión en el ciclo celular son más expresados en las criptas que en las vellosidades. La ciclina A, las quinasas dependientes de ciclinas 2 y 4 y el antígeno nuclear celular de proliferación (*PCNA*) se expresan fundamentalmente en las células de la cripta. En las vellosidades existe una disminución de la actividad de la ruta Wnt, con caída de los niveles de *myc*, ciclina D1, claudina 2 y *Ephb2*, y un aumento de *mad* y *max*. En el caso de la expresión de genes implicados en la apoptosis no se observan cambios en el eje cripta-vellosidad, por lo que parece ser que la pérdida de células en el intestino delgado se debe a mecanismos distintos de la inducción de apoptosis en las células (Mariadason *et al.*, 2005).
- Genes implicados en procesamiento, *splicing* y transporte de RNA y genes implicados en la traducción, procesamiento y tráfico de proteínas: También disminuye su expresión en las vellosidades. Así, se

INTRODUCCIÓN

observa una caída en los niveles de snRNP, hnRNP, factores de iniciación y elongación de la traducción, proteínas de choque térmico y componentes de las unidades grande (60S) y pequeña (40S) de los ribosomas (Mariadason *et al.*, 2005).

1.2.2.- Cambios en la expresión de genes durante la apoptosis y/o anoikis

Existen pocos estudios amplios que determinen los cambios que se producen en las células en respuesta a la inducción de apoptosis y aún menos en respuesta a la muerte por pérdida de sustrato. La mayoría de los estudios relacionados con la apoptosis y el intestino se refieren a los cambios en la expresión de los genes de las familias Bax y Bcl-2 durante la diferenciación o el desarrollo intestinales (Lyahyai *et al.*, 2005) y durante la implantación de enfermedades tales como el cáncer colorrectal (Paul-Samojedny *et al.*, 2005).

Sin embargo, diferentes estudios en células epiteliales intestinales y líneas celulares han permitido determinar algunos de los cambios existentes en las células intestinales cuando mueren. Cuando las células HT29 son tratadas con una enterotoxina de *Aeromonas hydrophila* existe un aumento en la expresión de diferentes genes implicados en el ciclo celular (*p21*, *jagged 1*), en la regulación de la apoptosis (*Mcl-1*, *TDAG51*) y de genes implicados en la remodelación de la matriz extracelular y de la propia estructura celular (actina, citoqueratina, *RND3*, *MMPI*) (Galindo *et al.*, 2005). Los cambios en la expresión de genes implicados en la apoptosis también fueron observados en mucosa intestinal sana y cancerosa tratada con radiación. La radiación produjo la aparición de apoptosis tanto en tejido sano como en el canceroso; sin embargo, el patrón de genes alterados fue diferente en las células cancerosas y en las sanas. En la mucosa sana se observaron cambios en la expresión de la caspasa 3, Fas y de genes de la familia Bax. En el caso de los tejidos cancerosos existía además un aumento en la expresión de genes de la superfamilia Ras (Nagtegaal *et al.*, 2005).

Boshuizen *et al.* (2003) determinaron los cambios en la expresión de genes implicados en el metabolismo intestinal ante la apoptosis inducida por la infección por rotavirus. En este estudio se encontró una disminución de las funciones

intestinales, con una represión de la expresión de la lactasa, el transportador de suero y glucosa SGLT1 y la proteína L-FABP, implicada en el transporte de ácidos grasos.

1.2.3.- Cambios en la expresión de genes durante la enfermedad

Existen diferentes genes para los que se han descrito cambios en su expresión entre la mucosa sana y la mucosa que sufre distintas enfermedades. En este punto sólo se pretende resumir aquellos genes cuya expresión parece variar en los enterocitos en enfermedades intestinales destacables por su prevalencia e importancia sanitaria como la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) y el cáncer colorrectal.

La enfermedad inflamatoria intestinal es el nombre común para una serie de desórdenes crónicos que causan la inflamación y ulceración de los intestinos grueso y delgado. Parece ser que su aparición depende de una interacción compleja entre variables ambientales como antígenos alimentarios y microbianos con susceptibilidad poligénica (Mannick *et al.*, 2004). La EII es una enfermedad crónica que suele recurrir varias veces a lo largo de la vida y se clasifica comúnmente como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. La colitis ulcerosa se asocia a una inflamación continua de la mucosa con abscesos en las criptas y ulceraciones, y se extiende desde el recto a una zona más proximal, mientras que en la enfermedad de Crohn el segmento intestinal más comúnmente afectado es el ileon, aunque esta también pueden verse afectados otros segmentos intestinales. En la enfermedad de Crohn se pueden producir fístulas, edemas y granulomas, y además la inflamación y daño tisular afecta a varias de las capas del intestino, no sólo la mucosa (Gassler *et al.*, 2001).

El cáncer es el crecimiento descontrolado de células anormales que han mutado de tejidos normales. El cáncer colorrectal se origina en el intestino grueso. Normalmente, el cáncer se origina en la capa más interna de las que forman la pared intestinal y puede crecer a través de algunas o todas las otras capas. Los cánceres del colon y el recto probablemente se desarrollen lentamente en un período de varios años. La mayoría de estos cánceres comienza como un pólipo, una masa de tejido que crece hacia el centro del colon o el recto. Los pólipos se

INTRODUCCIÓN

conocen también como *adenomas*. Extirpar tempranamente el pólipo puede evitar que se convierta en cáncer. Sin embargo, más del 95% de los tumores cancerosos del colon y el recto son *adenocarcinomas*. Éstos son tumores cancerosos de células que cubren la parte interna del colon y el recto.

Algunos de los genes para los que se han descrito cambios entre la mucosa sana y la mucosa enferma son:

- Genes relacionados con la matriz extracelular y el contacto celular: Se ha demostrado la existencia de diferencias en la expresión de las lamininas y las integrinas en enfermedades intestinales tales como la de Crohn, donde falta laminina-2 y aumentan las lamininas 5 y 10 en las criptas (Bouatrouss *et al.*, 2000), y la colitis ulcerosa, donde desaparecen las lamininas de las criptas (Schmehl *et al.*, 2000).

La presencia de N-cadherina dominante negativa en ratones quiméricos produce la ruptura de los contactos celulares dando lugar a una migración caótica hacia la vellosidad, perdiéndose la polarización y aumentando la apoptosis, fenómenos que recuerdan a los que existen en la enfermedad de Crohn (Hermiston and Gordon, 1995a-b). Además, la expresión alterada de la proteína E-cadherina ha sido asociada con pólipos colorrectales (Valizadeh *et al.*, 1997), cánceres colorrectales (Karatzas *et al.*, 1999) y enfermedad inflamatoria intestinal (Gassler *et al.*, 2001).

En el caso del cáncer colorrectal, se ha observado que la mucosa normal no presenta tenascina en las criptas. Sin embargo, en los adenocarcinomas colorrectales se observó una inducción en la cantidad de este elemento de la matriz extracelular (Riedl *et al.*, 1992).

Williams *et al.* (2003) observaron cambios en la expresión de otros elementos implicados en la adhesión a la matriz extracelular, como son integrinas, cadherinas y cadenas de lamininas. Estos datos confirmaban algunos de los previamente publicados por Kitahara *et al.* (2001). En este último estudio es destacable el aumento en la expresión de células

implicadas en la señalización de las integrinas, como es el caso del TGF- β 1.

- Genes implicados en vías de señalización celular: Diversos estudios han observado que la expresión de diferentes citoquinas y factores de crecimiento varía en la enfermedad inflamatoria intestinal. Así, IL-6, IL-10 e IFN- γ presentan mayores niveles a nivel de mensajero en la enfermedad inflamatoria intestinal activa, mientras que IL-2 sólo aumenta en la enfermedad de Crohn (Stevens *et al.*, 1992; Niessner and Volk, 1995). En cuanto a los factores de crecimiento, el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), mitógeno de células epiteliales, presenta niveles elevados en la mucosa inflamada de enfermos de enfermedad inflamatoria intestinal (Finch *et al.*, 1996). El TGF- β aumenta, al igual que el producto *intestinal trefoil factor*, cerca de las zonas de ulceraciones en enfermos de la enfermedad de Crohn. Ambos mediadores parecen estar implicados en la movilidad de los enterocitos en la restitución de la integridad de la mucosa intestinal tras una herida (Podolsky, 1991a-b). Zuo *et al.* (1997) también describieron los cambios en los patrones de citoquinas en la EII. Así, IL-10, IFN- γ , IL-6, el factor *monocyte-chemoattractant protein-1* (MCP-1) y KGF aumentan en la enfermedad inflamatoria intestinal, tanto en Crohn como en colitis ulcerosa, mientras que IL-2 sólo aumenta en enfermos de Crohn, y el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-R- β) y la interleuquina IL-1 β aumentan sólo en la colitis ulcerosa.

Las ciclooxigenasas (COX) parecen estar implicadas en la progresión del cáncer. COX1 es expresada constitutivamente mientras que COX2 es inducible (Vane *et al.*, 1998). Esta enzima puede participar en procesos de proliferación en células de cánceres gastrointestinales, incluidas Caco-2, y también en IEC-18 (Williams *et al.*, 1999; Tsuji *et al.*, 1996; Erickson *et al.*, 1999).

También existen cambios en la expresión de genes relacionados con vías de señalización intracelulares. Este es el caso del PSG9, miembro

INTRODUCCIÓN

de la familia del antígeno carcinoembrionario, implicado en la señalización de la vía Wnt, de gran importancia en la diferenciación y proliferación intestinales, y que se encuentra aumentado en los cánceres colorrectales (Salahshor *et al.*, 2005).

Asimismo existen cambios en la expresión de genes implicados en el ciclo celular como p16 (Gonzalez-Zulueta *et al.*, 1995) y p21 (Backert *et al.*, 1999).

Finalmente, se han hecho estudios con *microarrays* en el cáncer colorrectal. Williams *et al.* (2003) demostraron la existencia de cambios en la expresión de diversos oncogenes en las células cancerosas (GR01, vav-1, v-myc y v-mib), factores de transcripción (*RB protein B, nuclear transcription factor Y, forkhead box D1*) y diferentes vías de transducción de señales, como MAPK y Src. También se demostró la existencia de cambios en la expresión de genes implicados en apoptosis (TRAIL).

- Genes relacionados con el metabolismo: Okahara *et al.* (2005) determinaron que la expresión de la proteína L-FABP, implicada en el transporte de ácidos grasos (Pelsers *et al.*, 2003), variaba.

Greig *et al.* (2004) estudiaron la expresión de un canal de sodio no voltaje dependiente (Scnn1g) y de la Na⁺-K⁺-ATPasa. La colitis ulcerosa fue asociada con bajadas sustanciales en los niveles de expresión de las subunidades β y γ del canal. Los niveles de las isoformas $\alpha 1$ y $\beta 1$ de la ATPasa también eran menores en los intestinos de pacientes con colitis ulcerosa. Estos cambios en la absorción de sodio en el colon distal y recto de los pacientes de colitis ulcerosa producen la aparición de las diarreas asociadas a la colitis.

Además, se han observado cambios en el metabolismo del óxido nítrico, aumentando la expresión en células cancerosas de colon de un transportador de arginina (ATB (0,+)) y de la enzima iNOS (Gupta *et al.*, 2005). Otros genes sobreexpresados en cánceres colorrectales son wnt-2 (Vider *et al.*, 1996), CD44, (Woodman *et al.*, 1996) y FAK

(Weiner *et al.*, 1993). También existen cambios en la expresión de proteínas implicadas en el metabolismo de los aminoácidos (Williams *et al.*, 2003)

- Genes implicados en la respuesta inmune: En un estudio con *macroarrays*, Okahara *et al.* (2005) determinaron genes cuya expresión variaba en colitis ulcerosa. Algunos de ellos estaban asociados a neutrófilos y macrófagos. Sin embargo, otros son expresados por las células epiteliales. Esos genes son SAA1, que es una proteína reactiva aguda (Molmenti *et al.*, 1993; Vreugdenhil *et al.*, 1999), y la elafina, proteína con propiedades antimicrobianas (Pfundt *et al.*, 1996).

1.3.- La familia de GTPasas pequeñas Rho

1.3.1.- Introducción

Las pequeñas GTPasas (así llamadas para distinguirlas de las grandes proteínas G, heterotriméricas) de la superfamilia Ras actúan como interruptores moleculares que controlan muchas vías importantes en las células eucarióticas, acoplando la transducción de señales intracelulares a los cambios en el ambiente exterior. En general, pueden encontrarse en una forma activa unidas a GTP y en una forma inactiva unidas a GDP (Vetter and Wittinghofer, 2001). El paso entre una forma y otra se produce por una actividad GTPasa intrínseca que puede ser favorecida por la interacción con proteínas activadoras de la actividad GTPasa (GAPs, *GTPase activating proteins*). Para volver a la forma activa se debe sustituir el GDP por GTP, lo que es facilitado por la interacción con factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs, *guanine nucleotide exchange factors*). Un nivel adicional de regulación se da por la presencia de inhibidores de la disociación de GDP (GDIs, *GDP dissociation inhibitors*), que secuestran las proteínas unidas a GDP evitando que puedan activarse al cambiar el GDP por GTP (Sahai and Marshall, 2002) (Figura 7).

INTRODUCCIÓN

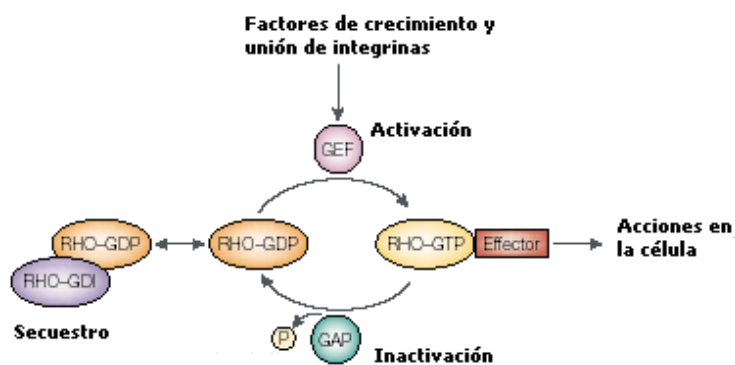


Figura 7.- Modelo de regulación de las proteínas Rho, extensible a la regulación de otras proteínas de la superfamilia Ras (Sahai and Marshall, 2002)

Las proteínas de la familia Rho forman parte de esa superfamilia, y son activadas tras la unión de las integrinas a proteínas de la matriz extracelular (Schlaepfer *et al.*, 1994; Clark *et al.*, 1998), lo que produce la activación de FAK y el reclutamiento de diferentes proteínas adaptadoras (Schlaepfer *et al.*, 1994; Levy *et al.*, 1998, 2003), dando lugar a diferentes efectos en la proliferación celular, la forma del citoesqueleto y actividades transcripcionales. Además, las proteínas Rho pueden regular la actividad de unión a proteínas de las integrinas a través de sus efectos en el citoesqueleto de actina (Howe and Juliano, 1998; Giancotti and Ruoslahti, 1999; Schoenwaelder and Burridge, 1999; Ku *et al.*, 1999), de modo que se ha demostrado que la actividad Rho regula positivamente la adhesión celular dependiente de integrinas (Chrzanowska-Wodnicka and Burridge, 1996; Amano *et al.*, 1997; Gout *et al.*, 2001). Estas proteínas juegan un importante papel en los reordenamientos celulares durante el desarrollo embrionario y la transformación oncogénica (Hall, 1998; Settleman, 2000; Van Aelst and D'Souza-Schorey, 1997). En el caso de la proteína RhoA se ha indicado su importancia en la progresión del ciclo celular, actuando como un represor de p21, que es un inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas, y un inductor de la ciclina D1 (Liberto *et al.*, 2002), y participando en la regulación de la apoptosis (Hippenstiel *et al.*, 2002; Aznar and Lacal, 2001).

Si dividimos las proteínas Rho en función de su secuencia y función, obtendremos un grupo similar a RhoA, otro similar a Cdc42 y Rac y otro formado por aquellas proteínas que carecen de actividad GTPasa (Sahai and Marshall, 2002). Este último grupo está presente en vertebrados y no en invertebrados (Riento *et al.*, 2005a) y está formado por RhoH, Rnd1, Rnd2 y Rnd3. Al carecer de actividad

GTPasa estas proteínas se encuentran constitutivamente unidas a GTP en las células (Foster *et al.*, 1996; Guasch *et al.*, 1998; Nobes *et al.*, 1998).

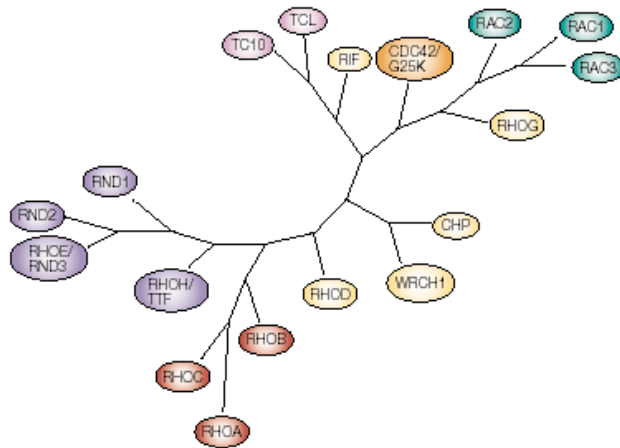


Figura 8.- Árbol filogenético de la familia Rho su según secuencia, función y propiedades bioquímicas (Sahai and Marshall, 2002).

1.3.2.- Estructura del gen *RND3* y actividad de la proteína Rnd3

El gen *RND3* (*Rho family GTPase 3*, también llamado *RhoE*, *Rho8* y *Arhe*, siendo este último el nombre que se emplea para el gen de rata) se encuentra en el ser humano en el cromosoma 2, en el brazo grande del cromosoma en la región 2q23.3, y ocupa algo más de 19000 pares de bases.

En la base de datos de *GeneBank* la secuencia de referencia del RNA mensajero se encuentra en el acceso NM005168. Tiene una longitud de 2683 bases, de las que 735 corresponden a la región codificante. Presenta una UTR 5' de 157 pb y una UTR 3' de 1792 bases.

La proteína Rnd3 consta de 244 aminoácidos y tiene 27,4 KDa de tamaño. Aunque tiene un 54 % de homología con RhoA, carece de actividad GTPasa y no se une a GDP (Foster *et al.*, 1996; Nobes *et al.*, 1998; Wennerberg *et al.*, 2003) debido a la falta de varios residuos implicados en la actividad GTPasa de Ras y RhoA. Versiones de Rnd3 mutadas en esos aminoácidos específicos le confieren actividad GTPasa (Nobes *et al.*, 1998). Rnd3 presenta tres motivos de unión a GTP, dos lazos y una treonina implicados en la unión de grupos fosfato y tres residuos que coordinan magnesio cuando la proteína está unida a GTP. La

INTRODUCCIÓN

proteína Rnd3 se encuentra ubicuamente distribuida aunque a niveles variables en diferentes tejidos (Nobes *et al.*, 1998). En cuanto a su localización celular, está presente en la fracción citosólica de las células aunque puede ser farnesilada a través de una secuencia de consenso caja CAAX y una metionina final, con lo que se uniría a la membrana plasmática o al aparato de Golgi (Guash *et al.*, 1998; Riento *et al.*, 2003).

1.3.3.- Expresión del gen *RND3*

El gen *RND3* se encuentra muy regulado a nivel transcripcional. Diversos estudios con microarrays han detectado cambios en la expresión de este gen en diferentes condiciones experimentales.

La expresión de *RND3* no cambia en respuesta a suero, como ocurre con *RhoA*, y su actividad no cambia por la presencia de C3 transferasa de *Clostridium botulinum*. Sin embargo, la expresión aumenta en respuesta al daño por cisplatino, por lo que se piensa que *RND3* podría estar implicado en los efectos en la progresión del ciclo celular inducidos por daños en el DNA (Villalonga *et al.*, 2004).

La expresión de *RND3* en células de próstata es reprimida por estradiol. Esta represión parece ser debida a un efecto antiapoptótico del estradiol en estas células, ya que también se reprime la expresión de la caspasa 1 y aumenta la del represor de la apoptosis *nucleolar protein 3 (NOL3)* (Bektic *et al.*, 2004). Recientemente se ha demostrado también la disminución de la expresión de *RND3* en la endometriosis, enfermedad en la que están implicados los estrógenos. Además se observa en las muestras de tejidos de endometriosis una inducción de dos proteínas implicadas en la prevención de la apoptosis: la serintreonín quinasa PIM-2 y la proteína relacionada con el factor de crecimiento similar a la insulina IGFBP-5 (Hu *et al.*, 2005). Finalmente, en relación con los efectos de los estrógenos en la expresión de la proteína Rnd3, también se ha observado que la expresión de *RND3* aumenta en el endometrio durante el embarazo a mediados del mismo, lo que se correlaciona con una disminución de la actividad de RhoA (Cario-Toumaniantz *et al.*, 2003).

Además se ha descubierto recientemente otra hormona que altera la expresión de *RND3*. Se trata de la tirotropina que, al ser administrada a células tiroideas de perro, produce una gran disminución en la expresión de este gen (Vandeput *et al.*, 2005).

La expresión de *RND3* ha sido demostrada en células de cáncer de colon tales como HT29 y SW480. Cuando estas células son tratadas con antiinflamatorios no esteroídicos presentan cambios en su forma y, en el caso de las HT29, aparecen vacuolas dentro de las células. Además, el análisis de las células demostraba la existencia de un pico sub-G1, indicador de la existencia de apoptosis. La presencia de los AINES en el medio produce también una inducción en la expresión de *RND3*, lo que, según los autores podría estar implicado en los cambios morfológicos que se observan en estas células (Akashi *et al.*, 2000).

1.3.4.- Función de Rnd3

Las proteínas del subgrupo Rnd actúan como antagonistas de RhoA. RhoA y otras proteínas de su subgrupo producen la polimerización de la actina, formando las llamadas fibras de estrés de actina en respuesta a diversos estímulos extracelulares, mientras que las proteínas Rnd favorecen la despolimerización de la actina y la transformación oncogénica de células (Guasch *et al.*, 1998; Nobes *et al.*, 1998). Este efecto favorece que las células se redondeen, de ahí el nombre *Rnd*, de *round* (Nobes *et al.*, 1998). Sin embargo, en el caso de células que no contienen fibras de estrés, como monocitos y macrófagos, estas proteínas inducen una redistribución de actina, lo que produce un cambio en la morfología de células (Guash *et al.*, 1998).

El antagonismo entre RhoA y las proteínas Rnd parece deberse a una competición por proteínas reguladoras y efectoras como p190-RhoGAP (Nobes and Hall, 1995; Wennerberg *et al.*, 2003), Socius (Katoh *et al.*, 2002) y ROCK1 (Riento *et al.*, 2003). Así, la actividad de Rnd3 inhibe la actividad de ROCK1, que es una de las proteínas de RhoA, pero a su vez ROCK1 puede fosforilar a Rnd3 impidiendo que se una a las membranas celulares y aumentando su estabilidad (Riento *et al.*, 2005b).

INTRODUCCIÓN

Existen diversos estudios que unen Rnd3 y la apoptosis. Por ejemplo, Nobes *et al.* (1998) indican que la pérdida de las fibras de estrés induce la pérdida de la adhesión célula-sustrato en fibroblastos. Esta pérdida de adhesión puede producir la inducción de la apoptosis en células normales, en tanto que en células tumorales la separación es necesaria para la migración, invasión y metástasis. Sin embargo, un estudio posterior (Bektic *et al.*, 2005), cuestiona esta explicación e indica que la apoptosis inducida por Rnd3 es independiente de los efectos en la adhesión celular, probablemente debido a la inhibición de la actividad RhoA (Hippenstiel *et al.*, 2002; Aznar and Lacal, 2001) y la parada del ciclo celular entre las fases G2 y M (Ueda *et al.*, 1999; Chen and Ioannou, 1999). De este modo, Rnd3 induce una disminución en la acumulación de la ciclina D1 (efecto que antagoniza el de RhoA) al disminuir la traducción de este mensajero (Villalonga *et al.*, 2004).

Además, las proteínas de este grupo también están implicadas en los reordenamientos celulares que se producen durante la embriogénesis. Así se ha descubierto que Rnd1 está implicado en la formación del eje secundario en embriones de *Xenopus laevis*, y la microinyección del mensajero durante la embriogénesis favorece una adhesión celular perturbada. Estos efectos son contrarrestados al inyectar el mensajero de RhoA (Wünnenberg-Stapleton *et al.*, 1999).

Finalmente, se ha observado la existencia de una implicación de Rnd3 en el cáncer. Aparte de que los cambios en la expresión favorecen la existencia de un fenotipo neoplásico se ha determinado que el nivel medio de Rnd3 disminuye en células de cánceres malignos de próstata, y éste parece ser un suceso temprano en la transformación celular. Además, la sobreexpresión de Rnd3 induce la parada en el ciclo celular en la fase G2/M y la muerte celular debido a una disminución de la expresión de la ciclina B1 y de CDC2 (Bektic *et al.*, 2005).

La inducción de niveles elevados de Rnd3 promueve la pérdida de la polaridad celular en células MDCK y favorece que esas células se dispongan en varias capas, aunque sin aumentar la división celular (Hansen *et al.*, 2000), fenómenos que se dan en muchos cánceres. En estas células, Rnd3 parece localizarse en las microvellosidades y podría estar implicado en el mantenimiento de esas estructuras (Foster *et al.*, 1996).

1.4.- Modelos de diferenciación y apoptosis de células intestinales

En la literatura se observan dos tipos fundamentales de muerte celular en células de mamífero, la apoptosis o muerte celular programada y la oncosis o necrosis (Ma *et al.*, 2001; Mills *et al.*, 2002). La apoptosis implica la activación de proteasas específicas, formación de burbujas en la membrana, condensación de la cromatina nuclear y ruptura del DNA en fragmentos de tamaño de múltiplos de 200 pb (Hockenbery, 1995; Steller, 1995). Algunas veces también está implicada la liberación del citocromo c de la mitocondria para activar a las caspasas (Li *et al.*, 1997; Nakagawa *et al.*, 2001). Los fragmentos celulares producidos pueden ser fácilmente fagocitados sin generar inflamación (Martin and Cotter, 1990; Steller, 1995). Esta forma de muerte celular juega un papel importante en la homeostasis y desarrollo tisular, manteniendo un número correcto de células en el cuerpo (Martins and Earnshaw, 1997). En el caso de la muerte celular programada que existe en el intestino, las células pueden ser extruidas al lumen o fagocitadas por las células de alrededor. Este fenómeno puede darse tanto en las criptas como en las vellosidades (Scheving *et al.*, 1998). En el caso de las células epiteliales intestinales en la región de las vellosidades la apoptosis parece darse por anoikis y es favorecida por la configuración de la membrana basal, la expresión de TGF- β y el patrón de expresión de integrinas (Potten and Allen, 1977; Frisch and Francis, 1994; Beaulieu, 1992; Probstmeier *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1995).

A diferencia de la apoptosis, la necrosis es una muerte “accidental” que se da cuando las células son sometidas a agresiones extremas (Martin and Cotter, 1990; Steller, 1995). La necrosis se acompaña de degradación del DNA al azar con daño de membrana significativo e hinchazón de la célula y los orgánulos, a veces con formación de burbujas en la membrana (Matsubara *et al.*, 1994; Matsumura *et al.*, 2000). Este proceso es altamente proinflamatorio (Steller, 1995).

Debido a la falta de modelos de células intestinales epiteliales humanas normales, mucho de lo conocido sobre regulación intestinal celular deriva de estudios en líneas celulares humanas de cáncer de colon o generadas en animales de experimentación. Los modelos que se emplean pueden dividirse en :

INTRODUCCIÓN

1.- Cultivos celulares generados en animales experimentales (Evans *et al.*, 1994; Kedinger *et al.*, 1987; Quaroni and May, 1980).

2.- Líneas establecidas a partir de cánceres de colon humanos (Menard and Beaulieu, 1994; Moyer *et al.*, 1990; Rousset, 1986; Whitehead and Watson, 1997; Zweibaum and Chantret, 1989).

3.- Cultivos establecidos a partir de intestino humano normal, que son poco usados y pueden subdividirse en:

1.1.- Líneas celulares intestinales con características típicas de células proliferantes de la cripta aún no comprometidas.

1.2.- Líneas celulares intestinales condicionalmente inmortalizadas que pueden ser inducidas a la diferenciación.

1.3.- Cultivos primarios de células diferenciadas de las vellosidades que pueden ser mantenidas en cultivo hasta diez días.

1.4.1.- Cultivos celulares generados en animales experimentales

IEC-6 (ATCC CRL-1592)

La línea celular IEC-6 consiste en una población homogénea de células epitelioides con un núcleo oval y grande. Sus colonias están compuestas de células poligonales que crecen opuestas entre sí. Presentan escasas microvellosidades al microscopio electrónico. Esas microvellosidades tienden a encontrarse cerca del núcleo. También pueden formar pseudópodos que contactan con las células cercanas, formando contactos intercelulares. Las células en cultivo son aplanadas y presentan características de células indiferenciadas de las criptas sin una morfología diferenciada ni expresión de genes propios de la diferenciación (Quaroni *et al.*, 1979; Quarony and May 1980). No expresan ni Cdx1 ni Cdx2 (Suh and Traber, 1996).

Se diferencian bajo determinadas condiciones como la exposición a una matriz extracelular llamada Matrigel (Carroll *et al.*, 1988), en presencia de determinados

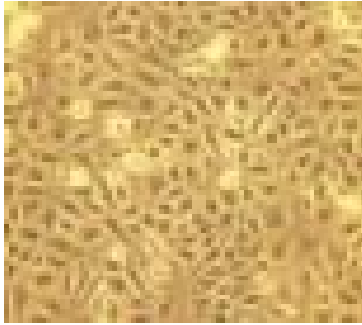


Figura 9.- Células IEC-6 indiferenciadas crecidas sobre un soporte de plástico.

factores de crecimiento (Kurokawa *et al.*, 1987) o cuando se les induce una expresión forzada de Cdx2 (Suh and Traber, 1996).

Cuando las células IEC-6 crecen sobre Matrigel se expanden y migran en la superficie formando complejos multicelulares tubulares, se inhibe su proliferación y se diferencian alcanzando características ultraestructurales de diferenciación.

Esta diferenciación se da más rápidamente sobre esta matriz compleja que sobre elementos aislados de la misma, como la laminina y el colágeno IV (Wolpert *et al.*, 1996; Hahn *et al.*, 1990). El crecimiento sobre Matrigel conlleva también un aumento en la apoptosis de estas células (Sterling and Cutroneo, 2002).

IEC-18 (ATCC CRL-1589)

Estas células también son indiferenciadas y proceden de la cripta ileal. Presentan morfología y ultraestructura similar a la de las células IEC-6, así como un cariotipo diploide de rata y tasas de crecimiento similares. Además presentan unos antígenos similares a los de las células IEC-6 (Quaroni and Isselbacher, 1981).

Sin embargo estas células son más resistentes a la falta de suero en el medio. Algunos autores (Gordon *et al.*, 2005) han indicado la existencia de un proceso espontáneo de diferenciación en estas células que lleva a la aparición de células neuroendocrinas, de Paneth y caliciformes.

Las células IEC-18 pueden sufrir también un proceso de diferenciación al ser crecidas sobre Matrigel (Benya *et al.*, 1993) o en presencia de factores presentes en un extracto ácido de intestino de rata adulta (Shintani *et al.*, 1989).

Su apoptosis puede ser inducida mediante la incubación con metabolitos activos de AINEs (Piazza *et al.*, 1995).

1.4.2.- Líneas establecidas a partir de cánceres de colon humanos

Durante más de dos décadas las líneas establecidas a partir de cánceres de colon humanos han sido modelos útiles para ayudar a comprender mejor las bases biológicas y moleculares del cáncer de colon (Hague *et al.*, 1997; Rutzky and Moyer, 1990). De entre las más de 100 líneas celulares establecidas, sólo unas pocas (HT29, HRA-19, T84 y LIM1963) presentan características morfológicas o bioquímicas asociadas al intestino delgado humano (Kirkland, 1986; Madara *et al.*, 1987; Pinto *et al.*, 1982; Whitehead *et al.*, 1987). Sólo una, Caco-2 (Fogh *et al.*, 1977; Chantret *et al.*, 1988), se diferencia espontáneamente de un modo similar a los enterocitos.

Caco-2 (ATCC HTB-37)

Normalmente estas células crecen como una monocapa de células indiferenciadas, pero cuando alcanzan la confluencia y se mantienen durante 20-40 días de cultivo postconfluente llegan a adquirir una polarización morfológica completa con complejos de unión y un borde típico en cepillo, así como altos niveles de hidrolasas de borde en cepillo, incluida la sacarasa-isomaltasa (Boulenc *et al.*, 1992; Beaulieu and Quaroni, 1991; Hauri *et al.*, 1985; Pinto *et al.*, 1983; Vachon and Beaulieu, 1992). Algunos autores interpretan que estas células presentan características similares a las del epitelio del intestino fetal humano, que antes de las semanas 20-22 es similar tanto en el colon como en el intestino delgado (Menard and Beaulieu, 1994; Rousset, 1986; Zweibaum and Chantret, 1989).

Estas células han probado ser un excelente modelo para estudiar la diferenciación celular (Mariadason *et al.*, 2002), así como sus mecanismos reguladores: sitios de control transcripcional y postranscripcional (Beaulieu *et al.*, 1989; Chantret *et al.*, 1994; Quaroni *et al.*, 1993; Sebastio *et al.*, 1987), dependencia en la actividad MAPK (Aliaga *et al.*, 1999), influencia moduladora de factores de crecimiento (Beaulieu and Quaroni, 1991; Cross and Quaroni, 1991; Zhou *et al.*, 1998) e interacciones entre la matriz y la célula (De Arcangelis *et al.*, 1996; Vachon and Beaulieu, 1995; Vachon *et al.*, 1995; Levy *et al.*, 1998, 2003; Liu *et al.*, 1998) y entre las diferentes células a través de cadherinas y cateninas (Laprise *et al.*, 2004;

Mariadason *et al.*, 2001). Además presentan un repertorio de integrinas similar al de células primarias de intestino humano (Koretz *et al.*, 1991), con niveles altos de integrinas $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha 2\beta 1$ y menores de $\alpha 3\beta 1$ y $\alpha 6\beta 1$ (Basson *et al.*, 1992; Ebert, 1996; Zhang *et al.*, 2003). Sin embargo presentan un inconveniente: una gran heterogeneidad en las características de su diferenciación, es decir, en estas células la expresión de la mayoría de las enzimas de borde de cepillo, la morfología y la organización del borde de cepillo varían mucho de célula a célula en la monocapa durante los primeros 20 días de cultivo postconfluyente (Vachon and Beaulieu, 1992; Vachon *et al.*, 1996; Mariadason *et al.*, 2000).

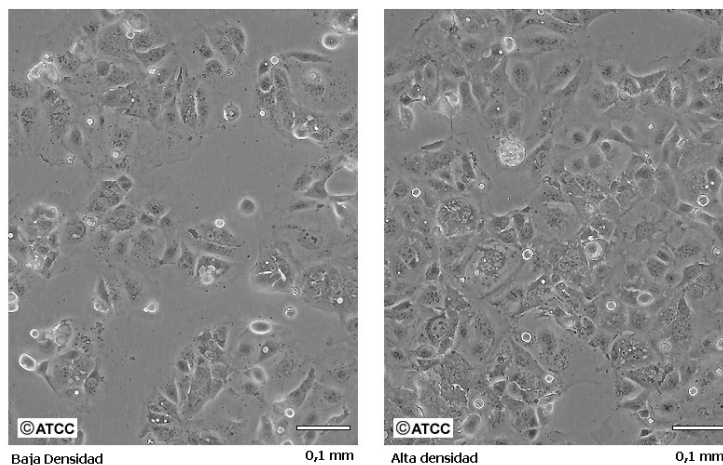


Figura 10.- Células Caco-2 indiferenciadas crecidas a baja y alta confluencia.

Se ha demostrado que la presencia de butirato sódico a concentraciones fisiológicas en las Caco-2 inhibe la proliferación e induce diferenciación y apoptosis (Dzierzewicz *et al.*, 2002; Ruemmele *et al.*, 2003). El ácido butírico es un ácido graso de cadena corta que se encuentra en el colon humano fisiológicamente como consecuencia de la fermentación anaeróbica de carbohidratos presentes en el lumen (Wolin, 1994; Velazquez *et al.*, 1996) y es la fuente preferida de energía de las células del colon, además de ser un agente diferenciador que actúa hiperacetilando las histonas al inhibir las desacetilasas de las histonas (Prasad, 1980; Dzierzewicz *et al.*, 1999; Basson *et al.*, 1996b; Gamet *et al.*, 1992; Heerdt *et al.*, 1994; Giuliano *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 1995) e inducir cambios en la membrana celular, el citoesqueleto (Hassig *et al.*, 1997), el ciclo celular (Schwartz *et al.*, 1998; Nakano *et al.*, 1997) y la transcripción de varios genes (Barshishat *et al.*, 2000; Tabuchi *et al.*, 2002). La presencia de butirato

INTRODUCCIÓN

sódico en las células Caco-2 promueve la aparición de actividad de fosfatasa alcalina y sacarasa-isomaltasa, entre otras enzimas de borde de cepillo, mientras que disminuye la expresión de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\beta 1$ de las integrinas, lo que disminuye la adhesividad de estas células al sustrato (Basson *et al.*, 1996b; Levy *et al.*, 2003). La disminución de la integrina $\beta 1$ lleva a una disminución de la actividad de la vía de FAK, lo que puede influir también en la disrupción de señales promotoras de la supervivencia, favoreciendo de este modo la muerte celular (Frisch *et al.*, 1996; Levy *et al.*, 2003). El butirato también produce la activación de las caspasas 1, 3 y 9, la translocación del citocromo c de la mitocondria al citosol y una disminución de Bcl-2, junto con un aumento de Bax y Bak, lo que lleva a la apoptosis. Esa apoptosis se observa por el aumento en la cantidad de células apoptóticas que se separan del sustrato y aparecen en el medio (Litvak *et al.*, 1998; Levy *et al.*, 2003; Ruemmele *et al.*, 2003; Avivi-Green *et al.*, 2002).

Otra forma de inducir la diferenciación en estas células es crecerlas sobre Matrigel (Sterling and Cutroneo, 2002). Al estudiar los componentes responsables se observa que se induce la expresión de sacarasa-isomaltasa y fosfatasa alcalina y disminuye la proliferación en presencia de colágeno IV y laminina, ambos componentes de la matriz extracelular (Basson *et al.*, 1996a). Sin embargo, ni el EGF ni el TGF- β , también componentes del Matrigel, producen diferenciación en estas células (Zhang *et al.*, 2003). El crecimiento sobre Matrigel conlleva también un aumento en la apoptosis de estas células (Sterling and Cutroneo, 2002), lo que está de acuerdo con la teoría según la cual el propio proceso de diferenciación enterocítica terminal conlleva la apoptosis (Heerdt *et al.*, 1994; Litvak *et al.*, 1998). Es interesante destacar que las células Caco-2 depositan laminina-1 conforme se van diferenciando y que el empleo de un RNA antisentido de la cadena $\alpha 1$ de la laminina impide esta deposición y la diferenciación de las células Caco-2 (De Arcangelis *et al.*, 1996).

Entre los métodos para producir la apoptosis de las células Caco-2 están los que emplean toxinas que afectan al intestino, como la enterotoxina de *Clostridium perfringens* (Chakrabarti *et al.*, 2003) y las toxinas A y B de *Clostridium difficile*. Es interesante señalar que en el caso de estas dos últimas toxinas la muerte celular

se produce como consecuencia de la inhibición de la adhesión celular y pérdida de sustrato, efecto debido a la inhibición de la proteína RhoA (Mahida *et al.*, 1996; Fiorentini *et al.*, 1998). De este modo observamos que la pérdida de sustrato induce la muerte celular programada (Ruoslahti, 1997), mientras que la adhesión a una matriz extracelular permite a las células volver a la vía de la supervivencia (Meredith and Schwartz, 1997; Gauthier *et al.*, 2001).

HT29 (ATCC HTB-38)

Estas células son derivadas de un adenocarcinoma de colon humano y presentan características asociadas al intestino delgado humano. Cuando son crecidas en condiciones estándar forman una multicapa de células no polarizadas indiferenciadas. Los cultivos confluentes de estas células se mantienen indiferenciados (Pinto *et al.*, 1983; Zweibaum *et al.*, 1985). Estas células expresan las integrinas $\alpha6\beta4$, $\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$ y $\alpha3\beta1$ (Simon-Assmann *et al.*, 1994; Ebert, 1996).

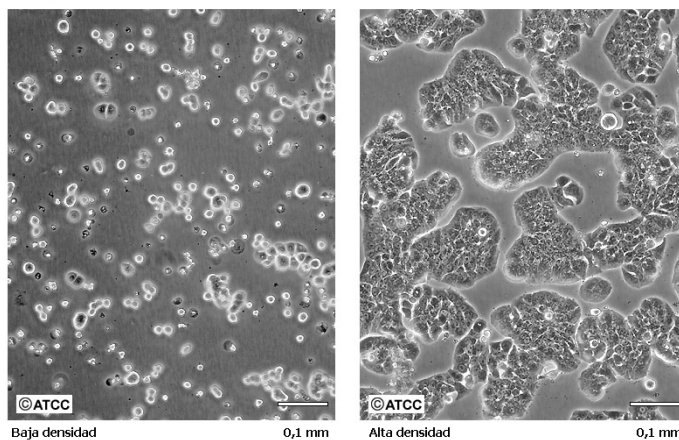


Figura 11.- Células HT29 indiferenciadas crecidas a baja y alta confluencia.

Las células HT29 pueden ser tratadas con diferentes inductores o cultivadas usando diferentes métodos para obtener diversos tipos de enterocitos diferenciados, aunque también presentan el problema de la producción de clones diferentes (Lesuffleur *et al.*, 1993). Cuando se diferencian adquieren un fenotipo más aplastado, apareciendo microvellosidades y uniones entre las células.

El tratamiento de las células HT29 con fármacos anticancerosos como el 5-fluorouracilo o el metotrexato da lugar a clones que se diferencian en diversos

INTRODUCCIÓN

fenotipos. En confluencia, las células tratadas con metotrexato son secretoras de mucus, presentan bordes apicales en cepillo y expresan villina y dipeptidilpeptidasa IV. Las células tratadas con 5-fluorouracilo forman una población mezclada de células polarizadas que transportan fluidos y células caliciformes (Lesuffleur *et al.*, 1990, 1991).

El butirato y el propionato también inhiben la proliferación de estas células (Darcy-Vrillon *et al.*, 1993) y favorecen su diferenciación, dando lugar a células secretoras de mucus y células que presentan transporte transepitelial (Augeron and Laboisse, 1984; Gamet *et al.*, 1992), aunque el butirato también produce apoptosis, aunque en menor grado que en las células Caco-2 (Heerdt *et al.*, 1994; Sonoyama *et al.*, 2003).

Además, el tratamiento de las células con forskolina, agente que activa la adenilato ciclasa, tras un periodo de confluencia de 21 días, da lugar a la aparición de microvellosidades y uniones entre las células, además de inducir el gen MUC2, marcador de las células caliciformes (Ophir *et al.*, 1995; Velcich *et al.*, 1995).

Por otro lado, el tratamiento con un agente que disgrega los filamentos de actina, como la colchicina o el taxol, también genera células con una morfología polarizada. Además aparecen células redondeadas que sufren apoptosis y se encuentran separadas del sustrato (Cohen *et al.*, 1999). Estos efectos parecen deberse a la activación de las vías de Junk y Ras (Wang *et al.*, 1998).

Finalmente, el cultivo de las células HT29 en un medio sin glucosa como fuente de energía también induce su diferenciación (Pinto *et al.*, 1982; Pringault *et al.*, 1986; Zweibaum *et al.*, 1985). Cuando las células HT29 se cultivan en un medio con glucosa se parecen a las células de la cripta, cuando se cultivan en presencia de galactosa o inosina en vez de glucosa se parecen a las células que empiezan a diferenciarse en la mitad superior de la cripta, y cuando se crecen en medio con galactosa o inosina y se mantienen confluentes adquieren características de enterocitos diferenciados (Huet *et al.*, 1987; Gout *et al.*, 2001).

La inducción de la apoptosis de estas células se puede hacer de diferentes formas. Cuando las células HT29 son cultivadas en suspensión, en un proceso que es similar al que lleva a la muerte por anoikis, entran en apoptosis y mueren

rápidamente, de un modo que puede ser también conseguido al inhibir la actividad de las integrinas de la familia $\beta 1$ usando anticuerpos. La restitución de la señalización a través de la vía de Akt1 permite recuperar la supervivencia de las células HT29 sometidas a esos tratamientos (Dufour *et al.*, 2004).

Además, el tratamiento de las células HT29 con un anticuerpo que active el receptor Fas o con TNF- α también induce la muerte por apoptosis de estas células, al igual que en otros muchos tipos celulares (Abreu-Martin *et al.*, 1995).

1.4.3.- Cultivos establecidos a partir de intestino humano normal

HIEC

Se trata de una línea de células intestinales humanas cuya caracterización morfológica y funcional ha demostrado que son comparables a las células indiferenciadas de las criptas (Perreault and Beaulieu, 1996). Expresan queratinas típicas de intestino, los marcadores específicos de células de la cripta de 350-kD y MIM-1/39 (Beaulieu *et al.*, 1992; Calvert *et al.*, 1993), la aminopeptidasa N y la dipeptidasa IV, pero no expresan la sacarasa-isomaltasa (Perreault and Beaulieu, 1996) a niveles proteico y transcripcional (Quaroni and Beaulieu, 1997). Además presentan rasgos morfológicos de poca diferenciación enterocítica.

El crecimiento de estas células en un sustrato de laminina-1 no aumenta ni la diferenciación morfológica ni enzimática, aunque su adhesión y extensión parecen ser dependientes de integrinas (Pageot *et al.*, 2000).

Estas células han sido utilizadas para analizar la regulación de la proliferación celular (Perreault and Beaulieu, 1996; Ruemmele *et al.*, 1998), la apoptosis inducida por FAS (Ruemmele *et al.*, 1999), la base funcional de las interacciones entre célula y matriz (Basora *et al.*, 1999; Desloges *et al.*, 1998; Simoneau *et al.*, 1998) y el metabolismo lipídico (Levy *et al.*, 2000).

tsFHI

Existe una línea celular de rata fetal en estadios iniciales de desarrollo condicionalmente inmortalizada con un mutante sensible a la temperatura del

INTRODUCCIÓN

antígeno T del SV40 de modo que crece a 32 °C pero pierde la actividad proliferante y revierte a un fenotipo normal cuando pasa a una temperatura no permisiva de 39 °C (Paul *et al.*, 1993). El método desarrollado por Paul fue adaptado para una línea de intestino fetal humano (Quaroni and Beaulieu, 1997).

Cuando están indiferenciadas estas células presentan las principales queratinas intestinales, aminopeptidasa N y dipeptidilpeptidasa IV, así como el marcador intestinal MIM-1/39. Tienen forma plana. A la temperatura no permisiva sufren cambios funcionales y morfológicos consistentes con la adquisición de un fenotipo más diferenciado: rápida, completa e irreversible parada del crecimiento con fuerte inducción del inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas p21^{Waf/Cip1}, forma más regular y poligonal, redistribución de las proteínas del complejo de unión a los contactos célula-célula, aparición de una densa capa de microvellosidades, aumento en la expresión de aminopeptidasa N y dipeptidilpeptidasa IV e inducción de la expresión de la sacarasa-isomaltasa, todo lo cual es comparable al proceso que tiene lugar *in vivo* en las criptas intestinales (Quaroni and Beaulieu, 1997).

PCDE

Debido a su estado no proliferante, los enterocitos normales diferenciados sólo pueden ser mantenidos *in vitro* como cultivos primarios. Usando en intestino Matrisperse y plaqueando las fracciones epiteliales en placas de cultivo cubiertas con colágeno de la cola de la rata, se obtienen las células PCDE, que rápidamente se extienden por el sustrato hasta que se alcanza la confluencia, pero sin proliferar. Son células absorptivas y caliciformes, con las queratinas típicas del intestino, uniones entre células, borde en cepillo, actividades dipeptidilpeptidasa IV, aminopeptidasa N y sacarasa-isomaltasa, y pueden o no expresar MIM-1/39 (Perreault *et al.*, 1998; Perreault and Beaulieu, 1998). Al tratarse de un cultivo primario, sólo pueden mantenerse 10-12 días antes de que empiecen a morir.

2.- OBJETIVOS

El **objetivo general** de esta Tesis ha sido el estudio de la regulación de la expresión del gen *RND3/Arhe* en enterocitos. Para realizar este objetivo, el trabajo se ha articulado en torno a los siguientes **objetivos específicos**:

- 1.- Estudiar los cambios en la expresión de *Arhe* durante el proceso de diferenciación de las células IEC-6.
- 2.- Determinar la influencia de la adición de nucleósidos exógenos al medio en el proceso de diferenciación de las células IEC-6 y la expresión de *Arhe*.
- 3.- Estudiar la regulación de la expresión del gen *Arhe* por los diferentes elementos constituyentes del Matrigel.
- 4.- Determinar la expresión de genes de la familia Ras en respuesta a la confluencia en enterocitos.
- 5.- Estudiar la regulación de la expresión del gen *RND3* por anoikis.
- 6.- Identificar y caracterizar la región promotora del gen *RND3*.
- 7.- Caracterizar la ruta de señalización implicada en la regulación de la expresión del gen *RND3*.

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- Materiales

3.1.1.- Bacterias

Para los procesos de transformación y expansión de clones se empleó la cepa de bacterias *Escherichia coli* XL1-Blue, que es resistente a tetraciclina. Las principales características del genotipo de esta cepa bacteriana son: F' Tn10 *proA*⁺*B*⁺ *lacI*^q Δ (*lacZ*) M15/*recA1 endA1 gyrA96*(Nal^r) *thi hsdR17* (*r*_k⁻ *m*_k⁻) *supE44 relA1 lac* (Bullock *et al.*, 1987).

3.1.2.- Plásmidos

pGEM-T

Para la clonación de fragmentos de DNA y su envío para secuenciar se utilizaron los vectores pGEM-T y pGEM-T-Easy, ambos de Promega (Promega Biotech Ibérica, SL, España).

Los vectores comerciales están linealizados y poseen en sus extremos 5' una timina desapareada. Esto permite la clonación de fragmentos de PCR producidos con la *Taq* polimerasa ya que esta enzima agrega una adenina en las reacciones de amplificación.

Estos vectores confieren resistencia a ampicilina y permite la selección por α complementación. Además incluyen las secuencias promotoras de los fagos T7 y SP6 a los lados del sitio de clonación múltiple, lo que permite la secuenciación de los fragmentos clonados.

MATERIALES Y MÉTODOS

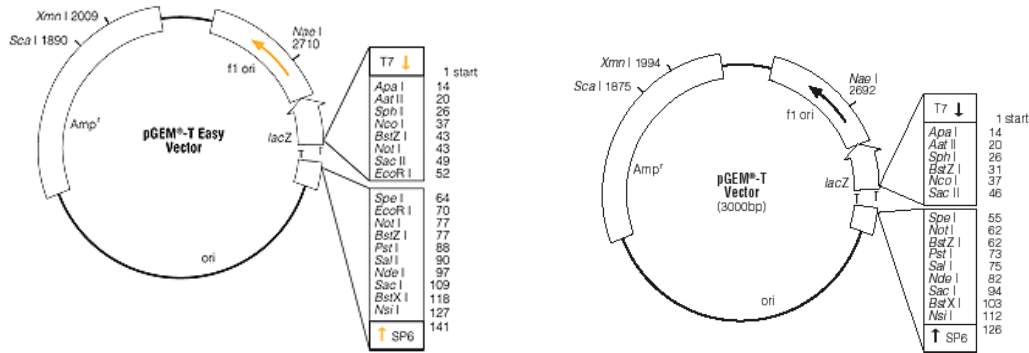


Figura 12.- Esquemas de los vectores pGEM-T y pGEM-T-Easy donde se indican sus principales características, así como los sitios de corte únicos del sitio de clonación múltiple.

pDsRed-Express-1

El vector pDsRed-Express-1 (Clontech, Becton Dickinson, España) codifica una variante de la proteína roja fluorescente de *Discosoma sp.* llamada DsRed-Express-1, que presenta mejores características de solubilidad y emisión de fluorescencia, con un máximo de excitación a 557 nm y un máximo de emisión a 579 nm, y puede ser usado como un *reporter in vivo* de la expresión de genes.

Eso es debido a que pDsRed-Express-1 es un vector que carece de promotor y puede ser usado para monitorizar la transcripción de diferentes promotores y combinaciones promotor-potenciador insertadas en el sitio de clonación múltiple.

Este vector presenta el gen *neo^r* (*aminoglycoside phosphotransferase*) que confiere resistencia frente a aminoglucósidos como kanamicina, neomicina y geneticina, lo que permite establecer clones estables en células eucariotas.

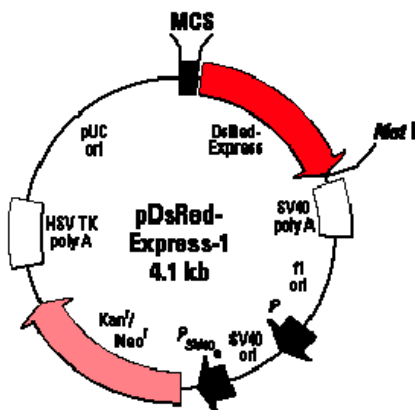


Figura 13.- Esquema del vector pDsRed-Express-1 donde se indican sus principales características, así como los sitios de corte únicos.

Vectores de la familia pGL3 (*pGL3 Luciferase Reporter Vectors*)

Los vectores de la familia pGL3 (Promega) contienen el cDNA de la luciferasa de la luciérnaga (*Photinus pyralis*) y permiten el análisis de factores que pueden regular potencialmente la expresión de genes en mamíferos. Esos factores pueden ser *cis*, como promotores o regiones potenciadoras (*enhancers*), o *trans*, como diversos factores de transcripción. Los cambios en la actividad de la luciferasa se correlacionan directamente con la actividad transcripcional de los fragmentos reguladores clonados cuando es expresada en células transfectadas.

Los vectores empleados en nuestros experimentos fueron pGL3-Basic, que carece de promotor y permite la inserción de una posible región promotora, y pGL3-Control, que contiene el promotor del virus SV40 y una región potenciadora, lo que produce la expresión de la luciferasa de la luciérnaga y sirve como estándar para las actividades de los pGL3 recombinantes obtenidos al introducir el DNA de interés.

Como control para normalizar la eficiencia de la transfección se empleó el vector pRL-TK (Promega) que codifica la luciferasa de *Renilla reniformis* controlada por el promotor de la timidina quinasa del virus del *Herpes simplex* (HSV-TK). Esta luciferasa puede ser medida de forma independiente a la luciferasa de la luciérnaga. Esto permite normalizar la eficiencia de la transfección al medir independiente y secuencialmente las actividades de ambas luciferasas en un mismo extracto celular.

MATERIALES Y MÉTODOS

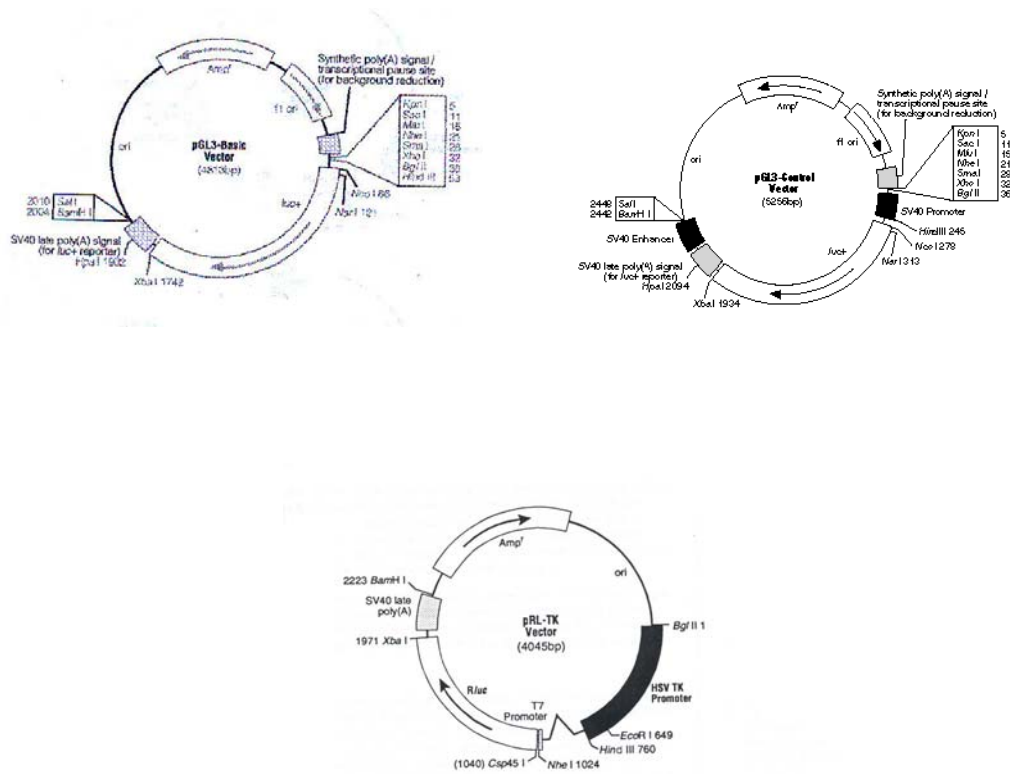


Figura 14.- Esquemas de los vectores pGL3-Basic, pGL3-Control y pRL-TK donde se indican sus principales características, así como los sitios de corte únicos del sitio de clonación múltiple.

3.1.3.- Animales

Se emplearon ratas Wistar suministradas por el Servicio de Animales de la Universidad de Granada. Los animales fueron mantenidos en jaulas en una habitación termostatzada y con iluminación de 8 a 20 horas. Las ratas tenían acceso a la comida y la bebida *ad libitum*. Antes de su sacrificio, fueron mantenidas en ayunas durante 24 horas. Los animales fueron anestesiados con éter dietílico antes de su sacrificio.

3.1.4.- Líneas celulares

Las líneas celulares empleadas durante esta Tesis fueron aportadas por los servicios técnicos de la Universidad a partir de la ATCC (*American Type Culture Collection*, LGC Promochem, Inglaterra). Se emplearon las líneas celulares

derivadas de cripta de íleon de rata IEC-6 e IEC-18 y las líneas celulares humanas derivadas de carcinomas de colon Caco-2 y HT29 (descritas con detalle en la Introducción).

La línea celular MCF7 (ATCC HTB-22) deriva de un adenocarcinoma de mama humano y es epitelial. Retiene algunas características de diferenciación y fue empleada en nuestros experimentos para comprobar si el fenómeno de anoikis y cambio en la expresión de Rnd3 se daba sólo en células intestinales o también en otros tipos de líneas celulares epiteliales.

La línea celular MG63 (CRL-1427) deriva de un osteosarcoma humano. Se trata de células adherentes con características de fibroblastos. El empleo de esta línea celular nos permitió estudiar si el fenómeno de muerte por suspensión y los cambios asociados en la expresión de Rnd3 se mantienen en tipos celulares diferentes a las células epiteliales.

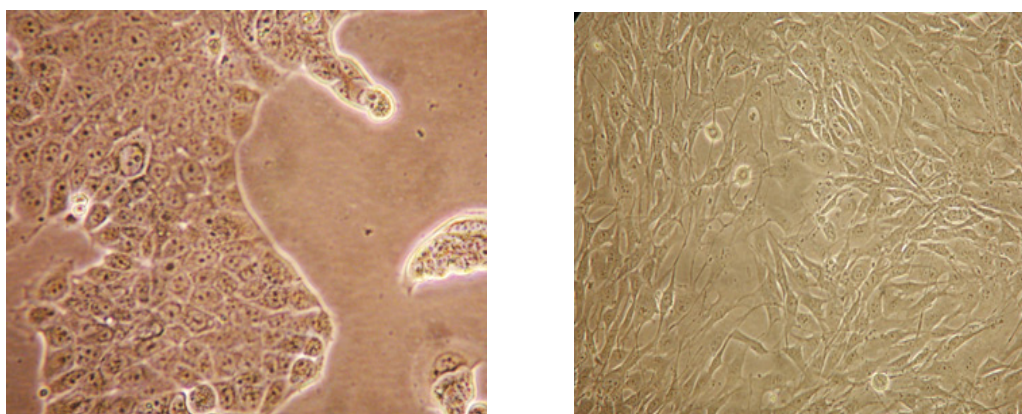


Figura 15.- Fotografía al microscopio óptico (ampliación 20x) de células MCF-7 (izquierda) y MG-63 (derecha).

3.1.5.- Anticuerpos

Los anticuerpos empleados en esta Tesis han sido:

Anticuerpo STAR9B, de Serotec (Bionova Científica, España), como secundario conjugado a fluoresceína para la detección del anticuerpo primario.

MATERIALES Y MÉTODOS

Anticuerpo Anti-RhoE/Rnd3, clone 4, de Upstate (Reactiva S.A., España), como anticuerpo monoclonal primario para la detección de la proteína Rnd3 en las células humanas.

Anticuerpo sc-1946, de Santa Cruz Biotechnology (EEUU), como anticuerpo policlonal primario para la detección de la proteína Arhe en células de rata.

3.1.6.- Enzimas

Las enzimas utilizadas en esta Tesis han sido:

DNA polimerasa: Biotools DNA polymerase (recombinante de *Thermus*), Biotools (España).

AmpliTaq Gold DNA polymerase, de Applied Biosystems (España).

Transcriptasa inversa: Superscript II Reverse Transcriptase, de Invitrogen (Invitrogen, S.A., España).

DNasa: Turbo DNase, de Ambion (Bionova Científica, España).

Enzimas de restricción: en su mayoría fueron de New England Biolabs (Izasa S.A., España).

Fosfatasa: Shrimp Alkaline Phosphatase, de USB Corporation (GE Healthcare Bio-Sciences, España).

Ligasa: T4 DNA Ligase, de New England Biolabs (Izasa S.A., España).

Quinasa: T4 Polynucleotide Kinase, de New England Biolabs (Izasa, S.A., España).

3.1.7.- Productos químicos

Los reactivos químicos generales empleados fueron de las casas Merck (VWR International Eurolab S.L., España), Sigma y Fluka (Sigma-Aldrich Química, S.A., España), Bio-Rad (Bio-Rad Spain, España), Invitrogen (Invitrogen, S.A., España), Ambion y Molecular Probes (Bionova Científica), BD Biosciences (España), Qiagen (Izasa S.A.), USB Corporation (Amersham Biosciences Europe GMBH, GE Healthcare Bio-Sciences, España) y Panreac (Labortecnic, España). El nitrógeno líquido fue aportado por los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada.

3.1.8.- Soluciones generales

Medios de cultivos para bacterias

Todos los medios y soluciones utilizadas en el cultivo de bacterias fueron esterilizados por calor húmedo en un autoclave a 121 °C y 1 atmósfera de presión durante 20 minutos.

Para el crecimiento de *E. coli* en medio líquido se utilizó el medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989), cuya composición es:

Bactotriptona (BD Biosciences)	10 g
Extracto de levadura (BD Biosciences)	5 g
Cloruro sódico (Sigma-Aldrich)	15 g
Agua destilada	c. s. p. 1 litro

Para el crecimiento de *E. coli* en medio sólido se añade a la mezcla anterior 15 gramos de agar bacteriológico (BD Biosciences).

MATERIALES Y MÉTODOS

Antibióticos.

Los antibióticos se adicionaron a los medios de cultivo para seleccionar aquellas bacterias portadoras de diferentes genes de resistencia a antibióticos. Las soluciones preparadas fueron esterilizadas por filtración y guardadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Los antibióticos empleados fueron ampicilina (100 mg/mL), tetraciclina (10 mg/mL) y kanamicina (50 mg/mL) en agua bidestilada estéril. Todos ellos eran de Sigma-Aldrich.

Isopropil- β -tiogalactopiranosido (IPTG).

Este compuesto fue añadido al medio de cultivo sólido donde se crecieron bacterias transformadas con plásmidos de la familia pGEM-T que poseen sistema de selección por α complementación. El IPTG inactiva el represor del operón *lac*, lo que induce la expresión del gen *lacZ* que codifica un fragmento de la β -galactosidasa. Este fragmento se complementa con otro fragmento de la enzima codificado por el cromosoma bacteriano dando lugar a la enzima funcional. Dado que el sitio de clonación múltiple está en el gen *lacZ*, cuando se clonan fragmentos de DNA se interrumpe la expresión del mismo y no se da la actividad enzimática en bacterias transformadas con el plásmido con el fragmento clonado.

El IPTG (de USB Corporation) se utilizó diluido en agua estéril bidestilada a concentración 0,1 M.

5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-Gal).

Sustrato alternativo de la β -galactosidasa que da como producto un compuesto azulado insoluble. El color de las colonias bacterianas en medio de cultivo con IPTG y X-Gal permite seleccionar las bacterias recombinantes positivas con el fragmento clonado (de color blanco) y negativas (de color azul).

El X-Gal (de USB Corporation) se utilizó diluido en dimetilformamida a concentración 2% p/v.

Medios de cultivo para células.

Para el mantenimiento y expansión de las líneas celulares se empleó el medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) con 4,5 g/L de glucosa suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) libre de complemento, 200 mM de L-glutamina, 1000 unidades/ mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina y 0,2 U/mL de insulina bovina.

Para la selección, mantenimiento y expansión de los clones transfectados establemente se empleó medio RPMI sin indicador rojo fenol suplementado con 10% de FBS, 200 mM de L-glutamina, 0,5 mg/mL de geneticina (G-418) y 0,2 U/mL de insulina bovina. El medio de selección fue usado sin indicador de pH dado que el rojo fenol interfiere en la detección de la fluorescencia emitida por la proteína roja fluorescente.

Todos los reactivos empleados en los medios celulares fueron de las casas Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Química, S.A., España) e Invitrogen (Invitrogen S.A., España).

3.1.9.- Equipamientos generales

Pipetas: Gibson y Labsystems.

Material de plástico: Nalge Nunc (Dinamarca), Sarstedt (Sarstedt S.A., España) y Labortecnic (España).

Autoclave: Selecta (Eleco, S.A., España).

Centrífugas: Modelo Centrifuge 5415 D (Eppendorf Ibérica, España).

Modelo Microcentrifuge MC-13 (Amicon, Millipore Ibérica, España).

Modelo Mixtasel (Selecta).

Modelo Microfuge E (Beckman Coulter España S.A., España).

MATERIALES Y MÉTODOS

Centrífugas refrigeradas: Modelo Centrifuge J2-21 (Beckman Coulter España S.A.).

Modelo Universal 16R (Hettich Zentrifugen, Alemania).

Agitador orbital: Orbital Shaker S03 (Stuart Scientific, Real Labware, Reino Unido).

Baños: Precistern (Selecta).

Memmert (GmbH+Co, Alemania).

Incubador de células (Revco, Pacisa y Giralt, S.L., España).

Campana de flujo laminar: Microflow Laminar Flow Cabinet (MDH Limited, EEUU).

Congelador de -20 °C: Liebherr (España).

Congelador de -80 °C: -86 °C Freezer (Forma Scientific, EEUU).

Lector de placas: EMS Reader MF (Labsystems, GMI Inc., EEUU).

Sistema de obtención de imágenes: Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 (Kodak, España).

Estufas: Memmert.

Incubador de bacterias: Orbital Incubator Cooled (Gallenkamp, Alemania).

Transiluminador ultravioleta: New Brunswick Scientific, EEUU.

Termobloque: Thermomixer 5436 (Eppendorf Ibérica).

Agitador magnético: Asincro (Selecta).

Espectrofotómetro: DU-70 Spectrophotometer (Beckman Coulter España S.A.).

Vórtex: Press-to-mix 34524 (Snijders, Holanda).

Microscopio óptico: Olympus CK2 (Alemania).

Cámara fría: SIFSA, España.

pHmetro: Crison micropH2000 (Crison Instruments, S.A., España).

Luminómetro:

Equipo de citometría: Citómetro de Flujo FACS Vantage (Becton Dickinson, EEUU), serie C0005, equipado con dos cabezas láser.

- Láser dual Coherente Enterprise a 488nm (340 mW) y UV (60mW).

- Láser rojo visible Spectra Physics 127 a 640nm (15mW).

Cuenta con 7 detectores.

- 5 para fluorescencia (fotomultiplicadores).

- SSC (fotomultiplicador).

- FSC (diodo).

- Módulo Procesador de Pulsos.

- Módulo de SORTER.

- Banco de filtros Band-pass, Short-pass y espejos dielectricos divisores de banda.

- Software de adquisición y análisis CELL Quest (Becton Dickinson).

Termocicladores: Modelos 2700 y 9600 de Applied Biosystems (EEUU).

Fuentes de electroforesis: Model 250 EX (Gibco, Invitrogen).

Model 200/2.0 Power Supply (BioRad, Bio-Rad Laboratories, S.A., España).

Cubetas de electroforesis: Horizon 11-14 (Gibco, Invitrogen).

Horizon 58 (Gibco, Invitrogen).

Homogenizador: Polytron T25 Basic (IKA Labortechnik, Alemania).

3.2.- Métodos

3.2.1.- Procedimientos generales de trabajo con líneas celulares de mamíferos

3.2.1.1.- Cultivo

El cultivo de las diferentes líneas celulares se llevó a cabo en una campana de flujo laminar bajo condiciones estériles usando material estéril. Los medios fueron guardados a 4 °C y precalentados a 37 °C antes de su empleo.

Las células fueron incubadas a 37 °C en atmósfera humificada con 5% de CO₂ y 95% de aire. El medio de cultivo se cambió cada 2 días.

3.2.1.2.- Subcultivo y expansión

En general, las células fueron cultivadas hasta su confluencia y posteriormente separadas por tripsinización. Después fueron recuperadas con medio completo y centrifugadas a 1000 rpm durante 10 minutos en tubos de polipropileno a temperatura ambiente. El sobrenadante fue eliminado y las células fueron resuspendidas en medio completo y colocadas en nuevos *flasks* de cultivo a una densidad aproximada de 2×10^5 células por mililitro.

3.2.1.3.- Tripsinización

Las monocapas de células adherentes fueron dispersadas por tratamiento con 1 mL de tripsina-EDTA por *flask* de 25 mL. Para ello previamente se eliminó el medio y se lavaron las células dos veces con 5 mL de PBS sin calcio ni magnesio, lo que retiró los posibles restos de FBS que pueden inhibir la acción de la tripsina.

3.2.1.4.- Contaje

Cuando se requirió la determinación del número de células, se mezclaron 50 µL de la suspensión celular con 50 µL de una solución de Trypan Blue para determinar la viabilidad celular. A continuación se procedió al contaje de las células utilizando una cámara de Neubauer.

3.2.1.5.- Congelación y descongelación

El mantenimiento de *stocks* de líneas celulares permite preservarlas, evitar su senescencia, reduce el riesgo de contaminación y minimiza los cambios genéticos. Para la congelación se deben usar agentes crioprotectores, como el glicerol y el DMSO, que protegen a las células de la muestra durante el proceso de congelación, reduciendo el punto de congelación y permitiendo una bajada de la temperatura más lenta, lo que minimiza la formación de microcristales y evita el daño celular.

Para su congelación, las líneas celulares fueron almacenadas en crioviales de 1,8 mL en medio completo con 10% de glicerol o con 8% de DMSO (medio de congelación) en un congelador de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las células tripsinizadas fueron recuperadas y centrifugadas y, posteriormente, resuspendidas en 1 mL de medio de congelación, pasadas al criovial e introducidas en el congelador de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un contenedor de congelación Nalgene Cryo $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas, para finalmente almacenarlas en el congelador en cajas de congelación.

Para la descongelación el criovial se introdujo en un baño a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. El medio descongelado, que contiene las células, fue transferido a un *flask* con 10 mL de medio completo, permitiéndose que las células se adhiriesen durante 24 horas, pasadas las cuales se eliminaron las células muertas y el agente crioprotector cambiando el medio.

3.2.1.6.- Transfección transitoria de células

La transfección de células es el proceso por el que se introduce un DNA extraño en la célula por métodos físicos o bioquímicos. Esa transfección puede ser transitoria o estable. En este último caso el DNA extraño se integra en el genoma de la célula hospedadora.

Existe multitud de métodos para la transfección de células: coprecipitación con fosfato cálcico, electroporación, microinyección, uso de DEAE-dextrano y uso de reactivos lipídicos catiónicos. En nuestro caso, empleamos el reactivo lipídico catiónico Lipofectamine 2000. Brevemente, la técnica consistió en mezclar en un tubo 250 μL de medio DMEM con 3-4 μg del DNA de interés y en otro tubo, 240

MATERIALES Y MÉTODOS

μL de DMEM con 10 μL de Lipofectamine 2000. Inmediatamente se echó el contenido del segundo tubo sobre el primero y se incubó la mezcla 20 minutos, durante los cuales se formaron micelas de agente transfectante cargadas positivamente que atraen el DNA cargado negativamente formando complejos. Cuando se echó la mezcla que contiene los complejos de agente transfectante con DNA sobre las células con medio DMEM sin aditivos, los complejos se vieron atraídos por la membrana celular, produciéndose la entrada del DNA en las células.

A continuación, las células transfectadas fueron incubadas en la estufa durante 5-10 horas, tras las cuales se procedió a cambiar el medio a medio normal de cultivo, durante el tiempo necesario para que se produjera la expresión del gen *reporter* (normalmente 72 horas).

3.2.1.7.- Establecimiento de clones estables

Se empleó la misma técnica que en el caso anterior, pero en esta ocasión seleccionamos clones de células que hubieran integrado establemente el plásmido de interés. Para que esto se diese el DNA introducido debía sufrir un proceso de recombinación con el genoma celular. Para identificar las células en las que se hubiera dado la recombinación usamos un medio de selección que contenía G-418 (geneticina), producto que eliminó aquellas células que no hubieran integrado establemente en su genoma el plásmido pDs-Red-Express-1, que confería resistencia frente a G-418. Posteriormente, las células fueron tripsinizadas y sembradas a baja densidad para que crecieran clones separados, manteniendo la presión selectiva para asegurar que sólo crecieran las células transfectadas establemente. Cuando estos clones adquirieron un tamaño adecuado se purificaron usando cilindros o discos de clonación y se pasaron a pocillos donde se mantuvieron con medio de selección hasta su crecimiento y posterior uso o caracterización.

3.2.1.8.- Materiales

Lipofectamine 2000 (Invitrogen).

Plásmidos.

Cilindros y discos de clonación (Sigma-Aldrich).

Glicerol (Sigma-Aldrich).

Dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich).

Contenedor de congelación Nalgene Cryo – 1 °C (Nalge Nunc, Dinamarca).

Crioviales (Nalge Nunc).

Solución de Trypan Blue.

Cámara de Neubauer (Blau Brand, Alemania).

Cubreobjetos.

Tampón fosfato salino (PBS) (Invitrogen).

3.2.2.- Inducción de apoptosis

Técnica.

La apoptosis de las células Caco-2 e IEC-18 se realizó manteniendo las células en suspensión (2×10^5 /mL) en medio completo en tubos en los que las células no podían adherirse que fueron mantenidos en agitación para evitar que las células se agregaran, efecto que ha sido observado en las células Caco-2. Posteriormente, las células fueron recuperadas por centrifugación y tratadas adecuadamente para la extracción de RNA o la determinación de apoptosis o de su fenotipo por citometría de flujo.

En otros experimentos, las células Caco-2 fueron tratadas con butirato sódico 5 mM durante 72 horas. Durante el proceso de diferenciación y muerte celular que

MATERIALES Y MÉTODOS

estas células sufren por la presencia del butirato, muchas células se desprenden de la monocapa celular y aparecen en suspensión. Para rescatar las células y extraerles RNA o proceder a su tipado, primero se recuperó el medio con las células desprendidas. Este medio se centrifugó y se recuperaron las células. En el caso de las células que habían seguido adheridas, se procedió a su separación por tripsinización, y después se recuperaron con medio completo. La mezcla fue pasada a tubos que fueron centrifugados, quedando las células como un sedimento que posteriormente fue lavado con PBS.

Materiales.

Materiales de cultivo de células.

Agitador orbital.

Estufa a 37 °C.

Butirato sódico (Sigma-Aldrich).

3.2.3.- Inducción de diferenciación

Técnica.

Para determinar el efecto de la diferenciación en la expresión de *RND3* en las células IEC-6, éstas fueron plaqueadas (5×10^5) en placas de 35 mm que previamente habían sido recubiertas de una fina capa de una matriz extracelular extraída del sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) llamada Matrigel según las instrucciones del proveedor. Esta matriz extracelular está compuesta de laminina, colágeno IV, nidógeno, heparán sulfato y diferentes factores de crecimiento, entre los que destacan TGF- β , EGF e IGF. Esa matriz es similar a la que se encuentra en la superficie basolateral de las células epiteliales intestinales.

Las células fueron cultivadas en esas condiciones durante 24 ó 48 horas, momento en el que fueron recogidas usando dispasa según las instrucciones del proveedor. Las células separadas del Matrigel fueron recogidas y tratadas para la extracción

de RNA o la preparación de homogenados crudos para la determinación de proteínas y actividades enzimáticas.

Para determinar posteriormente si alguno de los componentes del Matrigel por separado era el inductor de la diferenciación de las células y de los cambios en la expresión de *RND3*, se procedió al cultivo de las células con cada uno de los siguientes componentes del Matrigel: laminina 1, colágeno IV, factor de crecimiento de nervios (*nerve growth factor 7S*, NGF-7S), factor de crecimiento similar a la insulina I (*insulin-like growth factor I*, IGF-I), factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (*transforming growth factor $\beta 1$* , TGF- $\beta 1$), factor de crecimiento derivado de plaquetas (*platelet-derived growth factor*, PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (*basic fibroblast growth factor*, bFGF) y factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor*, EGF) a concentraciones similares a aquellas en las que se encuentran en el Matrigel. En el caso de la laminina y el colágeno se procedió a cubrir las placas con la proteína, dejar que gelificara y posteriormente sembrar las células. En el caso de los factores de crecimiento, se procedió al cultivo de las células con medio al que se le adicionó la cantidad correspondiente del factor de crecimiento.

Materiales.

Materiales generales de cultivo de células.

Dispasa (Becton Dickinson).

Matrigel (Becton Dickinson).

Laminina 1 (Becton Dickinson).

Colágeno IV (Becton Dickinson).

NGF-7S (Sigma-Aldrich).

IGF-I (Sigma-Aldrich).

TGF- $\beta 1$ (Sigma-Aldrich).

PDGF (Sigma-Aldrich).

MATERIALES Y MÉTODOS

BFGF (Biosource, Labclinics, España).

EGF (Calbiochem, Bionova Científica, S.L., España).

3.2.4.- Análisis de la actividad de la región promotora

El estudio de la actividad del promotor de la GTPasa de pequeño tamaño *RND3* se ha realizado utilizando dos sistemas diferentes de genes reporteros: por un lado se han empleado los vectores de la familia pGL3, en los que la actividad promotora puede ser visualizada por la expresión de la luciferasa de la luciérnaga (*Photynus pyralis*); por otro lado se ha empleado el vector pDs-Red-Express-1, que permite observar la actividad promotora mediante la medición o visualización de la proteína roja fluorescente (RFP).

Medición de la actividad luciferasa.

Las células hospedadoras fueron cotransfectadas con el plásmido de la familia pGL3 y el plásmido pRL-TK. Como se ha indicado previamente, este plásmido codifica la luciferasa de *Renilla* y permite normalizar la eficiencia de la transfección, mientras que los vectores de la familia pGL3 codifican la luciferasa de la luciérnaga y nos permiten monitorizar la actividad promotora de secuencias clonadas en el sitio múltiple de clonación del vector pGL3-Basic y compararlas frente a la actividad del pGL3-Control.

Las cotransfecciones fueron realizadas según los métodos descritos en la Sección 3.2.1.6. La relación de concentraciones de los plásmidos empleados en la cotransfección fue de 4:1 (pGL3: pRL-TK).

Tras la transfección las células fueron mantenidas en medio normal hasta alcanzar un 70-80% de confluencia (2 a 3 días), momento en el que el medio fue sustituido por DMEM durante 8 horas.

Tras este período de tiempo se procedió a la lisis de las células con el reactivo proporcionado por el *Dual Luciferase Assay Kit* (Promega), que permite la determinación de la actividad de la luciferasa de *Renilla* y de la luciérnaga

realizando dos medidas secuenciales de luminiscencia tras la adición de un reactivo de bloqueo de la actividad de la luciferasa de la luciérnaga y activación de la de *Renilla*. La medición de la actividad luciferasa se realizó según las instrucciones del fabricante.

Medición de la expresión de la proteína roja fluorescente (RFP).

La determinación de la actividad luciferasa permite observar cuantitativamente la actividad del promotor en diferentes condiciones; sin embargo, no permite discriminar en qué células se está dando la activación del promotor. Por ello introdujimos la región promotora en el vector pDsRed-Express-1 y esta construcción fue transfectada en células eucariotas por el método descrito en las Secciones 3.2.1.6. y 3.2.1.7. Posteriormente se aislaron aquellos clones que la hubieran integrado establemente en su genoma. De esta manera se puede visualizar en un microscopio de fluorescencia cuáles son las células emisoras de fluorescencia y además ésta puede ser medida en un citómetro de flujo, lo que permite observar la actividad del promotor sin necesidad de lisar las células. Para ello se cultivaron las células en las condiciones experimentales pertinentes y, cuando hubo pasado suficiente tiempo para la expresión de la RFP, se observaron al microscopio de fluorescencia, tras lo cual fueron tripsinizadas y lavadas y se procedió a medir la emisión de fluorescencia en el citómetro de flujo

Materiales.

Materiales de cultivo de células.

Materiales para transfecciones.

Kit para la medición de la actividad luciferasa: Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega).

3.2.5.- Procedimientos de trabajo con *Escherichia coli*

3.2.5.1.- Cultivo de bacterias

Técnica.

Las bacterias *E. coli* XL1-Blue fueron crecidas en medio LB estéril con tetraciclina a 37 °C. En el caso de aquellas bacterias transformadas con un plásmido que confiriera resistencia a algún otro antibiótico (ampicilina en el caso de los plásmidos de las familias pGEM-T y pGL3 y kanamicina en el caso de pDs-Red-Express-1), éstas fueron crecidas en LB con tetraciclina y ese antibiótico.

Todos los materiales y soluciones empleadas en el cultivo de bacterias eran estériles o autoclavados. Para el almacenamiento a largo plazo de las cepas bacterianas, estas fueron guardadas en crioviales a -80 °C en medio LB suplementado con glicerol al 50%.

En los casos en los que se requería pequeñas cantidades de bacterias, se inocularon 5-10 mL de LB más los correspondientes antibióticos con una colonia o parte del glicerol y se cultivó a 37 °C durante 12-15 horas.

Para los cultivos en los que se requería mayor cantidad de bacterias, se preparó previamente un cultivo iniciador de la manera anteriormente indicada. Posteriormente se inoculó 100-200 mL de LB más los correspondientes antibióticos con 1:100 del cultivo iniciador y se procedió a su incubación a 37 °C con agitación suave durante el tiempo necesario para obtener una absorbancia a 600 nm de 0,5-0,6. Las bacterias fueron recuperadas por centrifugación.

En el caso de los cultivos sobre medio sólido, se usaron placas de LB-agar con los correspondientes antibióticos en las que se sembraron diferentes diluciones de soluciones de bacterias *E. coli*. Las placas fueron incubadas invertidas durante toda la noche a 37 °C.

Materiales.

Medios LB y LB-agar.

Soluciones de antibióticos.

Glicerol (Sigma-Aldrich).

Crioviales (Nalge Nunc).

Material de plástico y de vidrio estériles.

3.2.5.2.- Preparación de bacterias competentes

Técnica.

Se inocularon 5 mL de medio LB líquido y tetraciclina con bacterias de la cepa XL1-Blue. El inóculo se incubó a 37 °C con agitación moderada durante toda la noche. Al día siguiente se tomó una alícuota con la que inoculamos un matraz erlenmeyer de 250 mL de LB líquido y tetraciclina, que fue incubado a 37 °C hasta alcanzar una absorbancia de 0.5-0.6 a 600 nm. En ese momento se pasaron las bacterias a tubos de polipropileno en los que se realizaron los siguientes pasos:

- Centrifugar a 4000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Eliminar el sobrenadante.
- Lavar una vez con un volumen de agua bidestilada autoclavada fría.
- Lavar dos veces con medio volumen de agua bidestilada autoclavada fría.
- Lavar una vez con 0,02 volúmenes de glicerol al 10% en agua frío.
- Resuspender en 0,002 volúmenes de glicerol al 10% en agua frío.
- Las bacterias así obtenidas se alicuotearon y, bien fueron utilizadas inmediatamente, bien fueron guardadas a –80 °C para su uso posterior.

Materiales.

Bacterias *Escherichia coli* cepa XL1-Blue.

Medio LB líquido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Solución de tetraciclina.

Agua estéril autoclavada fría.

Glicerol al 10% autoclavado frío.

3.2.5.3.- Electroporación

Técnica.

Es el proceso por el que se introduce el DNA en el interior de las bacterias a través de una descarga eléctrica. La electroporación es el método más eficiente para la transformación de *E. coli*.

Para ello se utilizaron 50 µL de las bacterias competentes obtenidas por la técnica previamente descrita que fueron mezcladas con parte del volumen de la ligación, obtenido según el protocolo indicado en la sección 3.2.8.6. La mezcla se introdujo dentro de la cubeta de electroporación y se sometió a un pulso eléctrico de 2500 voltios a 16-19 kV/cm². Las bacterias fueron recogidas añadiendo directamente a la mezcla un mililitro de medio LB sin antibióticos a 37 °C. Las bacterias transformadas se incubaron durante una hora a 37 °C en un agitador orbital con agitación suave (100 rpm) para favorecer su recuperación tras la electroporación. Pasado ese tiempo se sembró una alícuota de esas bacterias en una placa de LB-agar con los antibióticos adecuados, tras lo cual la introdujimos en una estufa a 37 °C durante toda la noche o hasta la aparición de colonias.

Materiales.

Bacterias competentes.

Plásmido.

Medios LB y LB-agar.

Soluciones de antibióticos.

Electroporador Electroporator 2510 (Eppendorf).

Cubetas de electroporación.

Material de plástico estéril.

3.2.5.4.- Estudio sistemático de colonias

Técnica.

En el caso de los plásmidos que, como el pGEM-T, permiten la selección blanco-azul, las colonias blancas que se han obtenido se pican con palillos de dientes estériles que se introducen en tubos eppendorf de 1,5 mL que contienen un mililitro de medio LB líquido. Se dejan crecer durante toda la noche a 37 °C en un agitador orbital a 200 rpm. Cuando no existe sistema de selección blanco-azul se picaron colonias transformadas con el plásmido religado (control negativo) y colonias transformadas con la ligación aleatoriamente.

El DNA plasmídico se extrae mediante una variante del protocolo de lisis por calentamiento (miniprep) (Sambrook *et al.*, 1989) que implica un choque térmico a 95 °C durante 55 segundos seguido de una serie de precipitaciones. Así, los cultivos fueron centrifugados y el sedimento de bacterias fue resuspendido en 350 µL de solución STET, para posteriormente sufrir el choque térmico. A continuación se eliminaron los restos bacterianos y se procedió a precipitar el DNA plasmídico con 40 µL de acetato sódico 3M pH 5,2 y 500 µL de isopropanol, para posteriormente limpiarlo con etanol. Finalmente secamos el DNA al aire y se resuspendió en agua bidestilada estéril. Para la comparación de los plásmidos se procedió a correr una alícuota en un gel de agarosa. Cuando comparamos el tamaño de los plásmidos obtenidos por este protocolo y el del plásmido control religado decidimos qué plásmidos (y por ende, qué colonias) habían integrado el fragmento de DNA que queríamos clonar. Mediante cortes con enzimas de restricción se determinó cuál de los positivos portaba el fragmento que nos interesa.

Materiales.

Medios LB y LB-agar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Soluciones de antibióticos.

IPTG.

X-Gal.

Solución STET: 0,1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8 y 5% Tritón X-100 en agua bidestilada estéril.

Isopropanol (Panreac).

Etanol (Panreac).

3.2.6.- Procedimientos de trabajo con RNA

3.2.6.1.- Extracción de RNA

El RNA se obtuvo por dos métodos, bien usando el método de la extracción con tiocianato de guanidina/fenol-cloroformo (Chomczynski and Sacchi, 1987), bien usando el reactivo llamado Trizol (Invitrogen), que consiste en una solución monofase de fenol y tiocianato de guanidina, y el método indicado por el fabricante.

Extracción con tiocianato de guanidina / fenol-cloroformo.

Técnica.

Para la obtención del RNA total se partió del material biológico (células o tejidos) al cual se le añadió inmediatamente y de forma secuencial, agitando a cada paso, un volumen de GT/M, 0,1 volumen de acetato sódico 2 M pH 4, un volumen de fenol y 0,2 volúmenes de cloroformo:alcohol isoamílico (49:1).

Tras la última adición las muestras se agitaron fuertemente los tubos durante 15 segundos para obtener una mezcla homogénea y se incubaron a 4 °C. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas durante 20 minutos a 1100 g a 4 °C para separar la fase acuosa de la orgánica. La fase acuosa (superior) se recuperó ya que es la que contiene el RNA. A esta fase se le añadió un volumen

de isopropanol para precipitar el RNA y posteriormente se incubó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante un mínimo de una hora. Esto es debido a que, en presencia de alcoholes como el isopropanol y el etanol, y de concentraciones relativamente altas de cationes monovalentes los ácidos nucleicos se agregan precipitando de la solución.

Tras esa incubación se centrifugaron las muestras a 1100 g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos. Los precipitados que se obtuvieron en este paso se resuspendieron en 0,3 volúmenes de solución GT/M y se volvieron a precipitar con isopropanol. Tras centrifugar nuevamente en las condiciones anteriormente indicadas se lavaron los precipitados de RNA con etanol absoluto y con etanol 70%, tras lo cual se secaron a temperatura ambiente y se resuspendieron en agua tratada con DEPC.

Materiales.

Solución stock GT: tiocianato de guanidina 4 M, citrato sódico 25 mM pH 7 y N-laurilsarcosina al 0.5%.

Solución GT/M: solución GT adicionada de β -mercaptoetanol 0,1 M.

Fenol saturado con tampón citrato 0.1 M, pH 4.3 (Sigma-Aldrich).

Acetato sódico 2 M pH 4.

Cloroformo:alcohol isoamílico en proporción 49:1 (USB Corporation).

Etanol (Panreac).

Alcohol isopropílico (Panreac).

Todas las soluciones que no contienen componentes orgánicos y el material de plástico y de vidrio fueron tratados con agua y dietilpirocarbonato (DEPC) durante un mínimo de 12 horas y posteriormente autoclavados dos veces para eliminar las posibles nucleasas de RNA existentes y los restos de DEPC. La solución stock de tiocianato de guanidina (GT) se esterilizó por filtración a través de filtros de nitrato de celulosa de tamaño de poro $0.2\text{ }\mu\text{M}$.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción con Trizol.

Técnica.

Se partió de las células (sobre las cuales se añadió el Trizol) o de los tejidos (a los que se les añadió el Trizol y se homogenizaron usando un Polytron). A continuación se incubaron las muestras y se les añadió 0,5 volúmenes de cloroformo, mezclando bien el contenido del tubo. Se centrifugó a máxima velocidad a 4 °C para separar dos fases, una superior donde permanece el RNA y otra inferior donde queda el DNA y otros componentes celulares, separadas por una interfase de proteínas.

La fase superior fue recuperada y pasada a otro tubo en el que se añadió un volumen de isopropanol. La mezcla fue incubada y, tras centrifugarla, se obtuvo un precipitado de RNA que fue lavado secuencialmente con etanol absoluto y etanol 70%. Este precipitado fue secado al aire y posteriormente resuspendido en agua tratada con DEPC

Para comparar la calidad del RNA se resolvieron 5 µg de RNA, previamente adicionados de tampón de carga y desnaturalizados por calentamiento durante 5 minutos a 65 °C, en un gel de agarosa al 0,8%. La electroforesis se llevó a cabo durante una hora a 80V, utilizando TAE 1x como tampón. El gel se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó en un transiluminador de ultravioleta. Si el RNA obtenido estaba en buenas condiciones se veían dos bandas que corresponden a las subunidades ribosómicas 18S y 28S.

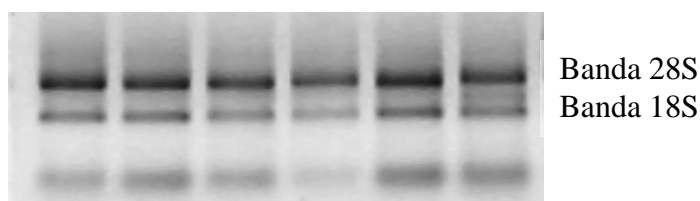


Figura 16.- Imagen típica de un gel de RNA donde se observan las bandas correspondientes a las subunidades ribosómicas.

Materiales.

Reactivo Trizol (Invitrogen).

Cloroformo (Sigma-Aldrich).

Alcohol isopropílico (Panreac).

Etanol (Panreac).

3.2.6.2.- Tratamiento con TURBO DNasa

Para evitar la posible interferencia del DNA que puede contaminar las muestras de RNA se trataron las muestras con TURBO DNasa .

Técnica.

Mezclamos 10 µg de RNA total con 1 µL de TURBO DNasa (2 U) y 5 µL de tampón de TURBO DNasa y completamos hasta un volumen final de reacción de 50 µL con agua bidestilada tratada con dietilpirocarbonato. Se incubó la reacción durante 30 minutos a 37 °C. A continuación se añadió otro microlitro de enzima TURBO DNasa e incubamos nuevamente durante 30 minutos a 37 °C. Para detener la reacción e inactivar la enzima añadimos 5 µL de reactivo de inactivación (*Dnase Inactivation Reagent*) y mezclamos bien. Se mantuvo la solución a temperatura ambiente durante 3-5 minutos y se eliminó el agente inactivador por centrifugación. A continuación se recuperó el sobrenadante, se pasó a un tubo nuevo libre de RNAsas y se procedió a la cuantificación del RNA limpio de DNA.

Materiales.

Kit Turbo DNA-free (Ambion, Bionova Científica, S.L., España).

RNA de interés.

Agua bidestilada tratada con DEPC.

3.2.6.3.- Cuantificación de DNA y RNA

Para cuantificar el RNA y el DNA obtenidos se emplea un método espectrofotométrico. Para determinar la calidad se mide la absorbancia (A) a 230, 260, 270 y 280 nm y se hacen las siguientes comparaciones:

- A_{260}/A_{280} : debe estar entre 1,7 y 2,0. Una relación menor indica contaminación por proteínas.
- A_{260}/A_{270} : debe ser mayor de 1. Si es menor indica contaminación por fenol.
- A_{260}/A_{230} : debe estar entre 2,0 y 2,3. Si es menor indica contaminación por lípidos o tiocianato de guanidina.

Para determinar la cantidad, se mide la absorbancia a 260 nm dado que una unidad de absorbancia a dicha longitud de onda equivale a una concentración de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (en el caso del RNA) o de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (en el caso del DNA de doble hebra) usando una cubeta de cuarzo de 1 mL de capacidad y 1 cm de ancho en la que se mezclan 1 μL del ácido nucleico de interés en 1 mL de solución TE pH 8 (en el caso del DNA) o de agua tratada con DEPC (en el caso del RNA).

Materiales.

Solución TE pH 8: Tris-base 10 mM, EDTA 1 mM en agua bidestilada a pH 8.

Ácido nucleico de interés.

Cubeta de cuarzo.

Espectrofotómetro.

3.2.6.4.- Reacción de transcripción inversa (RT)

Esta técnica se basa en la síntesis de una hebra de DNA complementario (cDNA) de cadena simple a partir del RNA mensajero (mRNA) (Sambrook *et al.*, 1989).

Para ello se usa la enzima transcriptasa inversa que sintetiza el cDNA a partir de los sitios determinados por los cebadores empleados, que pueden ser útiles para

generar cDNA de todos los mRNA (en este caso el cebador es un p(dT)_n) o sólo para uno de los mRNA (en cuyo caso el cebador será complementario a una parte de la secuencia del mRNA).

Técnica.

Se mezclaron de 100 a 500 ng de RNA total con 1 µL de cebador p(dT)_n de concentración 10 µg/ µL o 1 µL de cebador específico de concentración 2 µg/ µL. La mezcla se incubó durante 10 minutos a 70 °C para desnaturalizar el RNA e inmediatamente se enfrió a 4 °C, proceso durante el cual híbrida el cebador. En ese momento se añadió una mezcla que contenía 4 µL del tampón de la transcriptasa inversa, 2 µL de ditioneitol 100mM, 1 µL de inhibidor de nucleasas de RNA, 1 µL de desoxinucleótidos, 1 µL de enzima SuperScript II y la cantidad de agua tratada con DEPC necesaria para llegar hasta un volumen total de 20 µL. Aplicamos un pulso a las muestras que fueron incubadas en el termociclador a 42 °C durante 1 hora a 70 °C durante 15 minutos para terminar la reacción, tras lo cual se enfriaron a 4 °C. El cDNA así obtenido pudo ser usado inmediatamente o guardado a -20 °C hasta su empleo.

Materiales.

Tampón de la transcriptasa inversa 5x (Invitrogen).

Ditioneitol (DTT) 100 mM (Invitrogen).

Inhibidor de nucleasas de RNA: Rnase Out (Invitrogen).

Transcriptasa inversa: SuperScript II RT RNASA H-Reverse Transcriptase (200 U/ µL) (Invitrogen).

Desoxinucleótidos 10 mM de cada uno: dATP, dCTP, dTTP, dGTP (Biotools).

Cebadores (Sigma-Genosys).

Termociclador.

Tubos eppendorf de 200 µL libres de nucleasas de RNA (Molecular Bioproducts, EEUU).

3.2.6.5.- Extensión de cebadores

Esta técnica permite llevar a cabo el estudio del extremo 5' de los mRNA de los genes. Así podemos determinar el punto de inicio de la transcripción y estudiar también si existe más de un inicio de transcripción. Consiste en la retrotranscripción del mRNA usando un cebador específico antisentido marcado radiactivamente y que hibrida en una posición cercana al supuesto inicio de transcripción.

Marcaje del cebador y de los marcadores de pesos moleculares.

Técnica.

Marcamos el cebador RND3Primer (de secuencia 5'-GTCTCTGGTCTACTGATG-3') mezclando 1 μ L de cebador (10 picomoles totales), 5 μ L de [γ -³²P]ATP, 2 μ L de tampón 10x, 2 μ L de T4 polinucleótido-quinasa (8 unidades) y agua para un volumen final de 20 μ L. Incubamos a 37 °C durante 1 hora y posteriormente inactivamos la enzima incubando a 70 °C durante 10 minutos. Después introducimos la mezcla en hielo.

A continuación cuantificamos el porcentaje de incorporación del [γ -³²P]ATP filtrando la mezcla a través de una columna de Sephadex G-25 al centrifugar a 3000 rpm durante 3 minutos. Medimos en un contador de centelleo 1 μ L de cebador marcado en 1 mL de líquido de centelleo. El valor obtenido debe ser superior a 10⁵ cpm/ μ L.

En el caso de los marcadores de pesos moleculares, la reacción que se preparó fue la misma sustituyendo el cebador por el marcador de peso molecular.

Materiales.

Tampón 10x de la T4 polinucleótido-quinasa.

T4 polinucleótido-quinasa.

Cebadores (Sigma-Genosys).

Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) (USB Corporation).

Sephadex G-25 ó Sephadex G-50 (GE Healthcare Bio-Sciences, España).

[γ -³²P]ATP (GE Healthcare Bio-Sciences, España).

Reacción de hibridación.

Técnica.

Cuantificamos y verificamos el estado del RNA problema. Mezclamos para un volumen total de 10 μ L 2 μ L de tampón 10x, 10 μ g de RNA total, 10⁵ cpm del cebador y agua tratada con DEPC. Aplicamos un pulso en la centrífuga e incubamos la mezcla a 95 °C durante 5 minutos, tras lo cual enfriamos de forma rápida hasta 65 °C, temperatura que la mantuvimos durante 10 minutos, para posteriormente enfriar lentamente hasta los 42 °C, proceso que duró 2-3 horas.

Materiales.

Agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC).

Cebador marcado.

Termobloque.

Baño de agua en ebullición.

Reacción de extensión del cebador.

Técnica.

Una vez la mezcla de la reacción de hibridación había alcanzado los 42 °C le añadimos la mezcla, previamente preparada y calentada, de 10 μ L de tampón 5x, 0,5 μ L de la mezcla de dNTP (10 mM de cada uno –dATP, dCTP, dGTP, dTTP-), 0,5 μ L de inhibidor de nucleasas de RNA, 1 μ L de la transcriptasa inversa SuperScript II y 26 μ L de agua tratada con DEPC. Mezclamos por pipeteo y aplicamos un pulso en la microfuga. Finalmente incubamos la muestra a 42 °C durante 1 a 2 horas, tiempo durante el cual se dio la reacción de transcripción inversa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Detuvimos la reacción añadiendo 5 μL de acetato sódico 3 M, pH 4,8 y 150 μL de etanol absoluto. Dejamos que el cDNA precipitara durante toda la noche a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Al día siguiente centrifugamos 15 minutos a 13000 rpm. Eliminamos el sobrenadante y lavamos el precipitado con 150 μL de etanol al 70%. Centrifugamos nuevamente en las mismas condiciones. Dejamos secar la muestra al aire y resuspendimos en 5 μL de tampón TE. Los productos de la transcripción inversa así resuspendidos se mezclaron con 10 μL de tampón de carga desnaturizante, con 97,5% de formamida, 10 mM EDTA pH 7,5, azul de bromofenol 0,3% y xileno cianol 0,3%. Calentamos dos veces a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos, mezclando en el vortex antes de cada calentamiento. Después calentamos a $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante tres minutos antes de cargar las muestras.

Materiales.

Tampón 5x para la transcriptasa inversa SuperScript II (Invitrogen).

dNTPs (100mM) (Invitrogen).

DTT (100mM) (Invitrogen).

Inhibidor de nucleasas de RNA (40 U/ μL) (Invitrogen).

Transcriptasa inversa SuperScript II (Invitrogen).

Solución TE pH 8,0.

Tampón de carga desnaturizante.

Electroforesis de las muestras.

Técnica.

En un vaso de precipitados mezclamos 25,2 g de urea, 6 mL de TBE 10x (1 M Tris-base, 16 mM EDTA pH 8, 800 mM ácido bórico), 9,76 mL de solución de acrilamida/bis (37,5:1) al 40% y agua hasta un volumen de 60 mL. Una vez mezclados los distintos componentes añadimos los agentes polimerizantes: 250 μL de persulfato amónico al 10% y 75 μL de TEMED. Vertimos el contenido del vaso de precipitados entre los cristales y dejamos polimerizar durante una hora

aproximadamente. Para la electroforesis se empleó un sistema Poker Face II SE 1600 (Hoefer Scientific Instrument).

Cargamos el volumen total de las muestras en el gel, que había sido precalentado durante 30 minutos a 1500 V. La electroforesis se realizó a 2000 V hasta que el frente alcanzó la parte baja del gel (2-3 horas).

Una vez finalizada la electroforesis transferimos el gel a papel Whatman y secamos calentando a 65 °C durante 2 horas en un sistema de vacío Centrivac (Heraeus Instruments, Control Técnica, España). Recortamos el papel Whatman con el gel y le expusimos una película fotográfica en un cassette durante un tiempo que varió dependiendo de la emisión de radiactividad detectada con un contador Geiger-Müller Series 900 Mint Monitor (Morgan, España). Al día siguiente revelamos la película y determinamos los tamaños de los productos extendidos en la reacción.

Materiales.

Urea (Sigma-Aldrich).

Solución de acrilamida/Bis (37,5:1) al 40% (BioRad).

Tampón de electroforesis TBE 1x y TBE 10x (BioRad).

Persulfato amónico (Sigma-Aldrich).

TEMED Sigma –Aldrich).

Películas Kodak (Sigma-Aldrich).

Líquidos de revelado: Revelador Ultrafin y fijador Superfix, de Tetenal, Alemania.

Cassette: Hyperscreen (Amersham, GE Healthcare).

3.2.6.6.- Northern blot

Esta técnica consiste en la detección de secuencias específicas de RNA tras su separación electroforética.

Electroforesis de las muestras de RNA total en geles de agarosa-formaldehído en condiciones desnaturizantes.

Técnica.

Para la separación electroforética del RNA total se utilizaron geles desnaturizantes de agarosa al 1% en tampón borato. Para ello, se mezcló un gramo de agarosa con 10 mL de tampón borato 10x y 82 mL de agua tratada con DEPC y se introdujo la mezcla en un horno microondas. Una vez fundida la mezcla se atemperó hasta 50-55 °C, momento en el que se le añadieron 8 mL de formaldehído al 37% y se vertió la mezcla en la cubeta de electroforesis tratando de evitar que se formasen burbujas. Se dejó solidificar durante una hora, tras lo cual llenamos la cubeta hasta cubrir el gel con borato 1x.

Simultáneamente mezclamos 20 µg de RNA total con tampón de carga hasta un volumen de 20 µL y desnaturizamos las muestras calentándolas a 65 °C durante 10 minutos, pasados los cuales enfriamos rápidamente. Cargamos las muestras en el gel y las sometimos a electroforesis a 120 mA.

Para evitar un calentamiento excesivo del tampón de electroforesis y la formación de un gradiente de sales se sometió el tampón a la recirculación con la ayuda de una bomba peristáltica (Vial Medical 1000 Mini, Prim S.A. Suministros Médicos, España).

La electroforesis fue detenida cuando el frente determinado por el colorante presente en el tampón de carga alcanzaba aproximadamente dos tercios del gel.

Teñimos el gel durante tres minutos con bromuro de etidio. Lavamos varias veces con agua tratada con DEPC durante diez minutos para eliminar el formaldehído y parte del bromuro de etidio, tras lo cual se comprobó la integridad del RNA en un transiluminador de ultravioleta viendo las bandas 18S y 28S.

Materiales.

Agarosa (Gibco, Invitrogen).

Formaldehído (Sigma-Aldrich).

Tampón borato 10x: Borato sódico 50 mM, ácido bórico 0.5 M, sulfato sódico 100 mM, EDTA 10 mM en agua tratada con DEPC.

Tampón de carga: 500 µL de formamida, 150 µL de formaldehído, 100 µL de borato 10x, 100 µL de glicerol, 130 µL de agua tratada con DEPC y 20 µL de azul de bromofenol al 2%.

Bromuro de etidio (2 µg/ µL): Se prepara a partir de una solución *stock* de 10 mg/mL al diluirla con agua tratada con DEPC.

Transferencia a membranas de nylon de las muestras de RNA total.

Técnica.

Para la transferencia del RNA a la membrana de nylon se dispuso un soporte de metacrilato dentro de una cubeta de vidrio con aproximadamente 800 mL de SSC 20x. Encima del soporte se colocaron dos trozos de papel Whatman, que habían sido previamente humedecidos en el mismo tampón de transferencia, perpendiculares entre sí y dispuestos de tal manera que los extremos quedaran en contacto con el tampón. A continuación, y siguiendo este orden, se colocó un trozo de papel Whatman del tamaño del gel de agarosa humedecido en SSC 20x, el gel de agarosa con los pocillos hacia abajo, la membrana de nylon humedecida en SSC 2x y dos trozos de papel Whatman humedecidos en SSC 2x. A continuación se eliminaron las posibles burbujas de aire que quedaran atrapadas ya que en caso de quedar alguna impediría la transferencia del RNA. Por último se colocó un bloque de papeles de filtro del mismo tamaño que el gel hasta una altura aproximada de 10 cm y una placa de vidrio encima de la cual se puso un peso de unos 500 g. Dejamos que el proceso de transferencia se diera durante toda la noche.

MATERIALES Y MÉTODOS

Al día siguiente se retiraron los papeles de filtro y desmontamos la transferencia. Marcamos la posición de las muestras en la membrana antes de separarla del gel con un lápiz. Verificamos cómo ha transcurrido la transferencia con el transiluminador de ultravioleta y señalamos las posiciones de las subunidades ribosomales 18S y 28S, las cuales nos servirían como marcadores de peso molecular (4,8 y 1,8 kb respectivamente). Fijamos el RNA a la membrana de nylon haciendo que se formasen enlaces covalentes entre RNA y membrana al someter la membrana con el RNA a una exposición corta a la luz ultravioleta (UV Stratalinker 1800, Stratagene). Las membranas fueron envueltas en papel de celofán y guardadas a -80 °C hasta su uso.

Materiales.

Membrana de nylon: GeneScreen Plus, Hybridation Transfer Membrane (NEN, EEUU).

Papel Whatman 3 mm.

Tampón 20x SSC: NaCl 3 M, citrato sódico 0,3 M, pH 7 (BioRad).

Solución de dodecilsulfato sódico (SDS) al 20%.

UV Stratalinker 1800 (Stratagene, Inglaterra).

Marcaje de las sondas.

El marcaje se realizó con [α -³²P]dCTP según el protocolo de marcaje de la reacción en cadena de la polimerasa.

Técnica.

Como sonda se empleó un fragmento de la secuencia del mensajero de *RND3*. También se emplearon como sondas para comparar la cantidad de RNA entre diferentes muestras fragmentos de la β -actina y la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*).

Para realizar el marcaje se emplea el protocolo de marcaje de hebra simple descrito en Sambrook *et al.* (1989). Para ello se linealizaron los plásmidos que

contienen los fragmentos que se deseaban detectar con alguno de los enzimas de restricción con sitio de corte único.

Posteriormente mezclamos 25 ng de la sonda con 2,5 µL del tampón 10x, 1,6 µL de la solución de cloruro de magnesio, 0,5 µL de la mezcla de desoxinucleótidos, 2,5 µL del cebador correspondiente, 0,5 µL de la polimerasa, 15 µL de [α -³²P]dCTP y agua hasta completar 25 µL.

Se aplicó un pulso en la centrífuga y se colocó la muestra en el termociclador con el siguiente protocolo de temperaturas:

1 ciclo: 94 °C/ 13 minutos.

35 ciclos: 94 °C/ 30 segundos; 50 °C/ 30 segundos; 72 °C/ 5 minutos.

1 ciclo: 72 °C/ 10 minutos.

Finalizar la PCR a 4 °C.

Una vez finalizada la PCR eliminamos tanto los nucleótidos no utilizados como los cebadores por medio de columnas de filtración del *kit* QIAquick Nucleotide Removal Kit. (Qiagen, Izasa S.A.). Cuantificamos el dCTP marcado incorporado para poder determinar el volumen de sonda a utilizar en el siguiente paso.

Materiales.

Sonda de DNA.

dNTPs en concentración 10 mM cada uno.

Cloruro de magnesio 25 mM.

Oligonucleótidos SP6 ó T7 10 µM.

Tampón 10x para la polimerasa.

[α -³²P]dCTP (3000 Ci/mmol) (GE Healthcare Bio-Sciences).

Amplitaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems).

MATERIALES Y MÉTODOS

Prehibridación e hibridación.

Técnica.

Se atemperó a temperatura ambiente la membrana que estaba a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. El tampón se calentó a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se colocó la membrana en un cilindro de hibridación y se le añadieron 10 mL de tampón (1 mL de tampón por cada 10 cm^2 de membrana). El cilindro se introdujo en el horno de hibridación a una temperatura de hibridación de $42\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dejamos prehibridar la membrana durante 4 horas.

Tras la prehibridación se procedió a la desnaturalización de la sonda al incubar ésta 10 minutos a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ (10^6 cpm por mililitro de DNA de salmón). Añadimos la sonda al mismo tampón de prehibridación e hibridamos la membrana incubando toda la noche en el horno de hibridación a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Materiales.

Membrana de nylon con las muestras de RNA.

Sonda marcada.

DNA de esperma de salmón.

Tampón de prehibridación e hibridación: Northern MAX Prehyb/Hyb buffer (Ambion, EEUU).

Horno de hibridación: Red Roller II Hybridization Oven (Hoefer Pharmacia Biotech, EEUU).

Lavados.

Finalizada la hibridación eliminamos el tampón de hibridación con los restos de la sonda que no hubieran hibridado y procedimos al lavado de la membrana.

Técnica.

Lavado tipo A: consiste en cuatro lavados consecutivos de quince minutos cada uno a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ y agitación moderada con 250 mL de tampón de lavado, que se trata

de una solución que contiene 1,25 mL de SDS 20%, 25 mL de SSC 20x y agua hasta 250 mL.

Lavado tipo B: realizamos dos lavados consecutivos de quince minutos cada uno a 65 °C y agitación moderada con 250 mL de tampón de lavado, el cual contiene 1,25 mL de SDS 20%, 12,5 mL de SSC 20x y agua hasta 250 mL.

Lavado tipo C: se trata de un único lavado de quince minutos a 65 °C y agitación moderada con 250 mL de tampón de lavado de composición 1,25 mL de SDS 20%, 1,25 mL de SSC 20x y agua hasta 250 mL.

Materiales.

Agitador orbital.

Cubeta para el tampón de lavado.

Tampón de lavado: SSC 20x (BioRad).

Solución de laurilsulfato sódico (SDS) al 20%.

Autorradiografía.

Técnica.

Tras el lavado de la membrana se secó ésta con papel de filtro, y posteriormente fue envuelta en papel de celofán. Después fue introducida en el cassette de autorradiografía. Sobre la membrana colocamos una película y guardamos el cassette a -80 °C. Tras un período de exposición que, dependiendo del grado de marcaje de la sonda y de la radiactividad medida con un contador Geiger-Müller, varió entre un día y una semana, se procedió al revelado de la película. Para ello primero se sacó el cassette del congelador y se dejó atemperar a temperatura ambiente. Una vez atemperado abrimos el cassette y extrajimos la película introduciéndola en el líquido de revelado, donde se dejó de 3 a 5 minutos con agitación suave. Posteriormente pasamos la película al agua, donde se enjuagó durante unos 30 segundos. De ahí pasamos al líquido fijador donde se mantuvo también con agitación de 3 a 5 minutos, para finalmente limpiar en agua donde mantuvimos la película 5 minutos. Después secamos la película en la estufa a 60

MATERIALES Y MÉTODOS

°C e identificamos la posición de las bandas ribosomales 18S y 28S al comparar con la membrana.

Materiales.

Películas Kodak X-OMAT (New Haven, CT, EEUU)

Líquido revelador Ultrafin (Tetenal).

Líquido fijador Superfix (Tetenal).

Estufa.

3.2.7.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

3.2.7.1.- Amplificación de DNA

La técnica de PCR permite la amplificación *in vitro* de fragmentos concretos de DNA utilizando cebadores específicos de la secuencia. Dependiendo de la enzima usada y de la secuencia a amplificar se aplican diferentes protocolos que tienen en común la existencia de un número dado de ciclos que constan de los pasos:

- Desnaturalización: Consiste en la separación de la doble hebra de DNA en dos hebras complementarias por calentamiento.
- Hibridación: Paso en el que los cebadores se unen al DNA desnaturalizado previamente en aquellas zonas en las que exista complementariedad y que estarán flanqueando la zona que se pretende amplificar.
- Elongación: Paso en el que la DNA polimerasa añade nucleótidos para producir la hebra complementaria a aquella donde se ha unido el cebador. Los productos de cada ciclo de amplificación serán desnaturalizados, empezando un nuevo ciclo de amplificación. Teóricamente, para un número n de ciclos, se obtendrán 2^n hebras del producto por cada secuencia inicial.

Técnica.

Se mezcló en un tubo de 0,2 mL una cantidad de DNA que variaba dependiendo del experimento a realizar (excepto en el tubo de control negativo, donde se añade agua bidestilada estéril), 5 μ L del tampón de la DNA polimerasa, 1 μ L de la mezcla de desoxinucleótidos, 2 μ L de la solución de cloruro de magnesio, 1 μ L de una solución 10 mM de los correspondientes cebadores, 0,5 μ L de la DNA polimerasa y completamos hasta 50 μ L con agua bidestilada autoclavada.

A continuación se aplicó un pulso para mezclar bien los componentes de la reacción y se colocaron los tubos en el termociclador aplicándosele un protocolo de temperaturas que varió dependiendo del producto que esperamos obtener y de las características de los cebadores, aunque las condiciones estándar de amplificación pueden resumirse en un ciclo de desnaturalización inicial (94 °C, 5 minutos), seguido de un número variable de ciclos compuestos de desnaturalización (94 °C, 30-60 segundos), hibridación (50-60 °C, 30 segundos) y elongación (72 °C, 60 segundos/ kilobase del producto amplificado), y que acaba con una elongación final (72 °C, 10 minutos).

Los productos obtenidos fueron usados inmediatamente o bien guardados a -20 °C hasta su uso.

La temperatura de hibridación empleada fue la temperatura media de fusión (T_m) de los cebadores empleados menos 5 °C. El número de ciclos empleado dependió del uso posterior del producto amplificado: cuando se usó para su secuenciación se usó un número final de ciclos de 30-35 ciclos, mientras que si se pretendía la semicuantificación de la expresión del mRNA se usó un número similar de ciclos pero se extrajeron alícuotas desde el ciclo 20 hasta el 30 para su análisis en geles de agarosa.

En los casos en los que se pretendía clonar el producto que se obtuviera de la reacción de PCR, como cuando se obtuvo el promotor de *RND3*, los cebadores tenían en los extremos sitios de restricción para que el producto fuera digerido y clonado en el vector de interés digerido con esas mismas enzimas. Dado que los sitios de restricción no hibridaban con la hebra molde, se procedió en los primeros

MATERIALES Y MÉTODOS

cinco ciclos a usar una T_m de la zona que hibridaba realmente, y posteriormente, una vez que se hubieran producido algunos productos con los sitios de corte, se aumentó la temperatura de hibridación a la T_m del cebador completo. Además la cantidad de nucleótidos se disminuyó a la mitad para disminuir la posibilidad de que la DNA polimerasa introdujera mutaciones.

Materiales.

Tubos eppendorf de 200 μ L para PCR.

dNTPs 10 mM de cada uno: dATP, dCTP, dTTP y dGTP.

Cebadores *forward* y *reverse* (Sigma-Genosys).

Tampón de la polimerasa 10x.

Cloruro de magnesio 25mM.

DNA polimerasa.

3.2.7.2.- Estudio de la expresión de genes por RT-PCR

Técnica.

El estudio de la expresión de genes a nivel de mRNA incluye el aislamiento del RNA total, la reacción de transcripción inversa del mRNA a cDNA y la amplificación del DNA diana por PCR.

Para determinar la expresión de diferentes GTPasas pequeñas a nivel de mensajero se emplearon los siguientes cebadores:

- para *RND3* humano:

RND3F: 5'-GTAGAGCTCTCCAATCACAG-3'

RND3R: 5'-CATCACAGTGCAGCTGTTCG-3'

- para *Arhe* de rata:

ArheF: 5'-ATGAAGGAGAGAAGAGCCAGC-3'

ArheR: 5'-AGCACCATTCAAAGCGTGGAC-3'

- para *NRAS* (humano) y *Nras* (de rata):

NRasF: 5'-TCCAGCTAATCCAGAACCAC-3'

NRasR: 5'-AACTCTTGGCCAGTTCGTGG-3'

- para *HRAS* (humano):

HRasF: 5'-ATTCCTACCGGAAGCAGGTG-3'

HRasR: 5'-ACACTTGCAGCTATGCAGC-3'

- para *RRAS* (humano) y *Rras* (de rata):

RRasF: 5'-AGACACACAAGCTGGTGGTC-3'

RRasR: 5'-CACGTTGAGACGCAGTTTGG-3'

- para *RAC2* (humano):

Rac2F: 5'-CCATCAAGTGTGTGGTGGTG-3'

Rac2R: 5'-ACCAGGATGATGGGTGTGCT-3'

- para *Rab35* (de rata):

Rab35F: 5'-GGTTTACGACGTCACCAGTG-3'

Rab35R: 5'-TCGTGAGCTTCACCACATCG-3'

MATERIALES Y MÉTODOS

- para *RHOA* (humano) y *Rhoa* (de rata):

RhoAF: 5'-CCTGATAGTTTAGAAAACATCC-3'

RhoAR: 5'-CTTGCAGAGCAGCTCTCGT-3'

Como control interno se empleó la expresión de la gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa (*GAPDH*), utilizándose los siguientes cebadores:

GAPDH-F: 5'-CCCTTCATTGACCTCAACTAC-3'

GAPDH-R: 5'-AGTGATGGCATGGACTGTGGT-3'

Para realizar la comparación de la expresión de los mRNA en las diferentes muestras se utilizó el programa Scion Image Beta 4.02 para Windows, de Scion Corporation, EEUU, según las instrucciones del uso indicadas en la Ayuda del programa.

Materiales.

Tubos eppendorf de 200 µL para PCR.

Desoxinucleótidos 10 mM de cada uno: dATP, dCTP, dTTP y dGTP.

Cebadores *forward* y *reverse*.

Tampón de la polimerasa 10x.

Cloruro de magnesio 25mM.

DNA polimerasa.

Termociclador 9600 ó 9700 de Applied Biosystem.

Scion Image Beta 4.02 para Windows (Scion Corporation, EEUU).

3.2.8.- Procesamiento y manipulación de DNA

3.2.8.1.- Preparación de DNA plasmídico

Técnica.

Las colonias positivas verificadas según el protocolo de la Sección 3.2.5.4. fueron crecidas para obtener la cantidad suficiente de bacterias que nos diese la cantidad de plásmido necesaria para poder secuenciarlo. El crecimiento se dio durante unas 16 horas a 37 °C con agitación.

Para ello las colonias seleccionadas fueron crecidas en LB líquido con los correspondientes antibióticos durante toda la noche. Una alícuota del cultivo fue mezclada con glicerol y congelada a – 80 °C para obtener el correspondiente *stock* de glicerol del que poder recuperar el clon cuando fuera necesario. El resto del cultivo fue usado para extraer el plásmido siguiendo los protocolos respectivos de los *kits* comerciales CONCERT™ Rapid Plasmid Miniprep System o GFX™ Microplasmid Prep Kit. Básicamente, las bacterias fueron centrifugadas y posteriormente resuspendidas en una solución de resuspensión. A continuación se añadió la solución de lisis que rompiera las membranas bacterianas, y después se añadió una solución neutralizadora. Se eliminaron los restos bacterianos por centrifugación y el sobrenadante se filtró por una columna en la que quedó el DNA plasmídico. Éste fue lavado y posteriormente eluido.

Materiales.

Medio LB.

Soluciones de antibióticos

CONCERT™ Rapid Plasmid Miniprep System (Invitrogen).

GFX™ Microplasmid Prep Kit (Amersham, GE Healthcare).

Glicerol (Sigma-Aldrich).

3.2.8.2.- Preparación de DNA genómico

Técnica.

Para la obtención de DNA genómico de linfocitos humanos se usó el método de la extracción salina. Para ello se obtuvo sangre periférica con EDTA como anticoagulante, que fue diluida con suero salino y posteriormente centrifugada. La fase inferior y la interfase fueron lavadas dos veces con tampón de lisis de eritrocitos, tras lo cual los leucocitos quedaron como un sedimento en el fondo del tubo. Estos leucocitos fueron lisados al añadir SDS y proteinasa K junto con tampón de lisis de leucocitos e incubar a 37 °C toda la noche. A continuación se añadió solución de cloruro sódico y se centrifugó la mezcla. El sobrenadante fue mezclado con cloroformo y centrifugado de nuevo. La fase superior, que contiene el DNA, es mezclada con etanol, lo que produce que aparezca una malla de DNA genómico que fue recogida y pasada a un nuevo tubo donde se lavó con etanol del 70%, para posteriormente ser resuspendido en agua bidestilada estéril.

Materiales.

Tampón de lisis de eritrocitos: Tris-HCl pH 7,5 20 mM; MgCl₂ 5 mM.

Tampón de lisis de leucocitos: NaCl 0,4 M; EDTA pH 8 2 mM; Tris-HCl pH 7,5 10 mM.

3.2.8.3.- Electroforesis en geles de agarosa

La electroforesis de los productos de DNA se realizó en geles de agarosa horizontales preparados en tampón TAE (40 mM Tris-base, ácido acético glacial 0,11% (v/v), 1 mM EDTA-Na₂, pH 8) de porcentajes variables dependiendo del tamaño de los fragmentos de DNA esperado.

Técnica.

Se limpió el soporte y la cubeta con etanol al 70 % primero y después con agua bidestilada estéril. El soporte se selló con dos trozos de cinta de autoclave y se colocó el peine. Posteriormente vertimos la solución de agarosa, que había sido

fundida previamente, evitando que se formen burbujas. Esperamos que polimerizara el gel durante 30-45 minutos.

Una vez se produjo la polimerización se retiraron los dos trozos de cinta de autoclave y el peine y se colocó el soporte con el gel en la cubeta, cubriéndolo posteriormente con TAE 1x.

Después cargamos las muestras, que habían sido previamente mezcladas con el tampón de carga, en los diferentes pocillos, evitando hacer burbujas con aire que pudieran expulsar parte de la muestra del pocillo.

Tras haber cargado las muestras se cerró la cubeta y se conectaron los electrodos. Se dejó correr el gel durante aproximadamente una hora a 60-80 V. El DNA, cargado negativamente, migró hacia el ánodo. Los fragmentos migraron a distancias inversamente proporcionales al logaritmo del número de pares de bases de los mismos. Una vez realizada la electroforesis se desconectaron los electrodos, se abrió la cubeta y se introdujo el gel en una solución de bromuro de etidio durante diez minutos, lavándolo después con agua bidestilada durante cinco minutos. Posteriormente se procedió a visualizar el gel en un transiluminador que emite luz ultravioleta (longitud de onda (λ) = 254 nm) para poder ver las bandas de DNA en las que se ha intercalado el bromuro de etidio.

Para poder determinar el tamaño de los fragmentos obtenidos se usaron marcadores de pesos molecular comerciales del fago λ digeridos con HindIII (Invitrogen), PstI (Sigma Aldrich) o con diferentes enzimas para dar fragmentos múltiplos de 100 ó 1000 pb (Biotools).

Materiales.

Solución TAE 1x (40 mM Tris-base, ácido acético glacial 0,11% (v/v), 1 mM EDTA- Na_2 , pH 8).

Soluciones de agarosa en TAE a diferentes concentraciones.

Tampón de carga: sacarosa 40 % p/v en agua destilada estéril con 0,5% de azul de bromofenol.

3.2.8.4.- Purificación de DNA de geles de agarosa

En el gel se puede ver si se obtienen fragmentos de los tamaños esperados por comparación con un marcador de tamaños de DNA.

Cuando se obtienen fragmentos de los tamaños esperados se puede proceder a su purificación del gel de agarosa donde se encuentra.

Técnica.

Se siguió el protocolo indicado en el *kit* QIAquick Gel Extraction Kit. Una vez seleccionada la banda de tamaño esperado se procedió a la extracción de la misma del gel de agarosa usando una cuchilla estéril y se introdujo en un tubo eppendorf de 1,5 mL que había sido previamente pesado. Pesamos el tubo con la banda de DNA y por diferencia obtuvimos cuánto pesaba el fragmento de gel que habíamos cortado.

A continuación se añadieron tres volúmenes del tampón de solubilización QG e incubamos a 50 °C durante diez minutos para que el gel de agarosa se fundiera. Posteriormente añadimos un volumen de isopropanol, mezclamos y cargamos la muestra en una columna con una matriz de gel de sílice provista por el *kit*. Centrifugamos a 13000 rpm durante un minuto lo que permitió que el DNA se uniera a la columna. Después lavamos con el tampón PE y centrifugamos nuevamente para eliminar los restos de etanol que pudieran quedar. Finalmente eluimos con 30 ó 50 µL de agua estéril autoclavada.

Materiales.

Isopropanol.

QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Izasa, S.A.).

3.2.8.5.- Empleo de enzimas de restricción

Técnica.

Se emplearon enzimas de restricción de tipo II para digerir DNA de doble banda para propósitos analíticos (para identificar si el producto tenía un patrón de

digestión esperado) o preparativos (fundamentalmente para su posterior clonación). Las enzimas o endonucleasas de restricción son proteínas que reconocen secuencias particulares del DNA, a las que se unen y cortan en sitios específicos denominados sitios de restricción hidrolizando un enlace fosfodiéster en cada banda.

En general, se digirieron 1-10 µg de DNA con 10-20 unidades de enzima en un volumen total de 20 µL con el tampón apropiado (suministrado por la casa comercial). Esta reacción se realizó durante 1-2 horas a 37 °C. La reacción fue terminada mediante choque térmico o extrayendo el DNA usando fenol:cloroformo. La digestión completa fue confirmada por electroforesis en gel de agarosa.

Materiales.

Tampón 10x de la enzima.

Enzima de restricción.

Agua bidestilada estéril.

DNA de interés.

3.2.8.6.- Clonación de fragmentos de DNA

La clonación de los productos de PCR consta de la ligación de dichos fragmentos tras ser purificados en un plásmido y de la posterior transformación de bacterias competentes con dicha ligación (3.2.2.3.). Puede ser necesario defosforilar el vector para evitar la posibilidad de la religación del vector y disminuir el número de falsos positivos (colonias que crecen porque tienen el plásmido pero no han incorporado el fragmento de interés), sobre todo cuando se pretende obtener transformantes con un vector sin el sistema de selección blanco/azul.

MATERIALES Y MÉTODOS

Defosforilación de los plásmidos linearizados con *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP).

Técnica.

Para evitar la ligación de los extremos de los plásmidos digeridos en las estrategias de clonación, el DNA plasmídico linearizado fue tratado con la enzima SAP. Esta enzima cataliza la hidrólisis de los residuos 5'-fosfato, dejando libres los hidroxilos en posición 5'. Dado que la T4 DNA ligasa requiere residuos 5'-fosfato para formar nuevos enlaces fosfodiéster, la ligación sólo será posible entre los extremos de los vectores y los insertos, pero no entre los propios extremos de los vectores.

La defosforilación se llevó a cabo tras la linearización del plásmido por tratamiento con la/s correspondiente/s enzima/s de restricción. Para ello se dializó la reacción de digestión, se añadió el tampón de la SAP y la propia enzima, y se incubó la muestra a 37 °C durante 30 minutos, tras los cuales se añadió una segunda alícuota de la enzima, incubándose otros 30 minutos. Finalmente, la enzima fue inactivada por calentamiento (68 °C/ 5 minutos) y el DNA recuperado por extracción con fenol:cloroformo y precipitación con etanol.

Materiales.

Tampón de la SAP (USB Corporation, GE Healthcare Bio-Sciences).

Shrimp Alkaline Phosphatase (USB Corporation, GE Healthcare Bio-Sciences).

DNA plasmídico de interés.

Ligación.

Técnica.

Se empleó la enzima DNA ligasa del bacteriófago T4, que cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre un residuo 5'-fosfato de un fragmento de DNA y un 3'-hidroxilo de otro fragmento de DNA. Para ello, en un tubo eppendorf de 1,5 mL mezclamos los siguientes componentes de la reacción: 1 µL del tampón 10x, 1 µL de plásmido (50-200 ng), 150 ng del fragmento de DNA a clonar, 1 µL de T4

DNA ligasa y agua bidestilada estéril autoclavada hasta completar un volumen de 10 μL . La mezcla se incubó durante toda la noche en un baño a 16 °C. Durante este tiempo la enzima catalizó la formación de nuevos enlaces fosfodiéster entre los fragmentos de DNA.

Materiales.

Vector (50-200 ng/ μL).

T4 DNA ligasa.

Tampón 10x de la T4 DNA ligasa.

Fragmento a clonar.

3.2.9.- Análisis de proteínas

3.2.9.1.- Medición de la concentración de proteínas

Para la determinación de la concentración de proteínas se usó el método del ácido bicinconínico (BCA), reactivo que detecta el catión cuproso (Cu^+) que se forma por la reducción mediada por proteínas del catión cúprico (Cu^{2+}) en medio alcalino. El complejo formado por dos moléculas de BCA con un catión cuproso presenta un máximo de absorción en el espectrofotómetro a longitud de onda (λ) = 562 nm, permitiendo de este modo la cuantificación espectrofotométrica de proteínas en solución acuosa.

Técnica.

Se empleó una solución *stock* de albúmina bovina sérica (BSA) en agua bidestilada para preparar los estándares de proteínas. A cada conjunto de estándares y muestras se le añadió 150 μL de solución de trabajo del *kit* de ensayo BCA preparada extemporáneamente. Las soluciones de proteínas fueron incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente, pasados los cuales se midió la absorbancia a 562 nm.

Según los valores de absorbancia de los estándares, se construyó una curva de calibración que fue empleada para determinar las concentraciones de las muestras

MATERIALES Y MÉTODOS

problema. La determinación de concentración tanto de los estándares como de las muestras problema fue realizada por duplicado.

Materiales.

Solución estándar de albúmina bovina sérica (BSA) en agua destilada (1 mg/mL).

Kit de ensayo BCA (Sigma-Aldrich).

3.2.9.2.- Electroforesis de proteínas en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE)

El empleo del detergente dodecil sulfato sódico (SDS) permite que la separación de las proteínas en el gel de poliacrilamida se dé de acuerdo con el peso molecular de las proteínas. El SDS se une a los polipéptidos confiriéndoles una carga negativa directamente proporcional a su tamaño molecular.

Técnica.

La electroforesis de proteínas en geles de SDS-poliacrilamida se realizó en el sistema Mini-Protean II según las instrucciones del fabricante. La electroforesis se llevó a cabo en un sistema discontinuo de tampones que primero concentra las proteínas en un gel concentrador (*stacking gel*) antes de la migración en el gel donde se discriminan las proteínas por tamaños (*resolving gel*).

La preparación de las muestras de proteínas para su electroforesis fue realizada resuspendiendo 25-50 µg de proteínas en tampón de carga 2x. Las muestras así mezcladas fueron incubadas 5 minutos a 95 °C, tras lo cual las muestras fueron enfriadas rápidamente el pasarlas a hielo.

Los geles de SDS-poliacrilamida fueron preparados mezclando los siguientes componentes: agua destilada, tampón Tris-HCl, SDS 10% y solución de acrilamida/Bis (29:1) al 30%. A continuación se añadieron los agentes polimerizantes: persulfato amónico al 10% y TEMED.

Las proteínas separadas en la electroforesis fueron visualizadas empleando el colorante Comassie Brilliant Blue G-250. Para ello el gel con las proteínas fue sumergido en solución de tinción a temperatura ambiente durante varias horas. A

continuación el gel fue desteñado sumergiéndolo en solución decolorante (de la misma composición que la de tinción pero sin el colorante), tras lo cual el gel fue secado en papel de celofán para su conservación.

Materiales.

Sistema de electroforesis Mini Protean II (Bio Rad).

Poliacrilamida en solución: 30% acrylamide/ bis solution (29:1) (Bio Rad).

Solución de dodecil sulfato sódico (SDS) al 10%.

Persulfato amónico (Sigma-Aldrich).

N,N,N',N'-tetrametilenetilendiamina (Sigma-Aldrich).

Marcadores de peso molecular: *Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range* y *Kaleidoscope Prestained Standards* (Bio Rad).

Tampón de carga 2x: 100 mM Tris-HCl pH 6,8; 5% de SDS; 0,2 % de azul de bromofenol, 20% de glicerol, y 10% de beta-mercaptoetanol.

Solución de tinción: Comassie Brilliant Blue G-2500 2%, metanol 40% y ácido acético 15% en agua destilada.

Solución decolorante: metanol 40% y ácido acético 15% en agua destilada.

3.2.9.3.- Técnica de inmunoprecipitación

Técnica.

Esta técnica permite el estudio de la expresión de proteínas poco abundantes en células empleando anticuerpos. Para ello lisamos las células con tampón de lisis y eliminamos los núcleos por centrifugación. El sobrenadante fue tratado con bolitas de sefarosa, que se usan para unir inmunoglobulinas y otras sustancias interferentes en esta técnica.

Las bolitas fueron eliminadas por centrifugación. Al sobrenadante se le añadió el anticuerpo que reconoce la proteína de interés. El complejo proteína-anticuerpo

MATERIALES Y MÉTODOS

fue recuperado al ser atrapado por bolitas de sefarosa-proteína A. A continuación se procedió a la limpieza de las muestras usando tampón de lisis y finalmente se recogieron las bolitas de sefarosa-proteína A a las que se han unido la proteína y el anticuerpo por centrifugación.

El precipitado así obtenido fue desnaturalizado al calentar con tampón de carga y la mezcla obtenida fue cargada en el gel de poliacrilamida, donde se realizó la electroforesis (3.2.9.2.). A continuación se procedió a la transferencia de las proteínas electroforéticamente separadas del gel de SDS-poliacrilamida a un soporte sólido, tal como una membrana de nitrocelulosa.

La membrana de nitrocelulosa fue colocada sobre el gel de poliacrilamida. Posteriormente ambos fueron colocados entre papeles Whatman, esponjas y un soporte de plástico. Las proteínas fueron transferidas por electroforesis hacia el ánodo en tampón de transferencia frío (4 °C).

Los sitios de unión no específicos de la membrana fueron bloqueados por TBS-leche durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación la membrana fue incubada con el anticuerpo primario, lavada con TBS-T tres veces, e incubada con el anticuerpo secundario. Los anticuerpos empleados fueron diluidos en TBS-T-leche.

Posteriormente, la solución quimioluminiscente fue preparada y añadida a la membrana, tras lo cual se colocó una membrana de plástico y la película fotográfica, que fue expuesta durante tiempos variables entre 30 segundos y 15 minutos. Finalmente, se procedió al revelado de la película del modo indicado en la Sección 3.2.6.7., apartado Autorradiografía.

Materiales.

Tampón de lisis: 50 mM Tris-base, pH 7,2, 1% de Tritón X-100, 0,5% de deoxicolato sódico, 0,1% de SDS, 500 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ e inhibidores de proteasas en agua bidestilada estéril.

Anticuerpos primario y secundario.

Películas fotográficas Kodak: Kodak X-Omat AR Film XAR-5 (Sigma-Aldrich).

TBS: se prepara mezclando 8 gramos de cloruro sódico y 2,42 gramos de Tris-Base en un litro de agua, llevando el pH a 7,6.

TBS-leche: a partir del anterior, añadiendo 5 % de leche en polvo.

TBS-T: a partir de TBS, añadiendo 0,1 % de Tween 20.

TBS-T-leche: a partir del anterior, añadiendo 5 % de leche en polvo.

Revelador.

Fijador.

Membrana de nitrocelulosa: Trans-Blot Transfer Medium (Bio Rad).

Tampón de transferencia: 39 mM glicina, 48 mM Tris-base, 0,037 % de SDS y 20 % de metanol en agua destilada.

Sistema de transferencia (Bio Rad).

3.2.9.4- Western Blot

Técnica.

Para realizar esta técnica se requiere primero la transferencia de las proteínas electroforéticamente separadas del gel de SDS-poliacrilamida a un soporte sólido, tal como una membrana de nitrocelulosa.

La técnica es similar a la de la inmunoprecipitación a partir del momento en que se comienza la transferencia desde el gel de SDS-poliacrilamida.

En este caso, los sitios de unión no específicos de la membrana fueron bloqueados por PBS-leche durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación la membrana fue incubada con el anticuerpo primario, lavada con TBS-T tres veces, e incubada con el anticuerpo secundario. Los anticuerpos empleados fueron diluidos en TBS-T-leche a las concentraciones indicadas por los proveedores.

Para el revelado se procede del mismo modo que en el caso de la inmunoprecipitación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales.

Similares a los de la técnica de inmunoprecipitación salvo:

PBS-leche: PBS con 5% de leche.

Kit de quimioluminiscencia: ECL Western Blotting detection reagents (Amersham Biosciences Europe GMBH, GE Healthcare Bio-Sciences, España).

3.2.9.5.- Citometría de flujo

La citometría de flujo consiste en la medida de características físicas y/o químicas de las células u otras partículas subcelulares mientras se hacen pasar en un fluido de una en una en el aparato de medida. Además las células pueden ser separadas en función de las subpoblaciones que forman según sus características por un proceso llamado *sorting*. Esta técnica fue empleada para medir el nivel de apoptosis y la expresión de Rnd3 en las células.

Determinación del grado de apoptosis por anexina V/ yoduro de propidio (PI).

El ensayo para la medición del grado de apoptosis en las suspensiones celulares se basa en el empleo de anexina V, molécula que se une a la fosfatidilserina que es externalizada por las células en los primeros momentos de la apoptosis. Esta técnica presenta las ventajas de ser muy sensible y detectar la apoptosis en las células antes del evento de la degradación de DNA que es visible en electroforesis en geles de agarosa y técnicas como TUNEL (Martin *et al.*, 1995; Vermes *et al.*, 1995). El yoduro de propidio (PI) es un agente intercalante que se une al DNA. Las células sanas o en el inicio de su apoptosis no dejan entrar PI, mientras que aquellas más dañadas sí permiten su paso y de este modo que se unan al DNA, por lo que fluorescerán en la longitud de onda del PI.

Técnica.

Las células fueron recogidas por tripsinización ligera, lavado y centrifugación (células adheridas al sustrato) o por centrifugación directamente (células en suspensión). El sedimento celular fue resuspendido en tampón de unión de

anexina V y posteriormente incubadas en oscuridad con anexina V. Se procedió a la adición de un nuevo volumen de tampón de unión de anexina V y, a continuación, 10 μ L de yoduro de propidio, tras lo cual se midió en un citómetro de flujo. Las figuras típicas de una muestra control y una suspensión celular con apoptosis son las mostradas en la figura 17.

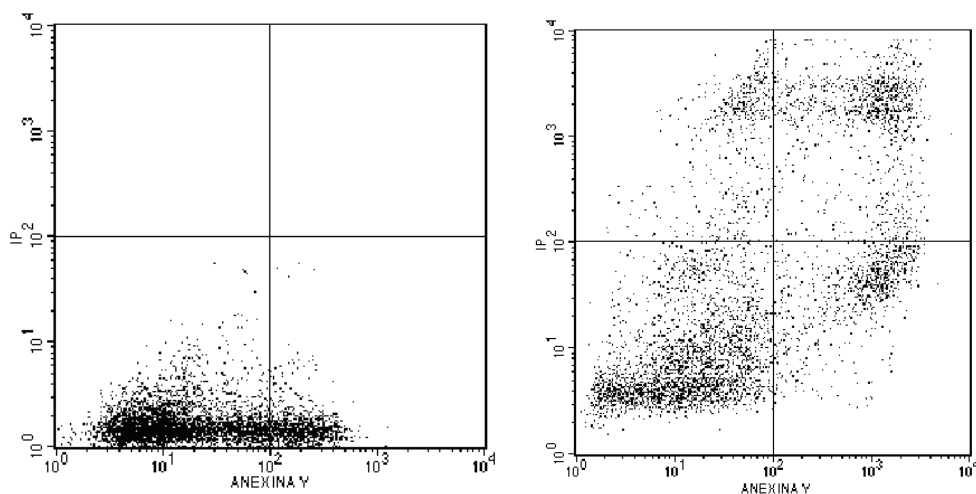


Figura 17.- Imágenes típicas de la determinación de apoptosis por citometría de flujo en muestras de células Caco-2 adherentes (derecha) y células en suspensión (izquierda).

Materiales.

Tampón de unión de anexina: HEPES 10 mM, NaCl 140 mM, CaCl₂ 2,5 mM, pH 7,4.

Solución de anexina V: Annexin V-FITC (Molecular Probes).

Solución de yoduro de propidio (Molecular Probes).

PBS.

MATERIALES Y MÉTODOS

Determinación de la expresión de Rnd3.

Técnica.

Las células fueron recuperadas del modo indicado previamente. El sedimento celular fue lavado con solución de PBS + 1% BSA y pasado a tubos de citometría. A continuación se recuperaron las células por centrifugación. El sedimento fue resuspendido en 9 volúmenes de metanol frío (-20 °C) e incubado a 4 °C durante treinta minutos para permitir la permeabilización de la membrana celular. Después las células fueron lavadas con PBS + 1% BSA dos veces y se procedió al bloqueo de los sitios de unión inespecíficos incubando en PBS + 1% BSA durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación se centrifugaron las células, que fueron resuspendidas en 100 µL de PBS + 1% BSA, donde se añadió el anticuerpo primario que reconoce la proteína Rnd3, e incubamos durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente lavamos con PBS + 1% BSA y centrifugamos para eliminar el exceso de anticuerpo primario, tras lo que resuspendimos las células en 50 µL de PBS + 1% BSA suplementado con anticuerpo secundario conjugado a fluoresceína a la dilución indicada por el proveedor.

Se realizó la medición de las muestras, contándose, en general, 10000 células por tubo. La expresión de la proteína se observa por la presencia de una población de células altamente fluorescentes en el histograma.

Materiales.

PBS.

PBS con 1% de albúmina bovina sérica.

Anticuerpos primario y secundario.

Metanol (Panreac).

3.2.10.- Determinación de actividad de la fosfatasa alcalina

Técnica.

La actividad de la fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1) se determinó en homogenados celulares crudos usando un método espectrofotométrico basado en el uso del compuesto p-nitrofenilfosfato, que es descompuesto en fosfato y p-nitrofenol, compuesto coloreado que puede ser medido a 405 nm.

Para ello, en cubetas de 1,5 mL se mezclaron 25 μ L de la muestra con 1,5 mL de la mezcla de reacción. Se estudió la variación de la absorbancia a 405 nm y a 37 °C cada 20 segundos hasta un total de 5 minutos.

Materiales.

Extractos crudos de proteínas.

Solución reactiva: Tampón dietanolamina 1 M, pH 9,8; $MgCl_2$ 0,5 mM; p-nitrofenilfosfato 10 mM.

Cubetas de plástico.

Espectrofotómetro.

3.2.11.- Medición de la concentración de nucleósidos y nucleótidos

Técnica.

La separación y cuantificación de los nucleósidos presentes en los medios de cultivo se realizó usando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa. De este modo los medios fueron recuperados con una jeringa y filtrados a través de un filtro de 0,45 μ m para eliminar los posibles restos celulares. Se tomaron 40 μ L del medio libre de restos celulares y se inyectaron en el cromatógrafo. Se emplearon dos fases móviles, la 1ª con acetato potásico 0,1 M, pH 4,5, ácido hexasulfónico 2 mM y 1% de acetonitrilo, y la 2ª con ácido potásico

MATERIALES Y MÉTODOS

0,1 M, pH 4,5, ácido hexasulfónico 2 mM y 6% de acetonitrilo. Estas fases móviles también fueron filtradas a través de filtros de 0,45 µm y desgasificadas antes de su uso.

En el caso de los *pools* intracelulares de nucleótidos, se procedió al lavado de las células con PBS y a su posterior congelación con nitrógeno líquido para evitar la degradación de los nucleótidos. Las células fueron pulverizadas y el polvo resultante fue tratado con ácido perclórico 0,6 N frío e incubado durante 45 minutos para precipitar las proteínas. El homogenado obtenido fue mantenido en hielo y posteriormente la fracción insoluble fue eliminada por centrifugación. Tras la centrifugación se recuperó el sobrenadante y se neutralizó con hidróxido potásico 1 N. Los sobrenadantes neutralizados fueron filtrados a través de un filtro de 0,45 µm de tamaño de poro. Posteriormente se procedió a la inyección de 60 µL del sobrenadante filtrado en el cromatógrafo. Se usaron dos fases móviles, la 1ª con fosfato amónico 0,2 M, trietanolamina 0,1 M, pH 6, y la 2ª con fosfato amónico 0,2 M, trietanolamina 0,1 M, pH 6 y 15% de acetonitrilo.

La identificación de los nucleósidos y los nucleótidos se realizó por co-cromatografía con soluciones estándar de nucleósidos y nucleótidos. La determinación y cuantificación fue a 254 nm.

Materiales.

Fase estacionaria: columna Spherisorb ODS-2 (octil-dodecil-sulfato) (Pharmacia-LKB, Suecia).

Fases móviles.

PBS.

Ácido perclórico 0,6 N.

Hidróxido potásico 1 N.

Soluciones estándar de nucleósidos y nucleótidos (Sigma-Aldrich).

Cromatógrafo: compuesto por un módulo de bombas 2249 LC y un detector VWM LKB-2141 (Pharmacia-LKB, Suecia).

3.2.12.- Técnicas de microscopía

3.2.12.1.- Microscopio electrónico

Técnica.

Las células IEC-6 fueron crecidas en membranas de poliéster de 3,0 µm de tamaño de poro cubiertas con Matrigel o con colágeno de tipo I y III. Cuando los nucleósidos fueron añadidos, se aplicó el medio enriquecido a los extremos apicales de las células mientras que los extremos basales fueron mantenidos con medio estándar no enriquecido con nucleósidos.

Tras 6, 12, 24 y 48 horas las monocapas de células fueron lavadas y fijadas con tampón de cacodilato 0,1 M, pH 7,3 con 2,5% de glutaraldehído, y posteriormente fijadas con tetróxido de osmio al 1%. Las monocapas fueron deshidratadas en etanol y embebidas en resina Epon 812. Se tomaron secciones ultrafinas que fueron contrastadas de modo convencional con acetato de uranilo y acetato de plomo y posteriormente examinadas con un microscopio electrónico Zeiss 902.

Materiales.

Membranas de poliéster de 3,0 µm de tamaño de poro (Corning, Cultek, Spain).

Membranas de poliéster de 3,0 µm de tamaño de poro recubiertas de colágeno I y III (Corning, Cultek, Spain).

Matrigel.

Medios de cultivo suplementado y sin suplementar con nucleósidos.

Tampón de cacodilato (0,1 M, pH 7,3) con 2,5% de glutaraldehído..

Tetróxido de osmio.

Etanol.

Resina Epon 812.

Acetato de uranilo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Acetato de plomo.

Microscopio electrónico Zeiss 902.

3.2.12.2.- Microscopio de fluorescencia

Técnica.

Las muestras de células transfectadas con las construcciones del plásmido pDsRed-Express-1 fueron observados al microscopio de fluorescencia en un microscopio invertido.

Para observar la fluorescencia de la proteína roja fluorescente las células fueron cultivadas en medio sin rojo fenol para que el colorante no interfiriese en la determinación de la fluorescencia.

Materiales.

Microscopio Olympus IK70.

Unidad de láser Olympus U-RFL-T.

3.2.13.- Aislamiento de células de la mucosa de intestino de rata

Técnica.

Para los experimentos en que se necesitaban enterocitos de intestino de rata se empleó la técnica desarrollada por Grossmann *et al.* (1998), con algunas modificaciones.

Los animales fueron sacrificados y se extrajo la porción correspondiente al intestino delgado. El intestino fue lavado dos veces haciendo pasar PBS por él con una jeringa. Posteriormente fue abierto longitudinalmente y cortado transversalmente en pequeñas tiras de 2 x 0,5 cm. Dichas tiras fueron sumergidas en solución de ditiotreitól 10 mM en PBS durante 30 minutos con agitación suave a temperatura ambiente.

Posteriormente, las tiras fueron recogidas y sumergidas en EDTA 1 mM en PBS durante 60 minutos con agitación suave a 4 °C. Las células epiteliales fueron separadas de la mucosa mediante 10 fuertes golpes y la solución resultante fue filtrada a través de una malla Sefar Nytel PA-17XXX/80 micras (Sefar Maissa, S.A., España) y recogidas en un vaso de recogida de muestras de orina estéril. El filtro fue lavado con DMEM y las células aisladas de este modo fueron visualizadas al microscopio óptico y sembradas en placas para cultivo de células durante el tiempo de duración de los experimentos.

Como control del efecto de la pérdida de membrana basal se usaron tiras de intestino mantenidas a 4 °C en PBS durante el tiempo de duración del experimento y a las que se les hizo el mismo tratamiento de extracción de células epiteliales.

Materiales.

Malla Sefar Nytel PA-17XXX/80 micras.

Medio DMEM.

Vasos de recogida de muestras estériles.

Tijeras y bisturís.

PBS.

Ditiotreitol 10 mM en PBS.

EDTA 1 mM en PBS.

3.2.14.- Generación de formas mutadas del promotor

Para determinar la importancia de algunos elementos de respuesta se procedió a generar mutaciones en dos de los sitios de unión de elementos de respuesta que nos parecieron más interesantes por su implicación en la apoptosis, como NF- κ B y E2F.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la generación de las mutaciones se empleó una polimerasa de baja tasa de errores para, utilizando como molde el plásmido con el posible promotor de *RND3* insertado, proceder a la síntesis de un nuevo plásmido que tuviera insertada la mutación en el sitio específico de unión del factor de transcripción al emplear en la amplificación cebadores con esa mutación introducida en su secuencia.

Los cebadores empleados fueron:

- para mutar el sitio de unión del factor de transcripción E2F:

E2FmutFW: 5'-CCTCCCGCAGTCGGCTCGGAATTGG-3'

E2FmutRV: 5'-GTTTCACGCTCTCTGCGCG-3'

- para mutar el sitio de unión del factor de transcripción NFκB:

NFκBmutFW: 5'-AAACGCCGAAAGCCTGCCTCCTCTCGC-3'

NFκBmutRV: 5'-CTCCAACAAGTTTTAAGCCTG-3'

Materiales.

Tubos eppendorf de 200 μL para PCR.

dNTPs 10 mM de cada uno: dATP, dCTP, dTTP y dGTP.

Cebadores *forward* y *reverse* (Sigma-Genosys).

Tampón de la polimerasa 10x.

Cloruro de magnesio 25mM.

DNA polimerasa.

3.2.15.- Secuenciación del DNA

Los métodos más comunes para secuenciar el DNA utilizan compuestos llamados terminadores de cadena (método de Sanger). Se trata de didesoxinucleótidos (ddNTPs) que al incorporarse a una cadena que se está sintetizando, son capaces de detener la elongación llevada a cabo por la DNA polimerasa. Los ddNTPs son moléculas parecidas a los nucleótidos normales excepto que carecen del grupo 3' hidroxilo. La DNA polimerasa agrega este nucleótido a una cadena de DNA en crecimiento mediante la formación de un enlace entre el grupo 5' fosfato del nuevo nucleótido y el grupo 3' hidroxilo del nucleótido previo. Seguidamente la enzima no podrá agregar más nucleótidos debido a la ausencia del grupo 3' hidroxilo.

Técnica.

Se tomó DNA plasmídico y se calentó a 55 °C durante 30 minutos para homogenizar la muestra. Se mezclaron entonces en un tubo de PCR 16 µL de BigDye Terminator Mix, 3.5 picomoles del cebador correspondiente y 60-100 ng del DNA plasmídico previamente calentado y completamos hasta 40 µL con agua. Los componentes se pipetearon y se aplicó un pulso, tras lo que se colocaron las muestras en el termociclador sometiénolas a las siguientes condiciones:

1 ciclo: 95 °C/ 5 minutos.

35 ciclos: 95°C/ 30 segundos; 50-55 °C/ 30 segundos; 60 °C/ 4 minutos.

1 ciclo: 72 °C/ 10 minutos.

Finalizar la PCR a 4 °C.

Terminada la reacción se eliminaron los desoxinucleótidos libres filtrando a través de las columnas CentriSep por centrifugación de las muestras durante dos minutos a 2800 rpm, tras lo cual las dejamos secar a temperatura ambiente. Posteriormente

MATERIALES Y MÉTODOS

fueron resuspendidas en 2 μ L de formamida/ EDTA y se inyectó el volumen total en el ABI Prism 377 DNA Sequencer, obteniéndose de este modo las secuencias.

Materiales.

DNA plasmídico linealizado.

ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem, EEUU).

ABI Prism 377 DNA Sequencer.

Solución de formamida / EDTA (5:1).

Columnas CentriSep.

Soluciones de los oligonucleótidos y cebadores (SP6,T7, M13).

3.2.16.- Análisis *in silico*

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media \pm SEM (error estándar de la media). Las diferencias estadísticamente significativas entre las medias se establecieron usando el paquete estadístico BMDP, versión PC 90 (BMDP Statistical Software, UCLA, Los Ángeles, EEUU).

Cuantificación de bandas en geles.

Para la cuantificación de las cantidades relativas de DNA, RNA o proteína en las diferentes técnicas descritas se utilizó el programa Scion Image Beta 4.02 para Windows, de Scion Corporation, EEUU, según las instrucciones indicadas en la Ayuda del programa.

Estudio de promotores y elementos de respuesta.

Existen dos formas de acercarse al estudio de los promotores de eucariotas. La primera se basa en el estudio de la conservación de pequeñas regiones en la secuencia de las regiones reguladoras. El que estas regiones se conserven indican que deben ser importantes en el control de la expresión de genes. Este modelo no requiere ningún conocimiento previo de la biología fundamental del gen (Werner, 2000).

El segundo tipo de modelos se basa en el estudio de sitios conocidos a los que se unen los factores de transcripción. Para estos modelos se requiere la recogida de información de la literatura científica, con lo que se establece un sitio de unión consenso. Estos modelos proporcionan informes detallados con gran cantidad de elementos de respuesta posibles que posteriormente han de ser filtrados para obtener un modelo válido de la regulación del promotor (Frech *et al.*, 1997).

En nuestro caso, para el estudio del promotor humano de *RND3*, hemos seguido un abordaje mixto. Para ello, primero se determinó el inicio de los mensajeros de rata y humano, este último a partir de los datos del mensajero existentes en aquel momento, las ESTs y los abordajes experimentales (técnicas de *primer extension* y RACE).

A continuación se procedió al estudio de la posible región promotora del gen *RND3* humano mediante el análisis comparativo de la región existente por delante del comienzo del mensajero tanto en humano como en rata por medio del software ClustalW v1.82 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) (Thompson *et al.*, 1994a) para determinar las zonas de homología.

A partir de los datos obtenidos en el estudio del inicio de la transcripción de *RND3* fuimos capaces de determinar la localización de la posible región promotora. Esta región fue estudiada usando diferentes programas informáticos que se usan para comparar posibles regiones promotoras y determinar la fiabilidad de que esas regiones sean realmente promotores. Para ello se emplearon distintos programas accesibles en internet: **Neural Network Promoter Prediction versión 2.2**, de marzo de 1999 (www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html), los programas TSSW y TSSG, que buscan promotores humanos, así como su inicio de

MATERIALES Y MÉTODOS

transcripción (www.softberry.com/berry.phtml), **Proscan versión 1.7**, que encuentra promotores de la polimerasa II (<http://thr.cit.nih.gov/molbio/proscan/>), **HCTATA**, que predice cajas TATA en organismos eucariotas (http://l25.itba.mi.cnr.it/~webgene/wwwHC_tata.html), **CISTER**, que identifica algunos elementos de regulación que se unen a regiones promotoras, así como las cajas TATA (<http://zlab.bu.edu/~mfrith/cister.shtml>), **Promoter 2.0**, que encuentra también promotores de la polimerasa II (<http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/>) y la suite **Genomatix Suite** (www.genomatix.de).

Finalmente, se estudiaron los elementos de respuesta existentes en dichas zonas de homología por medio de los softwares GenomatixSuite (al que se puede acceder gratuitamente desde las instituciones públicas en www.genomatix.de) y Transcription Element Search System (TESS, que puede ser usado gratuitamente en <http://www.cbil.upenn.edu/tess/>). Ambos programas emplean algoritmos que identifican secuencias de DNA a las que se pueden unir factores de transcripción por su similitud con matrices creadas a partir de secuencias de DNA conocidas a las que se unen esos mismos factores de transcripción en otros genes.

4.- RESULTADOS

4.1.- Cambios en los niveles del RNA mensajero de Arhe por efecto del Matrigel y los nucleósidos añadidos al medio

Trabajos previos en nuestro laboratorio, usando una modificación de la técnica de *differential display*, permitieron determinar que los niveles del mensajero de *Arhe*, entre otros, disminuían cuando las células IEC-6 fueron diferenciadas sobre Matrigel (Vieites *et al.*, 2005). Otros trabajos realizados por nuestro grupo habían demostrado la existencia de una correlación entre la ingesta de nucleótidos exógenos y la mejora de la actividad intestinal durante el desarrollo y las situaciones de estrés (Ortega *et al.*, 1995a-b, López-Navarro *et al.*, 1996). Debido a estos antecedentes nosotros pretendimos determinar si la adición de nucleósidos al medio de cultivo de las células IEC-6 facilitaría el proceso de diferenciación en estas células, y si esa mejora en la diferenciación se correspondería con cambios en los niveles de *Arhe*.

El proceso de diferenciación fue estudiado usando como parámetros la aparición y mantenimiento de microvellosidades en las células IEC-6 y la existencia de actividad fosfatasa alcalina en los extractos de las células IEC-6.

La adición de nucleósidos produjo una aceleración en la aparición de microvellosidades en las células IEC-6, así como un mayor número y un mantenimiento durante más tiempo frente a las células diferenciadas sobre Matrigel a las que no se les añadieron nucleósidos.

Además, como se muestra en la figura 18, la adición de nucleósidos aumentó la actividad alcalina fosfatasa en extractos de proteínas de células IEC-6 tratadas con medio con nucleósidos frente a aquellas que fueron incubadas con medio no suplementado, tanto en el caso de las células sin diferenciar como en el de aquellas diferenciadas sobre Matrigel. Por otro lado, como era de esperar, la actividad de la fosfatasa alcalina fue mayor en las células diferenciadas sobre

RESULTADOS

Matrigel que en aquellas no diferenciadas, independientemente de la presencia o no de nucleósidos en el medio.

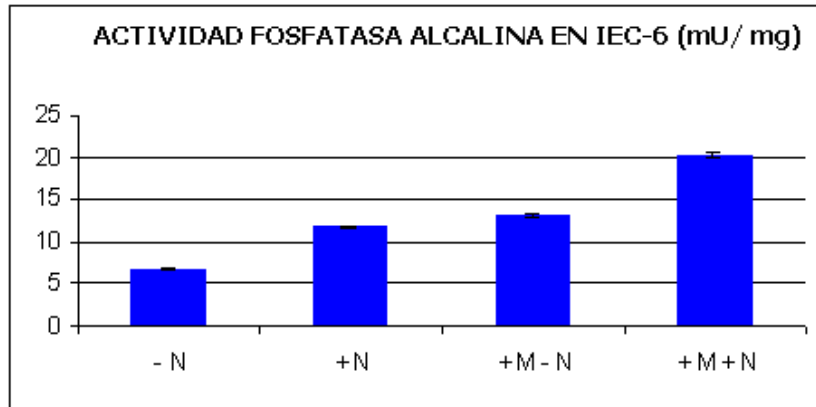


Figura 18.- La adición de nucleósidos favorece el aumento de la actividad fosfatasa alcalina tanto en células crecidas sobre Matrigel como en las crecidas sobre un sustrato de plástico. Además, la actividad es superior en las células crecidas sobre Matrigel (diferenciadas) que en las crecidas en plástico. (-N: células IEC-6 crecidas sobre plástico con medio normal; +N: células IEC-6 crecidas sobre plástico con medio suplementado con nucleósidos; +M -N: células IEC-6 crecidas sobre Matrigel con medio normal; +M +N: células IEC-6 crecidas sobre Matrigel con medio suplementado con nucleósidos).

A continuación, se determinaron los niveles de mRNA de *Arhe* en células control (crecidas sobre plástico sin nucleósidos) y en células diferenciadas sobre Matrigel en presencia y ausencia de nucleósidos. Como se muestra en la figura 19, el mensajero disminuyó en las células diferenciadas frente a aquellas no diferenciadas. La disminución fue más acusada en las células cuyo medio había sido suplementado con nucleósidos, obteniéndose en ellas una disminución mayor para un mismo período de tiempo, efecto que es más notable a las 48 horas.

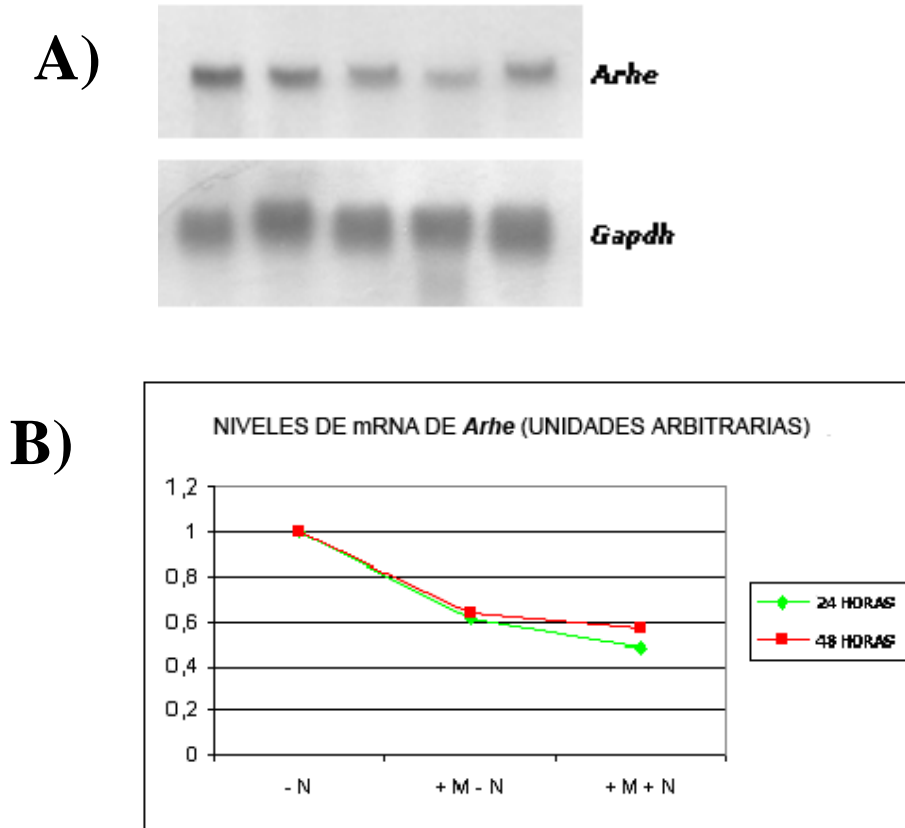


Figura 19.- La adición de nucleósidos favorece la caída en los niveles de *Arhe* en las células IEC-6 crecidas sobre Matrigel, aunque el efecto es mayor a las 48 horas. A) Imagen de Northern Blot de *Arhe* y el control interno *Gapdh*. Las calles corresponden a los RNA de células IEC-6 control, 24 horas sin y con nucleósidos y 48 horas sin y con nucleósidos. B) Gráfica correspondiente a las densitometrías de las bandas del Northern Blot. (-N: células IEC-6 crecidas sobre plástico con medio normal; +M -N: células IEC-6 crecidas sobre Matrigel con medio normal; +M +N: células IEC-6 crecidas sobre Matrigel con medio suplementado con nucleósidos).

Así, observamos que la diferenciación de las células IEC-6 sobre Matrigel produce una gran caída en los niveles del mensajero de *Arhe*, mientras que la presencia de nucleósidos en el medio facilita la diferenciación y, por ello, acelera los cambios en la expresión de *Arhe*.

RESULTADOS

4.2.- Determinación del componente del Matrigel responsable de los cambios en los niveles del mensajero de Arhe

Posteriormente, pretendimos determinar qué elemento (o elementos) del Matrigel eran los responsables de los cambios en la expresión de *Arhe* en las células IEC-6. Para ello procedimos a crecer las células IEC-6 en presencia de concentraciones de diferentes elementos del Matrigel equivalentes a las concentraciones en las que se encontraban en esa matriz extracelular para, a continuación, extraer el RNA y determinar por PCR semicuantitativa el nivel de expresión de *Arhe*, tal y como se ha indicado en los apartados correspondientes de Materiales y Métodos.

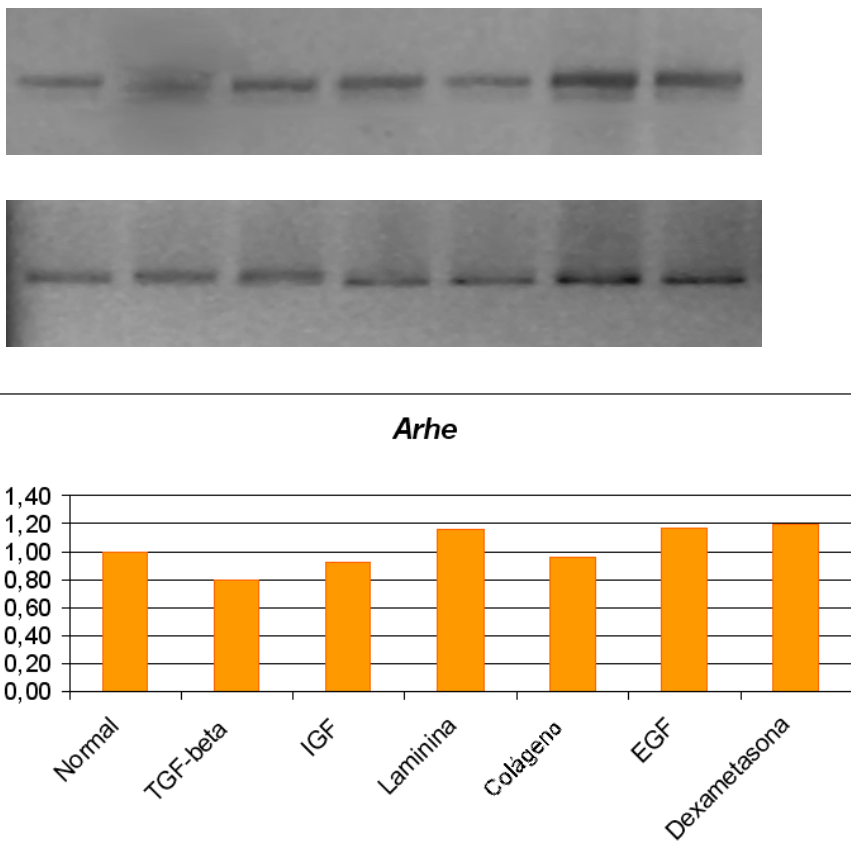


Figura 20.- Imágenes correspondientes a los geles en los que se corrieron RT-PCR de los genes *Arhe* y *Gapdh* (control interno). Los RNA proceden de células control (Normal), tratadas con TGF- β , IGF, laminina I, colágeno IV, EGF y el corticoide dexametasona. En la gráfica se muestran los niveles de expresión relativos de *Arhe* al normalizar por la *Gapdh*.

La cuantificación de los niveles de *Arhe* normalizados por la *Gapdh* permitió determinar que, de los elementos presentes en el Matrigel, tan sólo el TGF- β producía una caída en los niveles del mensajero, efecto similar al producido por el Matrigel (Figura 20). Dado que el TGF- β ha sido implicado en los procesos de diferenciación de diferentes tipos celulares, incluidas las células intestinales, estudiamos más profundamente la expresión de *Arhe* a nivel de proteína por medio de la técnica de inmunoprecipitación. Sin embargo, tras el estudio de la expresión de *Arhe* en células IEC-6 tratadas con TGF- β , no descubrimos ningún cambio a nivel de proteína, ya que, como se puede observar en la figura 21, las bandas presentan la misma densidad en el precipitado de células control (A), tratadas con TGF- β durante 24 horas (B) y durante 48 horas (C), siendo mínima la cantidad de proteína libre que quedó en el lisado antes de la precipitación (D, E y F).

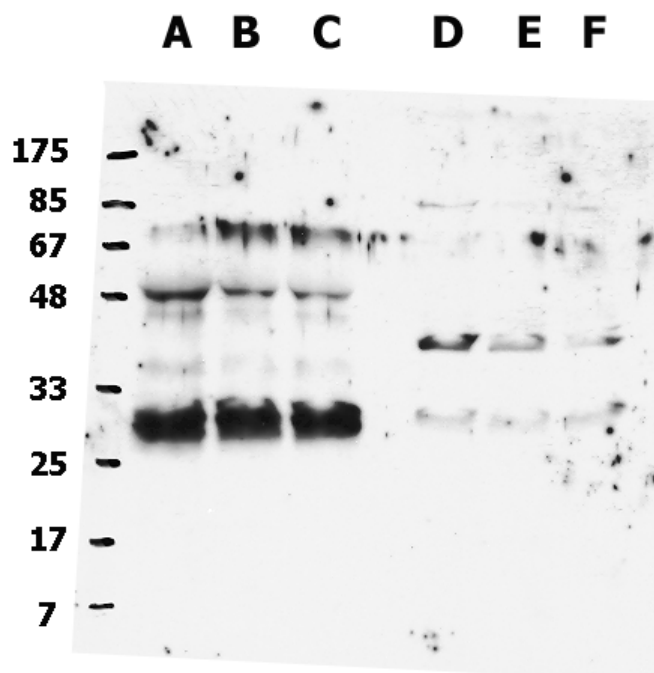


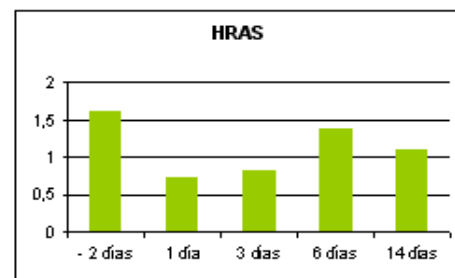
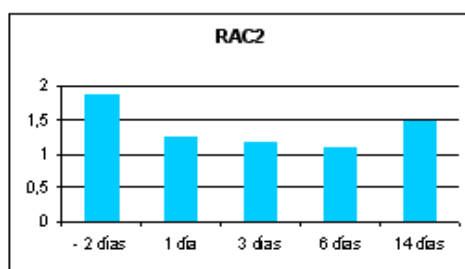
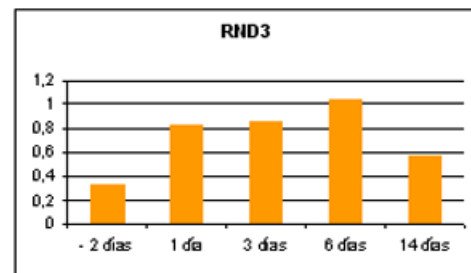
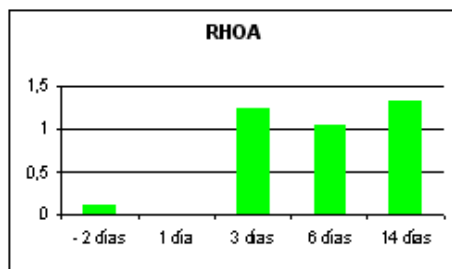
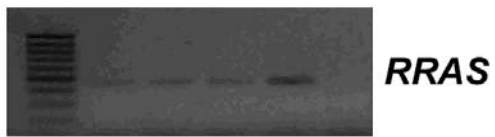
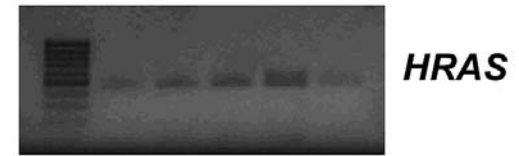
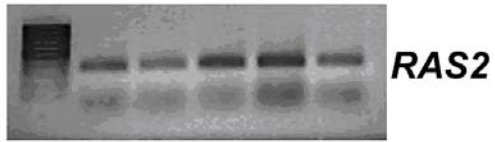
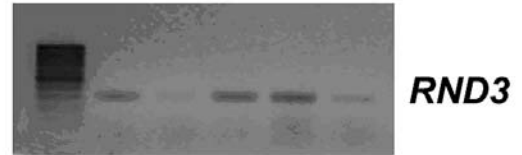
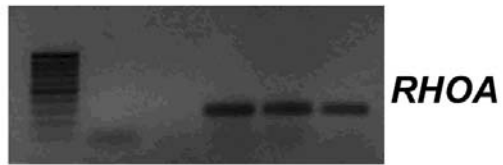
Figura 21.- Autorradiografía correspondiente a la inmunoprecipitación de *Arhe* en células IEC-6 control (A) y tratadas con TGF- β durante 24 (B) y 48 horas (C). En los pocillos D, E y F se cargó el lisado correspondiente a las células IEC-6 control, tratadas con TGF- β durante 24 horas y tratadas con TGF- β durante 48 horas, respectivamente, obtenido previamente a la precipitación de la proteína.

4.3.- Efectos de la confluencia en los niveles de Arhe y otras GTPasas de pequeño tamaño

Dado que, aparentemente, ninguno de los elementos del Matrigel por sí mismo era capaz de provocar la disminución en la expresión de *Arhe* asociada al crecimiento de las células IEC-6 sobre el Matrigel, y dado que en numerosos artículos y en nuestra propia experiencia se ha observado un reordenamiento celular de las células crecidas sobre esa matriz extracelular, decidimos estudiar la posibilidad de que esta matriz provocara un reordenamiento celular que hiciera que las células tuvieran un contacto célula-célula más fuerte. Debido a la interrelación existente entre los miembros de la superfamilia Ras y los cambios en la morfología celular y en la expresión génica asociada a los procesos de diferenciación celular, decidimos estudiar los niveles de varios de estos miembros en esas condiciones por RT-PCR semicuantitativa en células intestinales de rata (IEC-6) y de cáncer de colon humanas (HT29) mantenidas en confluencia durante más o menos tiempo. El empleo de estos tipos celulares vino determinado por el hecho de que en ambas líneas celulares se ha descrito que no se produce un proceso de diferenciación por el mero hecho de mantenerse en confluencia, como ocurre en el caso de las células Caco-2.

En el caso de las células HT29 determinamos la presencia de los mensajeros correspondientes a los siguientes genes: *RHOA* (*ras homolog gene family, member A*), *RND3* (*Rho family GTPase 3*), *RAC2* (*ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 -rho family, small GTP binding protein Rac2-*), *RRAS* (*related RAS viral -r-ras- oncogene homolog*)y *HRAS* (*v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog*). Para hacernos una mejor idea de la variación de los niveles de los diferentes mensajeros en respuesta al tiempo de confluencia crecimos las células HT29 y les extrajimos el RNA a subconfluencia, 1 día, 3 días, 6 días y 14 días de confluencia.

RESULTADOS



RESULTADOS

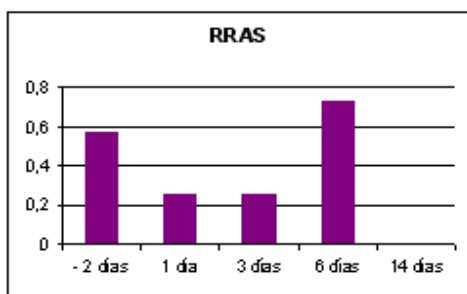


Figura 22.- En la parte superior se muestran imágenes correspondientes a geles de agarosa en los que se corrieron muestras de RT-PCR semicuantitativa correspondientes a los mensajeros de los genes *RHOA*, *RND3*, *RAC2*, *HRAS* y *RRAS*.

En la parte inferior se muestran las gráficas correspondientes a las densitometrías de las bandas de las RT-PCR semicuantitativas normalizadas por la banda correspondiente a la *GAPDH* de esas muestras.

El estudio de los niveles de expresión de los diferentes mensajeros muestra un perfil complejo en la regulación de la transcripción de estos genes en las células HT29 en confluencia. En el caso de *RHOA*, los niveles de transcripción son bajos en las células preconfluentes y en los primeros momentos de confluencia, mientras que aumentan 10 veces a los tres días para mantenerse después durante todo el tiempo del estudio.

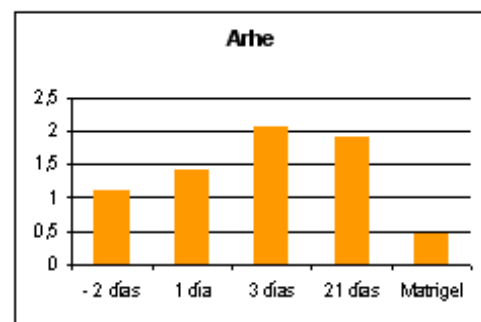
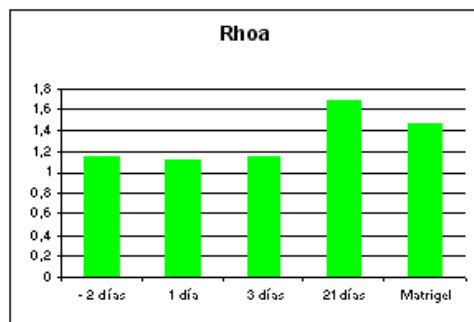
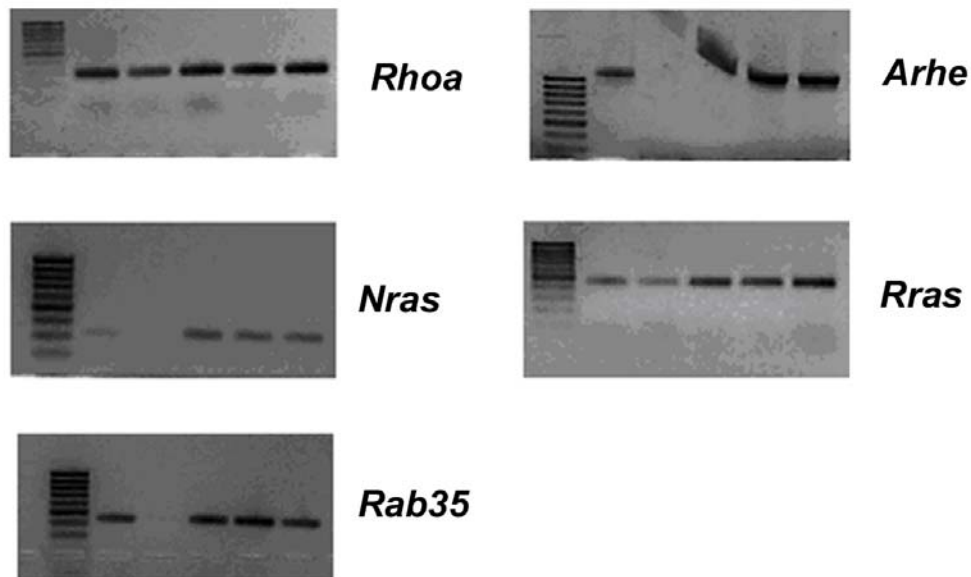
Los niveles de *RND3* aumentan cuando se alcanza la confluencia unas tres veces (el primer día y a los 3 días) y cuatro veces (a los 6 días) para, a continuación, romper esa tendencia al alza y bajar los niveles a los 14 días.

En los demás genes estudiados (*RAC2*, *HRAS* y *RRAS*) la tendencia es más caótica, aunque existe una tendencia general con caídas en los niveles de mensajero tras la adquisición de la confluencia y una recuperación de los niveles (a veces con inducción, como en *RRAS* a los 6 días) a los 6 ó 14 días de confluencia.

En las células IEC-6, los mensajeros cuya presencia y cantidad se determinó fueron *Rhoa* (*ras homolog gene family, member A*), *Arhe* (equivalente en rata a *RND3*, *ras homolog gene family, member E*), *Nras* (*neuroblastoma ras oncogene*), el gen predicho equivalente a *Rras* (*Harvey rat sarcoma oncogene, subgroup R* -

RESULTADOS

predicted-) y el gen predicho equivalente a *Rab35* (*Rab35, member RAS oncogene family -predicted-*). Las células IEC-6 fueron crecidas a subconfluencia (la primera calle en los geles de la figura 23 sin contar el marcador de peso molecular) y a confluencia durante 1, 3 y 21 días (calles 3, 4 y 5). Además, estos resultados fueron comparados con los de células IEC-6 diferenciadas sobre Matrigel durante 24 horas (calle 2).



RESULTADOS

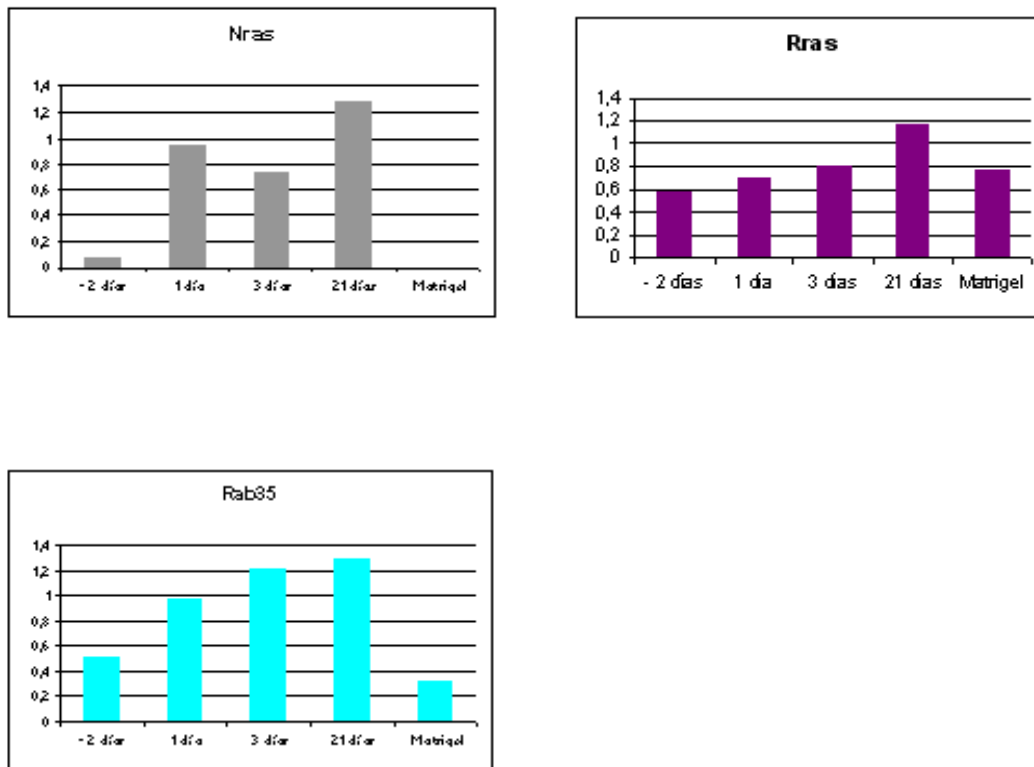


Figura 23.- En la parte superior se muestran imágenes correspondientes a geles de agarosa en los que se corrieron muestras de RT-PCR semicuantitativa correspondientes a los mensajeros de los genes *Rhoa*, *Arhe*, *Nras*, *Rras* y *Rab35*.

En la parte inferior se muestran las gráficas correspondientes a las densitometrías de las bandas de las RT-PCR semicuantitativas normalizadas por la banda correspondiente a la *Gapdh* de esas muestras.

En el caso de *Rhoa*, los niveles de transcripción son bajos en las células preconfluentes y en los primeros momentos de confluencia para, al igual que en el caso de *RHOA* en HT29, aumentar a los 21 días, aunque en una proporción mucho menor. En las células crecidas sobre Matrigel existe un pequeño aumento en el nivel del mensajero de *Rhoa*.

Los niveles de *Arhe* también aumentan cuando se alcanza la confluencia desde el primer momento como ocurre en las células humanas. A los 21 días, y coincidiendo con el aumento de *Rhoa*, se produce una pequeña caída en los niveles de *Arhe*. En las células diferenciadas sobre Matrigel, coincidiendo con los resultados previamente obtenidos, existe una fuerte caída en la cantidad de mensajero (aproximadamente un 50%).

En el caso de *Nras*, *Rras* y *Rab35*, la tendencia general es un aumento en los niveles de los mensajeros conforme pasa el tiempo de confluencia (salvando la banda correspondiente a los tres días en *Nras*). En las células crecidas sobre Matrigel existe una fuerte disminución para *Nras* y *Rab35*, como ocurre con *Arhe*, mientras que en el caso de *Rras* existe un ligero aumento, como ocurre con *Rhoa*.

4.4.- Cambios en los niveles de *Rnd3* en células epiteliales intestinales sometidas a anoikis

Se han descrito cambios en la expresión de *RND3* durante la apoptosis en diferentes células (Akashi *et al.*, 2000; Villalonga *et al.*, 2004; Bektic *et al.*, 2004). Para completar el estudio de la expresión de *RND3* en células intestinales se procedió a estudiar la relación entre la apoptosis en células epiteliales intestinales humanas y la expresión de este gen. La inducción de la apoptosis en la línea celular Caco-2 fue realizada por dos métodos: adición de butirato sódico al 5% al medio de cultivo de las células y mantenimiento de las células en suspensión durante 20 horas.

Como se ha descrito en la Introducción, la adición de butirato a concentraciones fisiológicas al medio promueve la diferenciación de las células, así como la aparición de un porcentaje variable de células apoptóticas en suspensión. Cuando nosotros añadimos butirato a un cultivo de células Caco-2 durante 24 horas no observamos un aumento en el porcentaje de células en apoptosis. Sin embargo, cuando este tratamiento se mantuvo durante 72 horas se percibió la aparición de un mayor número de células en apoptosis, así como una disminución en la cantidad de células sanas. La adición del inhibidor Z-VAD-FMK a concentración 100 μ M no dio lugar a una disminución en la cantidad de células apoptóticas ni en células controles ni en células tratadas con butirato (Figura 24).

RESULTADOS

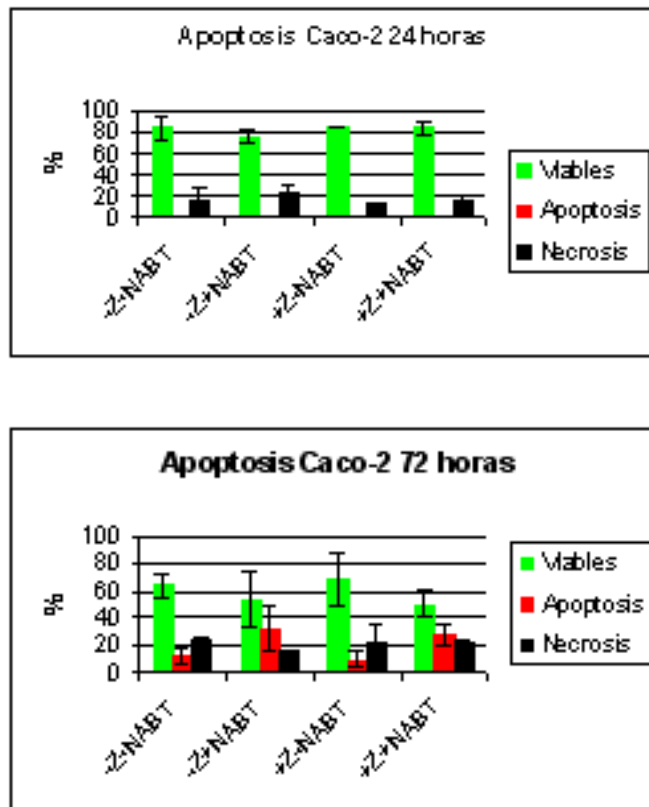


Figura 24.- Determinación de apoptosis por el método de la anexina V-yoduro de propidio en células Caco-2 tratadas con butirato sódico 5 mM durante 24 (arriba) y 72 horas (abajo). Se determinó la apoptosis en células control (-Z-NABT), tratadas con butirato (-Z+NABT), tratadas sólo con Z-VAD-FMK 100 μ M (+Z-NABT) y tratadas con butirato y Z-VAD-FMK (+Z+NABT).

Cuando determinamos la porción de células Caco-2 que presentaban un mayor porcentaje de células en apoptosis, obtuvimos que las células en suspensión mostraron un porcentaje ligeramente mayor de células apoptóticas (sobre todo en la apoptosis tardía) que aquellas que permanecían pegadas al sustrato, y una menor cantidad de células viables (Figura 25).

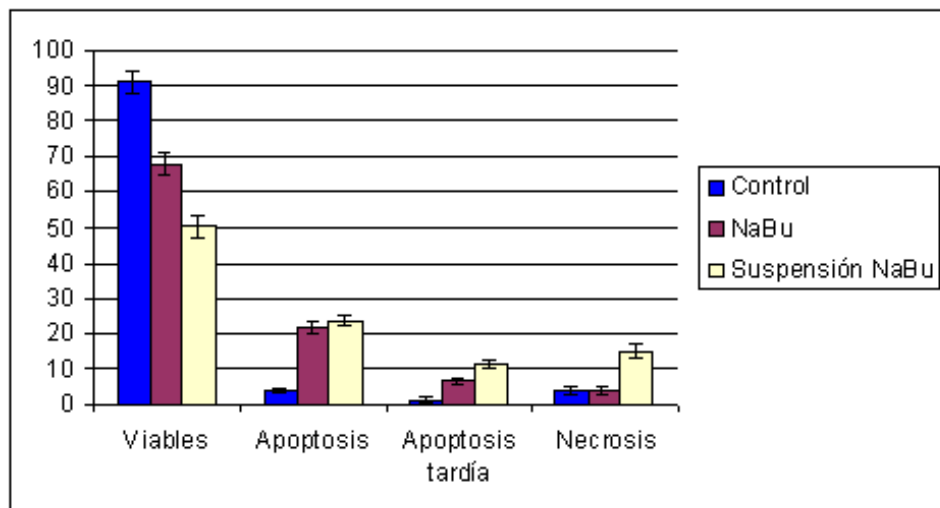


Figura 25.- Determinación de apoptosis en células Caco-2 controles, Caco-2 tratadas con butirato sódico 5 mM que permanecieron pegadas al sustrato (NaBu) y Caco-2 tratadas con butirato sódico 5 mM que se despegaron (Suspensión NaBu). Se observa una disminución en la viabilidad celular en las células tratadas con butirato, que es mayor en las células que se despegaron del sustrato.

La inducción de la muerte de células intestinales al mantenerlas en suspensión es un método que ha sido poco usado en Caco-2 (Morozevich *et al.*, 2003), pero muy usado en otros tipos de líneas celulares intestinales, como las IEC-18 (Krestow *et al.*, 1999; Joseph *et al.*, 2005), y en enterocitos aislados de intestino (Grossmann *et al.*, 1998). Debido a estos resultados nuestros en los que aparecía que la mayor proporción de células apoptóticas eran las que estaban en suspensión y a los resultados de otros grupos, decidimos estudiar la relación que podía haber en las células Caco-2 entre la suspensión, la aparición de apoptosis y los cambios en la expresión de *RND3*, dado que la muerte por suspensión de células Caco-2 proliferantes sería un método en el que no interfiriera la diferenciación causada en estas células por el butirato.

Por lo tanto, lo primero a lo que procedimos fue a caracterizar este modelo de inducción de apoptosis. El mantenimiento de las células Caco-2 en suspensión durante 20 horas en medio completo a 37 °C en agitación indujo la muerte celular

RESULTADOS

a niveles claramente superiores (del 35 al 45%) a los obtenidos empleando el butirato sódico (del 20 al 30%) (Figura 26).

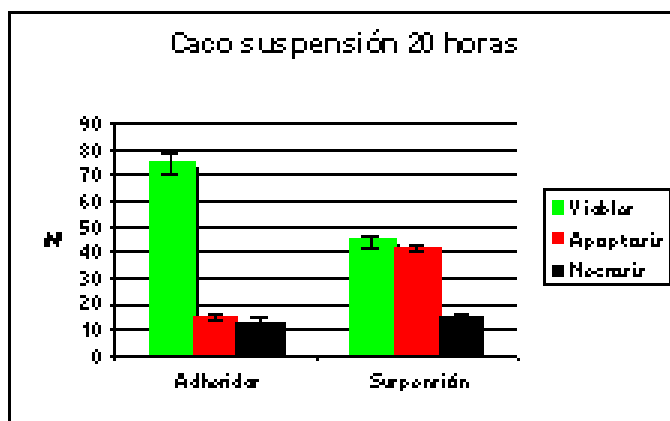


Figura 26.- Las células Caco-2 en suspensión sufren un proceso de apoptosis que lleva a una caída de un 30% en la viabilidad celular, con un aumento equivalente en las células apoptóticas totales.

A continuación, decidimos determinar el efecto del inhibidor general de caspasas Z-VAD-FMK en la apoptosis inducida por la suspensión de las células Caco-2, dado que este inhibidor no tenía efecto en la apoptosis producida por el butirato sódico. Por ello, hicimos una curva de concentraciones del inhibidor para determinar a qué concentración actuaría el Z-VAD-FMK en este modelo de inducción de apoptosis. Como se puede observar en la figura 27, la adición de Z-VAD-FMK a concentraciones de 100, 200 ó 500 μ M produjo un marcado aumento en la viabilidad celular y una disminución en el porcentaje de células apoptóticas, sin existir cambios en el porcentaje de células necróticas. Sin embargo, no se aprecian diferencias en la viabilidad o la apoptosis entre las diferentes concentraciones ensayadas, lo que puede indicar que la concentración de 100 μ M ya es suficiente para saturar la cantidad de caspasas existentes en esas células.

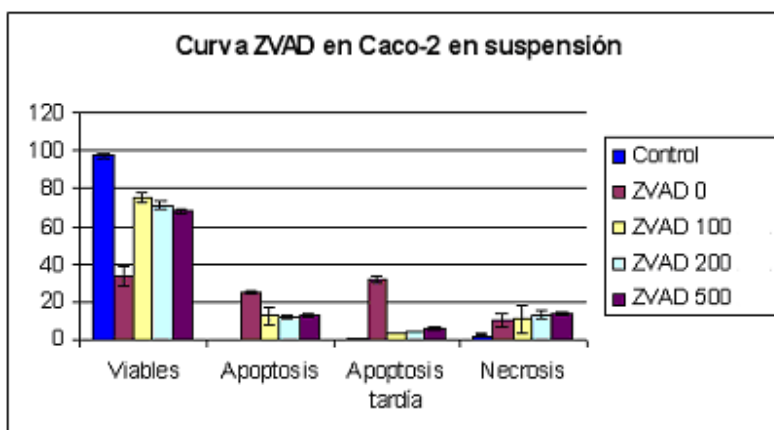


Figura 27.- La adición de Z-VAD-FMK a las células Caco-2 en suspensión reduce la apoptosis de estas células y aumenta la viabilidad celular. Las concentraciones de Z-VAD-FMK se presentan en micromoles/litro.

Una vez verificado que las células Caco-2 en suspensión sufren apoptosis y que ésta puede ser evitada parcialmente con la adición de inhibidores generales de las caspasas, procedimos a estudiar la relación existente entre la apoptosis por pérdida de sustrato (*anoikis*) de las células Caco-2 y la expresión de Rnd3 a nivel de proteína mediante el empleo de la técnica de citometría de flujo. Las células adherentes tienen una gran expresión de Rnd3, lo que se observa en el histograma de fluorescencia como un población altamente fluorescente (Figura 28).

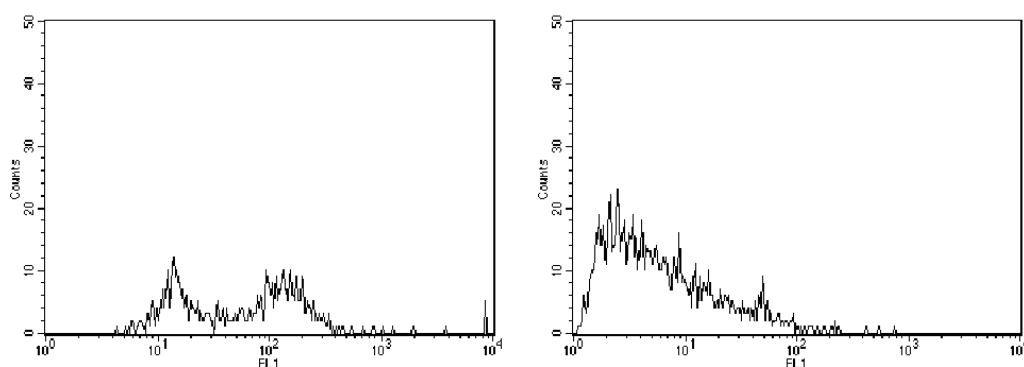
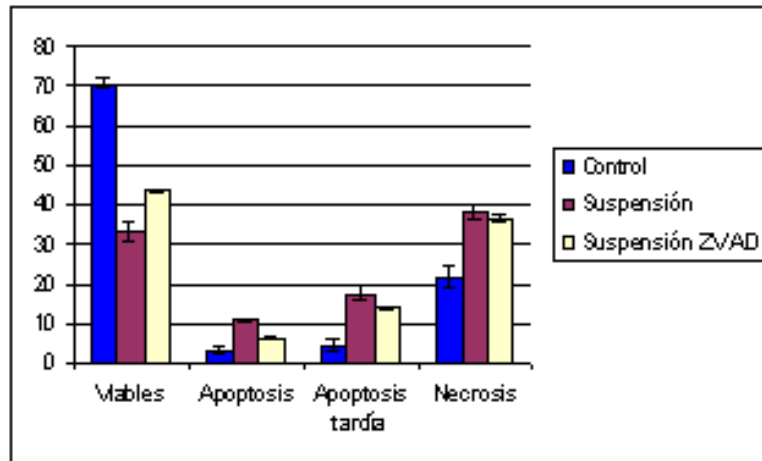


Figura 28.- Histogramas que muestran la fluorescencia de células adheridas (izquierda) y células en suspensión (derecha), en los que se puede observar la clara disminución de la población que emite fluorescencia a partir de la 2ª década en las células que se encuentran en suspensión.

RESULTADOS

La muerte celular por *anoikis* en células Caco-2 se asocia a una disminución en la expresión de Rnd3 en torno al 20-30 %. Sin embargo, el tratamiento de la suspensión celular con Z-VAD-FMK a concentración 100 μ M permite una recuperación parcial en la viabilidad celular y una recuperación total en la expresión de Rnd3 (Figura 29).



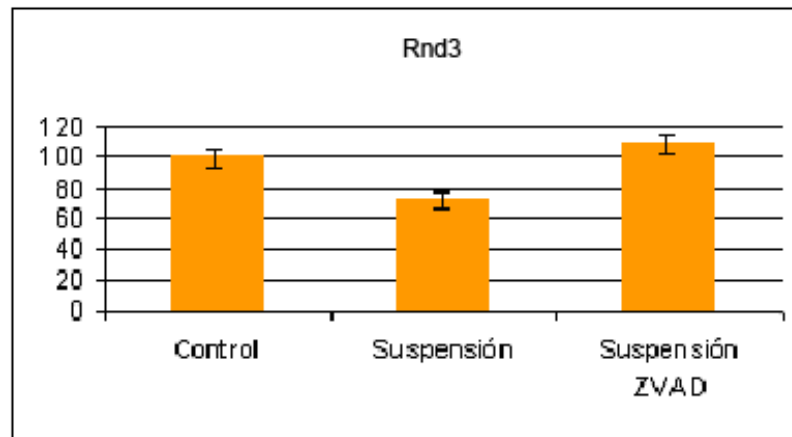


Figura 29.- La expresión de *Rnd3* disminuye cuando las células *Caco-2* sufren anoikis. En la gráfica superior se muestra que la suspensión produce anoikis en las células *Caco-2*, y ésta es parcialmente evitada por la adición del inhibidor de caspasas Z-VAD-FMK. En la gráfica inferior se muestra que la muerte celular conlleva una disminución en los niveles de *Rnd3*, que son recuperados al añadir Z-VAD-FMK. Control: células *Caco-2* control crecidas adheridas al sustrato; Suspensión: células *Caco-2* crecidas en suspensión durante 20 horas; Suspensión ZVAD: células *Caco-2* crecidas en suspensión durante 20 horas en presencia de Z-VAD-FMK 100 μ M. Los datos de la gráfica superior son porcentaje del número total de células, mientras que en la gráfica inferior tomamos como valor 100 el porcentaje de células *Caco-2* adheridas que expresaban *Rnd3*.

4.5.- La expresión de RND3 es regulada a nivel transcripcional

4.5.1.- Determinación del extremo 5' del mRNA: enfoques informáticos y de laboratorio

El estudio del extremo 5' se realizó a través de experimentos de la técnica de la extensión de cebadores (*primer extension*) empleando un cebador marcado con fósforo 32. Este cebador hibridaba en el exón 4 (tercero a partir del ATG inicial) lo que permitió evitar falsos positivos por la presencia de DNA genómico contaminante o de RNA que aún no hubiera sido procesado. La extensión de cebadores ha sido realizada a partir de RNA de intestino y de decidua placentaria humanos, dado que en el intestino de rata identificamos la expresión diferencial

RESULTADOS

del mensajero de *RND3* y a la existencia de una regulación compleja de la expresión de este gen en la placenta.

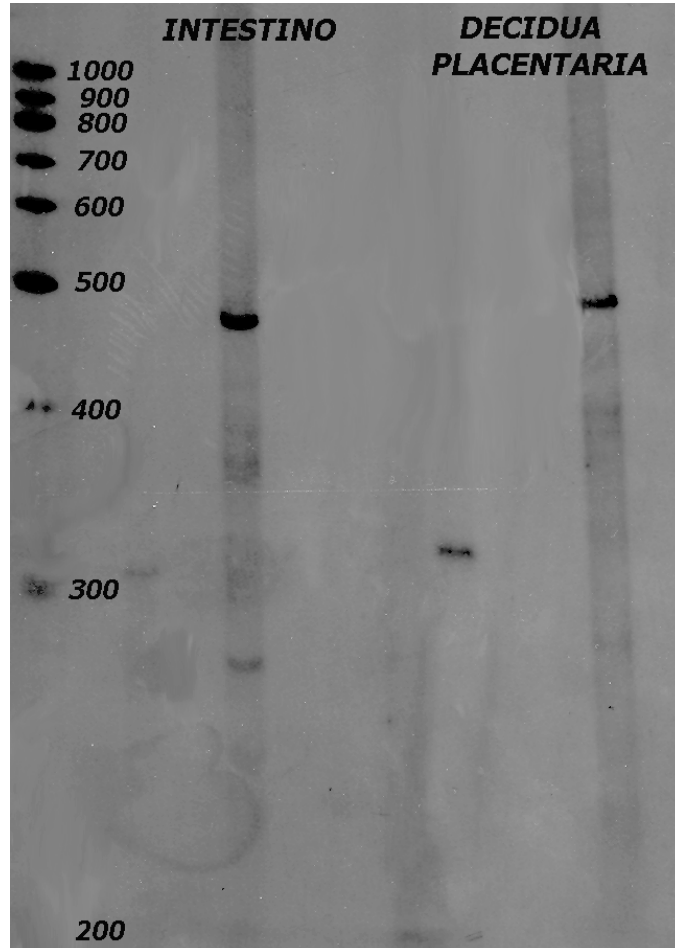


Figura 30.- Autorradiografía de un gel en el que se corrió una extensión de cebadores de *RND3*. Se observa la existencia de una sola banda entre los 400 y los 500 pb.

Como puede observarse en la figura 30, aparece una sola banda entre las 400 y las 500 bases. Este resultado se repitió en otros experimentos utilizando diferentes RNA. Además, coincidió con el inicio del mensajero predicho por Strausberg *et al.* en 2002. Para comprobar ese inicio se pidieron dos cebadores, uno en las posiciones +16 y +37 (que hibridaba en el extremo 5' del mensajero, fue llamado RND3-5-genom y tiene de secuencia 5'-GGCTCGGAATTGGACTTGGG-3') y otro en las posiciones -11 y +9 (que híbrida sólo parcialmente en el mensajero de *RND3*, fue llamado RND3-5-UTR y tiene de secuencia 5'-

GTGAGGAGTCAGGCTTAAAAC-3'). En la figura 31 se observa que aparece la banda esperada sólo en el caso de usar como *forward* el cebador presente en el mensajero, y no existe producto si se usa el cebador que híbrida sólo parcialmente en el mensajero.

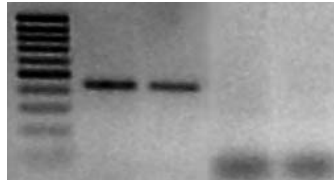


Figura 31.- Gel con PCR para determinar el inicio de RND3 (ver texto para más detalles). La primera calle es el marcador de peso molecular de 100 pb de Biotools, las dos siguientes corresponden a la PCR con el cebador entre las posiciones +16 a +37, las dos siguientes (sin producto) corresponden a la PCR con el cebador entre las posiciones -11 y +9.

De todos estos resultados se deduce que el inicio del mensajero de *RND3* se encuentra entre las posiciones -11 y +16 del inicio indicado en PubMed.

4.5.2.- Aislamiento y estudio de la región promotora

Todos los programas de predicción de promotores, a excepción de Promoter 2.0, identificaron la presencia de un posible promotor de *RND3* en la región entre 2000 pb antes del inicio de la transcripción y 200 pb por detrás, apareciendo dos zonas principales de probabilidad para la caja TATA, en torno a -121 pb y -46 pb desde el inicio de la transcripción.

RESULTADOS

PROGRAMA	COMIENZO(S) DE CAJA TATA PREVISTAS
Neural Network Promoter Prediction	-326, -210, -123 , -7
HCTATA	-472, -336, -326, -280, -115 , -46 , 144, 158, 170
CISTER	-116 , -47 , 135, 148
TSSW	-47
TSSG	-47
Proscan v1.7	-116
Promoter 2.0	Ninguna señal significativa

Tabla 1.- Cajas TATA previstas por los diferentes programas bioinformáticos usados para predecir el promotor de RND3. En negrita se señalan las dos localizaciones más frecuentes.

De hecho, la Suite GenomatixSuite predijo un promotor que se encontraba entre las posiciones -569 y +101. Debido a estos resultados, decidimos clonar la región entre -750 pb y +250 pb para el estudio de su actividad como promotor, tanto en pGL3-Basic como en pDsRed-Express-1. Dicha secuencia fue analizada con los *software* MatInspector y TESS, determinándose los posibles sitios de unión de factores de transcripción importantes, que son mostrados en la figura 32. Los resultados obtenidos al emplear MatInspector se muestran en el anexo 1.

CTCCCCTCACTGCAAATGTGGGGAGGTGCAACTAAGCTGACAAGTGTGTTGGGTCC
 CTAGCGCAGTAGGGTTGAGTTTCCAATGGCCTTTGTCACTCAGTCATGGGCATCT
 TCCACTTCTCTTTCTTCTCCCCTCCCACCTCCTGTACCCACCCCTCGAAACCTTT
 CTGCCTCCACTTGTACGACTGAAACTGACAGGTTTCAGAAGCCAGTCTACTACCG
TGACCCAGGCAAGCCTGTTCTTGCATCTGGAATAAAGAGGCTGATCTATTGGTCC
ATGGCCTATGTACCTGATACAAACCATTAAAAAAAAAAAAATAGAACCCTCAACTA
TTCTCCACCCAAGATTTGCTTCCTATGTTTTATCACTGTCTTTAACTTGGGTGG
GAAATGTTTTTGTTCATAAATGCTCATGAGGCTTCTACAGATAAGCCCCTATT
AACTATATTTAAAGGGATTGTAGTTCAAATCAGTATGCACAGATAACCAGTTTCC
CACCTTGCCCTGTGGACTTGTGAGCAAGCATCTTTGGGATCTTCATGTTGTCTA
AGAGCCTTGGTCTAAAATAGATCCCGAATGGGCACCCTAGAGGGCGCACTGCTTA
CATTTTCGGCATGCAACGCCAACAGCGCTCGCTCCCAGGCTCCATAAAAGGGGAG
GAGGCAGATCAGTTTCTCCTCTCATTGAGAAAGAAGAGGATTGGAAGCCGGGC
GTATAAAGCCGCGCAGAGAGCGTGAACAAAGCAGTCGGCTCGGAATTGGACTTG
GGAGGCGCGGTGAGGAGTCAGGCTTAAAACCTGTTGGAGGGGAGTAACCAGCCTG
CTCCTCTCGCTCTCCTCCTCGTCTGCGCCGCGTTTCAGAGGTTGCCATCAGCCT
 TGTGATTTATTTTATATCTGCTTTTTATAAAGAGAGAAATATATATATATAT
 ATATTTTTTTTTTTCTTCTTAAGAGAAAATTCCTGTTCCAAGAGAAAATAAGGCA
 ACATCAATGAAGGAGAGAAGACC

Figura 32.- Secuencia clonada en los vectores pGL3-Basic y pDsRed-Express-1. En amarillo se representa el primer exón del mensajero. La secuencia subrayada es la del promotor predicho por GenomatixSuite. En rojo y verde se subrayan las regiones donde hibridan los cebadores empleados para la clonación.

El promotor clonado en pGL3-Basic fue transfectado transitoriamente en células HT29, en las que previamente habíamos determinado que se expresa *RND3* a nivel de mRNA, para estudiar su actividad en condiciones normales y en condiciones de confluencia. En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos. Se observa que la actividad de la luciferasa de *Renilla* es similar en todas las muestras, por lo que la eficiencia de la transfección fue similar en todos los casos. Además, se muestra que las células transfectadas con el promotor en pGL3-Basic, tanto confluentes como no confluentes, presentaron una disminución en los niveles de actividad luciferasa de más de 10 veces respecto a las transfectadas con el control y de tres veces respecto al plásmido pGL3-Basic vacío. Dado que esa disminución en la actividad podía haberse debido a la existencia de un inicio anterior al de la luciferasa que estuviera en el promotor en fase con el de la luciferasa del pGL3-Basic, dando lugar a una luciferasa menos activa, procedimos al estudio de las posibles fases abiertas de lectura (ORF, *open reading frame*) que estuvieran en fase con la luciferasa y comprobamos que no existía ese inicio

RESULTADOS

anterior. De ello se deduce que la disminución en la actividad luciferasa se debe a la presencia de la región promotora en el vector.

	Actividad luciferasa <i>P. pyralis</i>	Actividad luciferasa <i>Renilla</i>	Relación
pGL3-Control	2055396	1642766	1,25
pGL3-Basic	492563	1416102	0,35
pGL3-PromRnd3 no confluentes	158806	1539650	0,10
pGL3-PromRnd3 confluentes	154740	1497123	0,10

Tabla 2.- Resultados obtenidos al medir la luminiscencia de la construcción con el promotor de RND3 en pGL3-Basic en células confluentes y no confluentes y los controles vacío y con el promotor de SV40. en la segunda columna se indica la actividad del control de transfección, similar en todos los casos. En la tercera columna se muestra la relación entre ambas luminiscencias. Se muestra la media de dos experimentos diferentes

Posteriormente, clonamos el promotor en el vector pDsRed-Express-1. Este vector permite el establecimiento de clones estables al utilizar geneticina (G-418) para la selección de las células transfectadas. Debido a los resultados que indicaban que el estado de confluencia no influía en la actividad del promotor, transfectamos el plásmido en células Caco-2, donde estudiamos la influencia de la muerte celular por suspensión de las células en la actividad del promotor. Como se observa en la figura 33, la suspensión de las células Caco-2 transfectadas produce una disminución en la fluorescencia observada en el citómetro de flujo a un tercio de la fluorescencia de las células control.

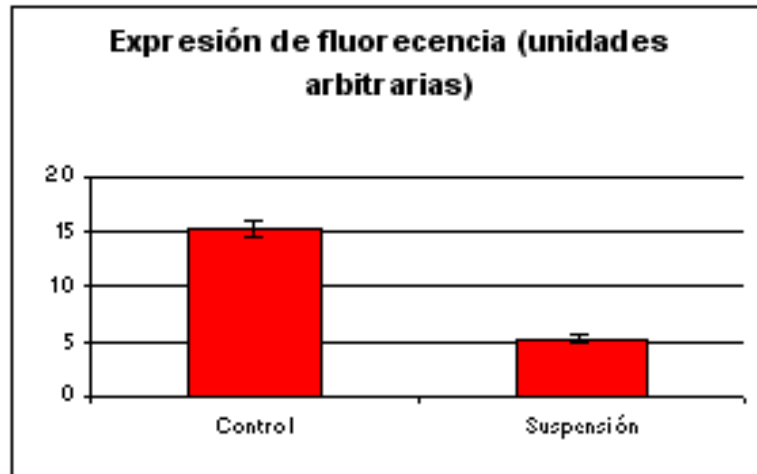


Figura 33.- La actividad del plásmido pDsRed-Express-1 con el promotor de *RND3* disminuye cuando las células Caco-2 sufren anoikis. Control: células Caco-2 control crecidas adheridas al sustrato; Suspensión: células Caco-2 crecidas en suspensión durante 20 horas.

4.6.- El empleo de anticuerpos activadores de las integrinas $\beta 1$ disminuye la anoikis y los cambios de *Rnd3* asociados a ella

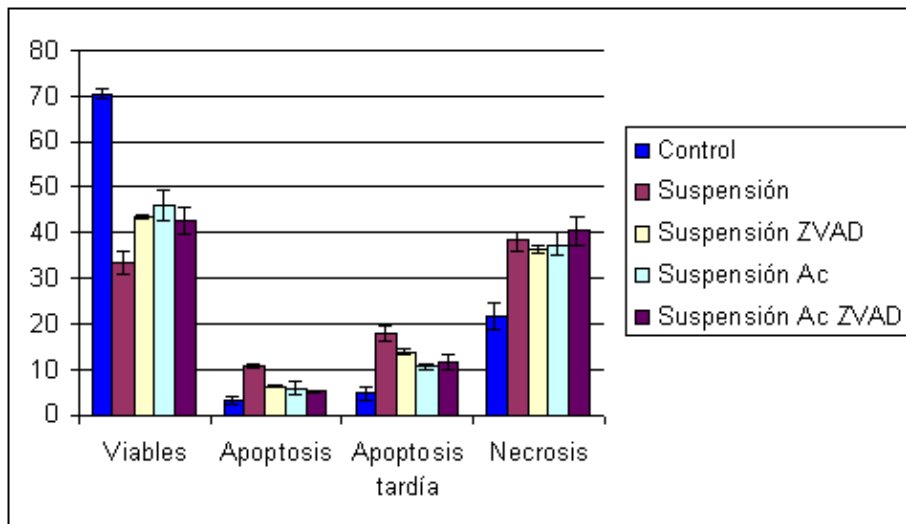
La muerte de las células cuando se encuentran en suspensión se debe, entre otros motivos, a la falta de información de su posición en la matriz extracelular a través de las integrinas. Por ello, quisimos ver el efecto que tendría en las células Caco-2 sometidas a suspensión la adición de un anticuerpo activador de la cadena de integrina $\beta 1$, que es una de las más abundantes en los enterocitos *in vivo* y en las células Caco-2, y que ha sido relacionada con la supervivencia celular a través de la vía de la quinasa de la adhesión focal (FAK).

Además, dado la relación existente entre las integrinas y las proteínas de la familia Rho, y la relación que recientemente está siendo descrita entre *RND3* y la apoptosis, también pensamos que sería probable la existencia de cambios en la expresión de *Rnd3* como consecuencia de la presencia del anticuerpo activador de la integrina.

RESULTADOS

En la gráfica superior de la figura 34 demostramos que la presencia del anticuerpo activador de integrinas con la cadena $\beta 1$ P4G11 produjo una recuperación de la viabilidad celular y una disminución de la apoptosis equivalentes al efecto de la presencia de Z-VAD-FMK a concentración 100 μ M. Estos efectos no fueron aditivos, como demostró el hecho de que las células Caco-2 crecidas en suspensión en medio con Z-VAD-FMK 100 μ M y 10 mg/mL de P4G11 no experimentaran mayor viabilidad celular o menor porcentaje de apoptosis que las células crecidas en medio sólo con el inhibidor de las caspasas o sólo con el anticuerpo activador.

En la gráfica inferior de la figura 34 se puede observar que la adición del anticuerpo P4G11 también produjo una recuperación total de la expresión de Rnd3, dando un porcentaje de células que expresan Rnd3 similar a las células control, aunque la cantidad de células viables sanas no alcanzara el porcentaje de los controles. Sorprendentemente, la presencia del inhibidor de caspasas Z-VAD-FMK y el anticuerpo conjuntamente no aumentó el porcentaje de células que expresaban Rnd3, existiendo incluso una tendencia a una pequeña disminución que no llega a ser significativa.



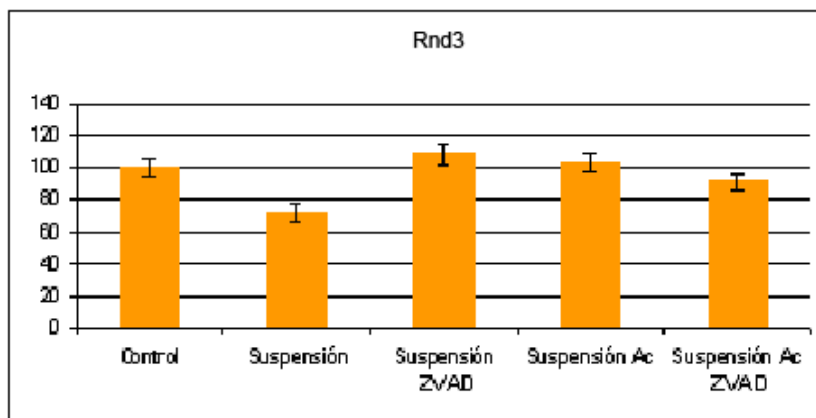


Figura 34.- La adición de un anticuerpo activador de la integrina $\beta 1$ aumenta la viabilidad de las células Caco-2 mantenidas en suspensión, a niveles equivalentes a los del inhibidor de caspasas Z-VAD-FMK. El efecto de ambos compuestos no es aditivo.

En la gráfica inferior se puede observar que los niveles de Rnd3 son similares a los de los controles cuando las células en suspensión son crecidas en presencia de Z-VAD-FMK 100 μM , 10 mg/mL del anticuerpo P4G11 o de ambos conjuntamente.

Control: células Caco-2 control crecidas adheridas al sustrato; Suspensión: células Caco-2 crecidas en suspensión durante 20 horas; Suspensión ZVAD: células Caco-2 crecidas en suspensión durante 20 horas en presencia de Z-VAD-FMK 100 μM ; Suspensión Ac: células Caco-2 crecidas en suspensión durante 20 horas en presencia de 10 mg/mL del anticuerpo activador de las integrinas $\beta 1$ P4G11; Suspensión Ac ZVAD: células Caco-2 crecidas en suspensión durante 20 horas en presencia de Z-VAD-FMK 100 μM y 10 mg/mL de P4G11.

Los datos de la gráfica superior son porcentajes del número total de células, mientras que en la gráfica inferior tomamos como valor 100 el porcentaje de células Caco-2 adheridas que expresaban Rnd3.

A continuación procedimos al estudio del efecto que los inhibidores de la apoptosis producían sobre la actividad del promotor. La adición del inhibidor de caspasas Z-VAD-FMK produjo una moderada recuperación en los niveles de fluorescencia, mientras que este efecto fue aún más evidente tras la adición del anticuerpo activador de integrinas P4G11. De modo similar a lo que ocurría cuando determinamos por citometría de flujo la expresión de la proteína Rnd3, no se observó un efecto sinérgico por el tratamiento de las células en suspensión con el inhibidor de caspasas y el activador de integrinas, sino que, al contrario, se

RESULTADOS

mantuvieron los niveles de fluorescencia que se alcanzaban por la adición de Z-VAD-FMK.

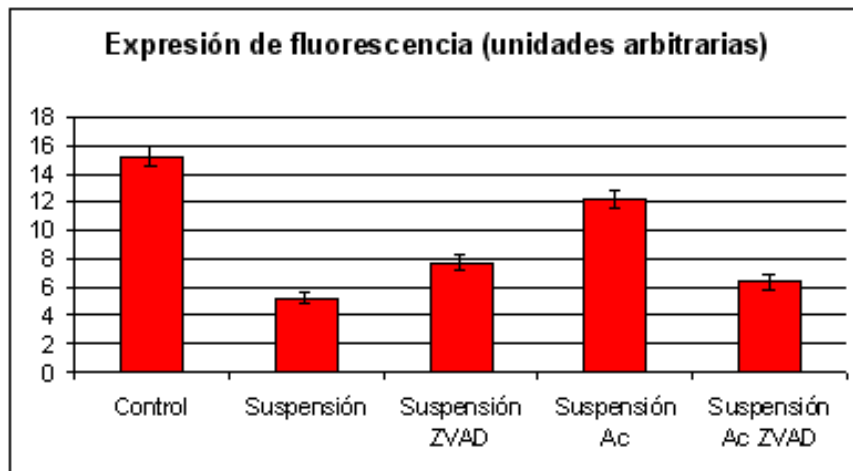


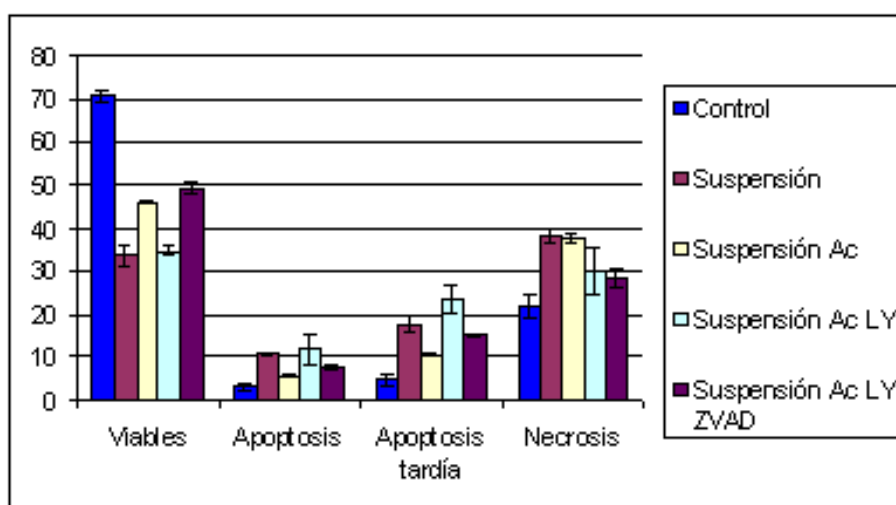
Figura 35.- La adición de un anticuerpo activador de la integrina $\beta 1$ aumenta la expresión de fluorescencia en células Caco-2 transfectadas mantenidas en suspensión, mientras que la adición de Z-VAD-FMK tiene un efecto menor sobre la actividad del promotor. El uso de ambas sustancias juntas no tiene efecto aditivo.

Control: células Caco-2 control crecidas adheridas al sustrato; Suspensión: células Caco-2 crecidas en suspensión durante 20 horas; Suspensión ZVAD: células Caco-2 crecidas en suspensión durante 20 horas en presencia de Z-VAD-FMK 100 μ M; Suspensión Ac: células Caco-2 crecidas en suspensión durante 20 horas en presencia de 10 mg/mL del anticuerpo activador de las integrinas $\beta 1$ P4G11; Suspensión Ac ZVAD: células Caco-2 crecidas en suspensión durante 20 horas en presencia de Z-VAD-FMK 100 μ M y 10 mg/mL de P4G11.

4.6.- El uso de un inhibidor de la vía de la fosfoinositol-3-quinasa (PI3K) elimina el efecto protector de la activación de las integrinas $\beta 1$

La vía de la quinasa de la adhesión focal (FAK) tiene como dos de sus moléculas integradoras de señales más importantes la fosfoinositol-3-quinasa (PI3K) y la AKT. De estas dos moléculas, la que se encuentra por encima en la cascada de señales es la PI3K, por lo que decidimos actuar sobre ella inhibiéndola.

Como se muestra en la gráfica superior de la figura 36 la adición del inhibidor de la PI3K LY294002 a concentración 50 μ M, concentración que inhibe totalmente la PI3K, produjo una caída en la viabilidad de células Caco-2 crecidas en presencia del anticuerpo activador a los niveles de las células crecidas en suspensión en ausencia del anticuerpo, evitando de este modo el efecto protector del anticuerpo. Aún más interesante es el hecho de que los niveles de Rnd3 cayeron en estas condiciones a los niveles de las células en suspensión. La adición del inhibidor general de las caspasas Z-VAD-FMK permitió que se mantuviera la protección frente a la muerte celular, haciendo que el porcentaje de células viables y apoptóticas fuera similar al de células crecidas en suspensión en presencia de Z-VAD-FMK sólo o en presencia del anticuerpo P4G11. Sin embargo, la recuperación de los niveles de expresión de la proteína Rnd3 fue mucho menor y no llega a ser significativa frente a las células en suspensión o crecidas en suspensión con P4G11 y LY294002.



RESULTADOS

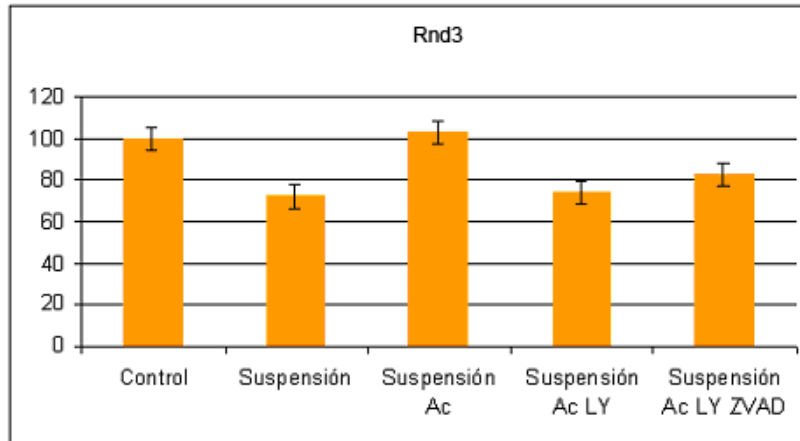


Figura 36.- La adición del inhibidor de la fosfoinositol-3-quinasa (PI3K) LY294002 inhibe el efecto protector del anticuerpo P4G11. En la gráfica superior se muestran los niveles de apoptosis de células Caco-2 crecidas adheridas (Control), en suspensión durante 20 horas (Suspensión), en suspensión con 10 mg/mL del anticuerpo activador de integrinas $\beta 1$ P4G11 (Suspensión Ac), en suspensión con el anticuerpo y LY294002 50 μM (Suspensión Ac LY) y en suspensión con el anticuerpo, LY294002 y Z-VAD-FMK 100 μM .

En la gráfica inferior se muestra el nivel de expresión de Rnd3 en cada una de las condiciones anteriores, y puede observarse que la presencia del inhibidor LY294002 evita el aumento en la cantidad de Rnd3 producido por la presencia del anticuerpo activador y que este efecto no es revertido por la adición del inhibidor de caspasas Z-VAD-FMK.

Finalmente, estudiamos la influencia de la vía de la fosfoinositol-3-quinasa (PI3K) en la actividad del promotor al añadir el inhibidor de la PI3K LY294002 a las células en suspensión tratadas con el anticuerpo activador o con el anticuerpo y Z-VAD-FMK. Se observó que el inhibidor LY294002 evitó el efecto del anticuerpo P4G11 casi por completo, mientras que la presencia del Z-VAD-FMK seguía manteniendo un ligero efecto inductor de la fluorescencia.

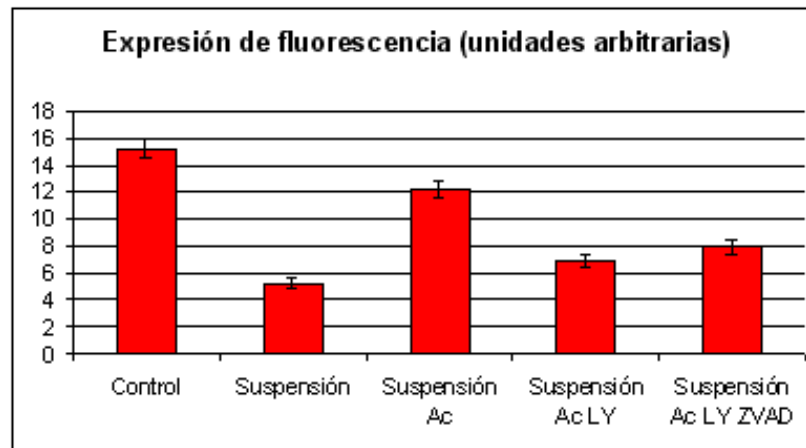


Figura 37.- La adición del inhibidor de la fosfoinositol-3-quinasa (PI3K) LY294002 inhibe el efecto del anticuerpo P4G11, disminuyendo la fluorescencia a niveles similares a los de las células en suspensión. La adición de Z-VAD-FMK en estas condiciones aumenta levemente el nivel de fluorescencia.

Control: células Caco-2 control crecidas adheridas al sustrato; Suspensión: células Caco-2 crecidas en suspensión durante 20 horas; Suspensión Ac: células Caco-2 crecidas en suspensión durante 20 horas en presencia de 10 mg/mL del anticuerpo activador de las integrinas β 1 P4G11; Suspensión Ac LY: células Caco-2 crecidas en suspensión durante 20 horas en presencia de LY294002 50 μ M y 10 mg/mL de P4G11; Suspensión Ac LY ZVAD: células Caco-2 crecidas en suspensión durante 20 horas

4.7.- Actividades de versiones mutadas en sitios de unión de factores de transcripción predichos por programas informáticos

La secuencia clonada fue analizada usando los programas MatInspector de la GenomatixSuite y Transcription Element Search System para detectar sitios posibles de unión de factores de transcripción. Entre los sitios encontrados destacan por su importancia diferentes factores de la familia GATA, que son reguladores generales de la expresión génica, un represor transcripcional de mamíferos (RBP-J κ), relacionado con la vía Notch, implicada en los contactos célula-célula, OCT1, también con una función general en la regulación transcripcional, factores de la familia *fork head*, algunos de los cuales han sido implicados en diferentes enfermedades, E2F, implicado en la división celular y

RESULTADOS

procesos de apoptosis, y NF κ B, modulador general de la expresión génica que ha sido implicado en procesos de apoptosis.

Decidimos crear mutaciones en estos dos últimos posibles sitios de unión de factores de transcripción y observar en estas versiones mutadas si se daban cambios en los niveles de expresión de fluorescencia y/o en la respuesta a los estímulos que hemos demostrado regulan la expresión de *RND3*. Cuando medimos la fluorescencia emitida por las células Caco-2 transfectadas con los vectores mutados, observamos que la mutación en el sitio de unión de NF κ B no parece afectar a la emisión de fluorescencia en células adherentes ni en suspensión. Sin embargo, cuando las células en suspensión son tratadas con el anticuerpo activador de integrinas se produce un gran aumento en la emisión de fluorescencia, doblándose la fluorescencia. Sin embargo, la presencia del inhibidor de la PI3K sigue produciendo una disminución en la cantidad de fluorescencia a niveles similares a los obtenidos con la versión no mutada del promotor (Figura 38).

En el caso de las células transfectadas con el vector mutado en el sitio de transcripción para E2F, se observó una disminución de alrededor del 17% en la expresión de fluorescencia en células adherentes. La caída en la fluorescencia fue mucho mayor en el caso de las células en suspensión (del 37% al 3%) y además no se produjo la recuperación de la fluorescencia al usar Z-VAD-FMK o el anticuerpo activador, lo que parece indicar que este elemento de respuesta es fundamental en la expresión de *RND3* en células en suspensión.

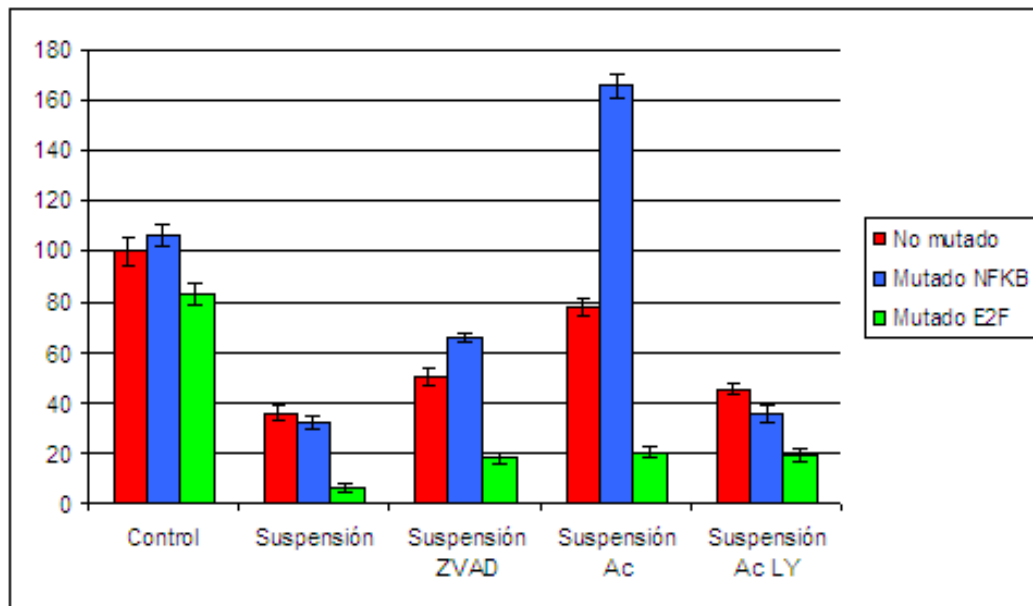


Figura 38.- La mutación del promotor de RND3 en los elementos de respuesta a E2F y NFκB produce cambios importantes en su actividad. La mutación en NFκB sólo produce cambios en la emisión de fluorescencia en células en suspensión con las integrinas activadas. Por el contrario, la mutación en E2F produce un descenso generalizado en la actividad del promotor en las células en suspensión, y esta versión del promotor es incapaz de responder a la activación de la vía de las integrinas o a la disminución de la apoptosis por la presencia del Z-VAD-FMK.

4.8.- Cambios en la expresión de Arhe in vivo en células de intestino de rata aisladas en suspensión y en el intestino de ratas tratadas con sulfato de dextrano sódico

Asimismo, hemos determinado la expresión de la proteína Arhe en enterocitos extraídos de intestino de rata. De este modo podemos estudiar si el fenómeno que hemos investigado se produce no sólo en cultivos *in vitro*, sino también *in vivo*. Las células epiteliales fueron, bien mantenidas en suspensión durante 3 horas, bien aisladas justo antes de la extracción de proteínas. Las células en suspensión fueron tratadas con Z-VAD-FMK, el anticuerpo activador P4G11 y el inhibidor LY294002, por separado o combinándolos.

Como puede observarse en la figura 39, el patrón de expresión de Arhe in vivo reprodujo el observado en las células Caco-2, con una disminución en la expresión de la proteína cuando los enterocitos fueron mantenidos en suspensión. La adición del Z-VAD-FMK o del anticuerpo P4G11 permitió la recuperación de

RESULTADOS

los niveles de Arhe, aunque el uso de ambas sustancias juntas no aumentó la expresión de Arhe, es más, al igual que en las células Caco-2, se produjo una disminución en la recuperación de los niveles control de Arhe. Asimismo, el empleo del inhibidor de la vía de la PI3K inhibió la recuperación de la expresión de Arhe, haciendo que se mantuvieran los niveles de expresión de las células en suspensión sin existir aumento en Arhe por el anticuerpo activador de la integrina $\beta 1$.

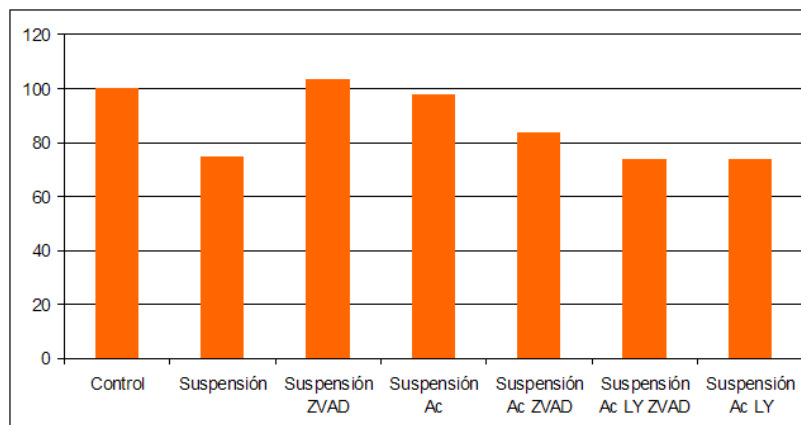
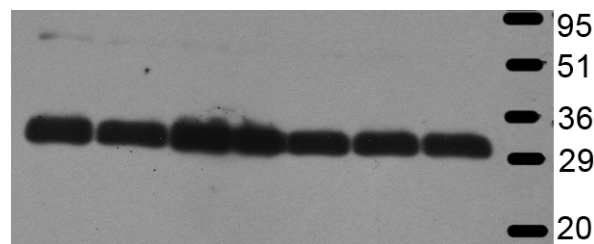


Figura 39.- Imagen de Western Blot de Arhe en enterocitos de rata tratados en las diferentes condiciones estudiadas: adheridos (control), suspensión durante 3 horas, suspensión en presencia de Z-VAD-FMK, en presencia del anticuerpo activador de integrinas, en presencia de ambos, en presencia de ambos y el inhibidor LY294002 y en presencia del anticuerpo y el inhibidor LY294002.

En la gráfica inferior se muestran los valores relativos de intensidad de las bandas considerando 100% la intensidad de la banda control de Arhe de enterocitos adheridos.

También hemos estudiado la expresión del mensajero de Arhe en la enfermedad inflamatoria intestinal usando el modelo de inducción de colitis en ratas producido

por sulfato sódico de dextrano (DSS). Este modelo ha sido ampliamente utilizado y caracterizado (Gaudio *et al.*, 1999; Sukumar *et al.*, 1999; Shimizu *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2005). Cuando las ratas fueron tratadas con DSS disuelto en agua al 5% se produjo una colitis aguda y el intestino afectado redujo los niveles de mensajero de *RND3* al 20% aproximadamente. Dichos niveles se mantuvieron cuando la dosis de DSS fue reducida al 2%. Sin embargo, se produjo una recuperación parcial de la expresión de *RND3* cuando se suprimió el tratamiento de las ratas con DSS, aunque durante el periodo en el que fueron estudiadas las ratas no se llegó a dar una recuperación total, sino que los niveles se mantuvieron en torno al 40% de la expresión original a partir de 4 días de la supresión del tratamiento con DSS (Figura 40).

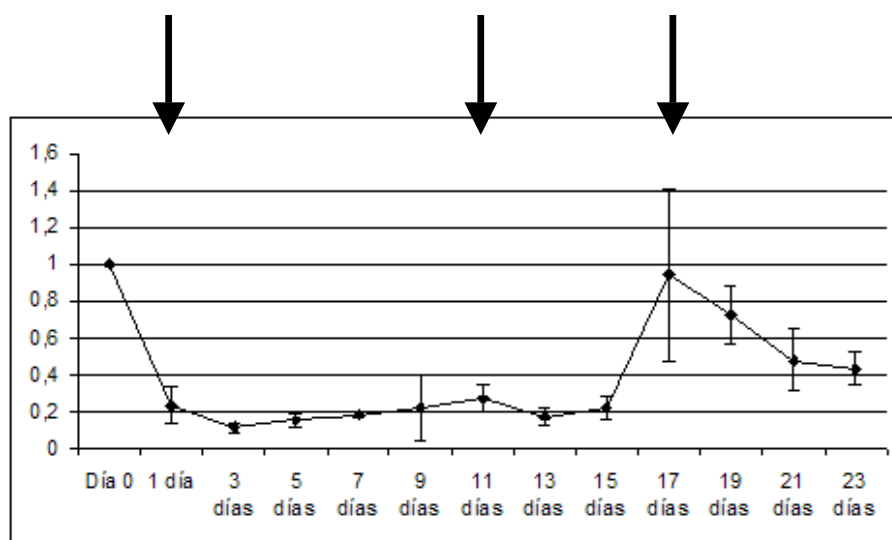


Figura 40.- Los niveles del mRNA de Arhe varían en el intestino de ratas con colitis inducida por sulfato de dextrano (DSS). La colitis aguda se indujo con DSS al 5% en el día 1. Posteriormente se redujo la concentración de DSS al 2% (día 11) para, finalmente, retirar el DSS (día 17), momento en el que se recuperaron parcialmente los niveles de Arhe.

RESULTADOS

4.9.- Los cambios en la expresión de Rnd3 asociados a anoikis se producen también en células MCF7 y MG63

Por último, hemos estudiado si el fenómeno de anoikis se da también en otras líneas celulares. Nuestras experiencias se desarrollaron en una línea celular epitelial de mama (MCF7) y en una línea celular derivada de un osteosarcoma (MG63). En ambos casos mantuvimos las células en suspensión durante 20 horas y, como puede observarse en la figura 41, se produjo una inducción de la muerte celular. En este caso, a diferencia de los resultados obtenidos en las células Caco-2, no existió una recuperación de la viabilidad celular por la adición del inhibidor de caspasas Z-VAD-FMK.

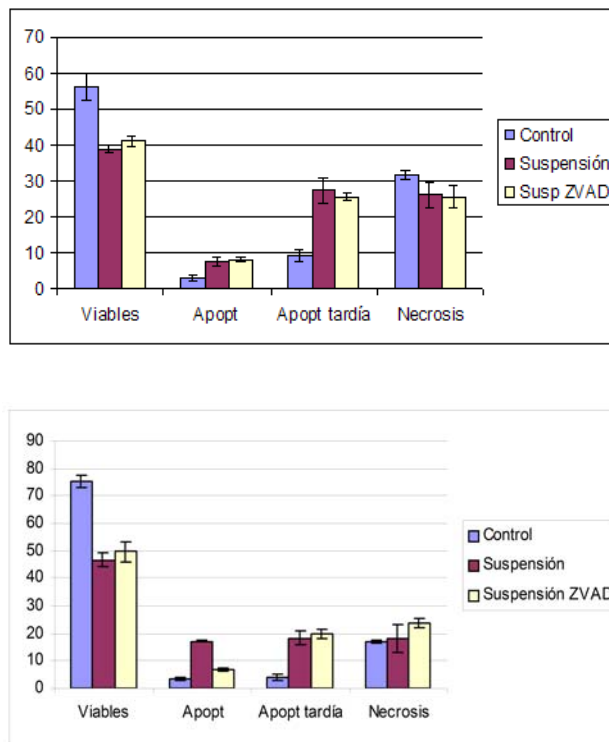


Figura 41.- La suspensión de células MCF7 (arriba) y MG63 (abajo) induce la muerte de las células. La adición de Z-VAD-FMK no tiene efecto sobre el porcentaje de células viables con respecto a las células viables de las células mantenidas en suspensión.

A continuación, determinamos los niveles de la proteína Rnd3 en las células adheridas y en suspensión, observando que, al igual que en las células Caco-2, la muerte celular produce la caída en los niveles de proteína Rnd3. En el caso de estas dos líneas celulares la caída en los niveles de Rnd3 fue mucho mayor, en torno al 50%. Cuando se añadió el inhibidor Z-VAD-FMK se produjo una ligera recuperación en los niveles de Rnd3 que no estaba asociada a cambios en la viabilidad celular (figura 42).

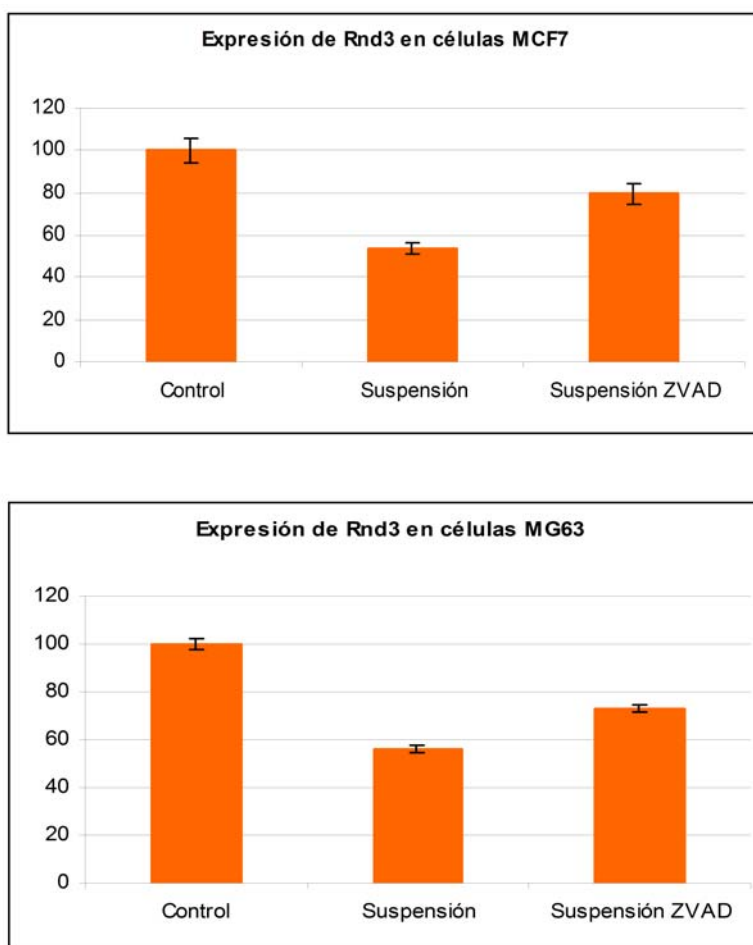


Figura 42.- La suspensión de células MCF7 (arriba) y MG63 (abajo) produce una caída en la cantidad de proteína Rnd3. La adición de Z-VAD-FMK produce una ligera recuperación en los niveles de la proteína, aunque sin llegar a los niveles basales.

5.- DISCUSIÓN

Trabajos previos de nuestro grupo de investigación habían determinado, usando la técnica de *differential display*, que la expresión de *Arhe* disminuye durante la diferenciación de células IEC-6 sobre Matrigel (Vieites *et al.*, 2005). Al inicio del estudio que ha supuesto esta Tesis no se había descrito la expresión de *RND3/Arhe* en el intestino en la literatura científica, no se habían secuenciado completamente los mensajeros humano o de rata, y aún menos se conocían los mecanismos que explicaban la regulación de este gen.

RND3 (*Arhe* en la rata) pertenece a la familia de las pequeñas GTPasas, familia que ha sido implicada en numerosas funciones celulares, como la proliferación, la diferenciación, la muerte, la morfología y la movilidad celulares, y en algunas patologías como la adquisición de un fenotipo neoplásico por parte de células en las que existe una expresión alterada de estos genes.

Una vez comprobada la expresión de *Arhe* en intestino de rata y de *RND3* en las líneas celulares intestinales humanas HT29 y Caco-2, que posteriormente ha sido corroborada por el artículo de Galindo *et al.* (2003), pretendimos determinar la regulación del gen en el intestino. Durante esta Tesis se han evaluado fundamentalmente tres fenómenos en los que podían existir cambios en la expresión de *RND3*: la diferenciación enterocítica, la existencia de un estado de confluencia celular y la muerte celular. Todos estos fenómenos se dan en la fisiología normal de un intestino, dado que los enterocitos nacen en las criptas, viajan hacia el lumen fuertemente unidos unos a otros y, finalmente, son eliminados al lumen, fenómeno que aún no está claro si es después de la muerte celular o si se produce esta muerte por anoikis cuando las células están en el lumen tras desprenderse del sustrato. Esta regulación se ha estudiado a tres niveles: expresión del mRNA, expresión de la proteína y actividad del promotor.

La diferenciación celular se produjo en un modelo que ha sido ampliamente utilizado, y que consiste en crecer células indiferenciadas sobre una matriz extracelular, lo que produce en muchas ocasiones la diferenciación de esas células

DISCUSIÓN

(Kleinman and Martin, 2005). En nuestro caso empleamos la línea de células epiteliales intestinales de rata IEC-6, dado que fue en ellas en las que habíamos descubierto la expresión de *Arhe* en intestino, así como su regulación por la diferenciación, por medio de la técnica de *differential display*. El estudio fue completado observando los cambios que se producían al añadir nucleósidos al medio, dado que, según investigaciones previas de nuestro grupo, se ha demostrado que la existencia de nucleósidos favorece tanto *in vivo* como *in vitro* el proceso de diferenciación intestinal (Ortega *et al.*, 1995a-b, López-Navarro *et al.*, 1996). Como confirman nuestros resultados, la expresión de *Arhe* disminuye durante la diferenciación de las células IEC-6. Cuando se añaden nucleósidos al medio, los cambios morfológicos asociados a la diferenciación (aparición de microvellosidades) se aceleran y mantienen en el tiempo y, paralelamente, se produce una aceleración en la disminución de expresión de *Arhe*. Este estudio, además de corroborar la existencia de una correlación entre la expresión de *RND3* y los procesos de diferenciación celular, ahonda en la importancia de los nucleósidos como nutrientes semiesenciales que facilitan el desarrollo de las funciones (expresión de fosfatasa alcalina) y los procesos de diferenciación intestinales (aparición de microvellosidades).

Para completar esta parte del estudio, pretendimos delimitar cuál de los componentes de la matriz extracelular era el responsable de la diferenciación y/o de los cambios en la expresión de *Arhe*. En la matriz extracelular utilizada para la inducción de la diferenciación de las células IEC-6 existen varios componentes que han sido implicados en procesos de diferenciación. Entre ellos destacan la laminina (Gout *et al.*, 2001; Scarpa *et al.*, 1988), el TGF- β (Barnard *et al.*, 1989; Afees *et al.*, 1992) y el IGF (Baghdiguan *et al.*, 1992; Kojima *et al.*, 1998). También es importante el EGF, aunque este factor de crecimiento parece estar más implicado en los procesos de proliferación (Oliver *et al.*, 1995). Como demuestran nuestros resultados, el único de los componentes del Matrigel que produjo una disminución moderada de los niveles de mensajero de *Arhe* fue el TGF- β . Sin embargo, cuando se estudió la expresión de proteína *Arhe* en células IEC-6 tratadas con TGF- β no se observó ningún cambio, aunque esto puede ser debido a que existiera un *pool* de proteína que no se vio afectado por una pequeña disminución durante 24 horas de los niveles de mensajero. Además, en ninguno de

los tratamientos realizados con los componentes del Matrigel se obtuvieron cambios morfológicos asociados a la diferenciación celular similares a los observados en las células IEC-6 crecidas sobre Matrigel.

La diferenciación de las células en el Matrigel conlleva una reordenación celular, tanto en su forma individual, como en la relación que tiene con las células de su entorno. Se ha descrito (y nosotros hemos observado) la aparición de agregados celulares formados por células muy alargadas. Esos agregados celulares parecen estar formados por núcleos de células que entran en apoptosis unidos entre sí por células no apoptóticas alargadas. Además, las células se unen entre sí por uniones mucho más potentes que las existentes en un cultivo confluyente normal (Sterling and Cutroneo, 2002). Debido a la existencia de estos fenómenos y a la falta de un elemento del Matrigel que produjera con claridad la disminución en los niveles de *Arhe*, decidimos estudiar si la existencia de una unión fuerte entre las células, al dejarlas en confluencia durante mucho tiempo, o la aparición de un estímulo apoptótico, podían influir en la expresión del gen *Arhe* y su homólogo humano *RND3*.

El estudio de la influencia de la confluencia se realizó en dos tipos celulares, IEC-6 (de rata) y HT29 (humanas). En ninguna de ellas se ha descrito que la confluencia produzca diferenciación, lo que sí ocurre en la otra línea celular intestinal humana que teníamos a nuestra disposición (Caco-2), si bien las células HT29 confluentes pueden ser diferenciadas por diversos estímulos, cambiando o añadiendo diferentes componentes al medio de crecimiento normal (Lesuffleur *et al.*, 1990, 1991, 1993). En las dos líneas celulares intestinales estudiadas se observa un patrón similar en la expresión de *Arhe/RND3* con una expresión relativamente baja en células subconfluentes y un aumento de los niveles en los primeros momentos de la confluencia, para posteriormente bajar. Este patrón fue estudiado también en otras GTPasas de pequeño tamaño, entre las que destacamos *Rhoa/RHOA*. El producto de este gen produce efectos contrarios a los de *Arhe/RND3*, por lo que puede decirse que los efectos que se produzcan en una célula dependerán de la relación que exista entre *Arhe/Rnd3* y *RhoA* unido a GTP (activo). En nuestros resultados se puede observar que los niveles de *Rhoa/RHOA* aumentan cuando se mantiene la confluencia durante un tiempo más o menos

DISCUSIÓN

prolongado, lo que coincide con la caída en los niveles de Rnd3 (a los 3 días en HT29 y a los 21 días en IEC-6). Los cambios de *Rhoa* en células HT29 son similares a los que observaron Gout *et al.* (2001), que vinculan los cambios en la actividad de RhoA a los fenómenos de diferenciación en las células HT29 sometidas a confluencia y un cambio de la fuente de carbono del medio a galactosa, con la diferencia de que en nuestro estudio la relación ha sido establecida entre la confluencia y el nivel de mRNA, mientras que en su estudio la relación fue establecida entre la actividad de RhoA y la diferenciación celular. Interesantemente, en este estudio los cambios en la actividad de RhoA se relacionan con cambios en el patrón de expresión de integrinas en la membrana celular, dándose un cambio de $\alpha 2\beta 1$ (propia de enterocitos indiferenciados) a $\alpha 3\beta 1$ (propia de enterocitos diferenciados). Como se ha visto posteriormente en nuestras investigaciones, hemos establecido un nuevo vínculo entre las proteínas Rho y la actividad de las integrinas.

A continuación, hemos estudiado la importancia de la muerte celular en la expresión de *Arhe/RND3*. A pesar de la existencia de numerosos métodos para inducir la muerte de células usando diversos fármacos y ligandos como anticuerpos de Fas, nosotros buscamos un método lo más fisiológico posible para producir la muerte de células epiteliales intestinales. Un método ampliamente utilizado ha sido la adición de butirato a cultivos de células Caco-2 (Dzierzewicz *et al.*, 2002; Ruemmele *et al.*, 2003). Este ácido graso de cadena corta produce dos fenómenos en estas células, diferenciación y apoptosis, aunque ambos fenómenos parecen ir íntimamente relacionados ya que, en general, son aquellas células con mayor actividad de enzimas marcadoras de diferenciación las que mueren y se desprenden del sustrato para acabar flotando en el medio de cultivo. El butirato es producido fisiológicamente en el lumen intestinal, por lo que es razonable pensar que puede estar implicado en la inducción de diferenciación y muerte celular en el intestino. Sin embargo, este método presenta el inconveniente de que los resultados que se obtienen no son únicamente por diferenciación o únicamente por apoptosis. Debido a este inconveniente, nosotros utilizamos una técnica en la que, de un modo fisiológico, se produjera sólo apoptosis. Para ello, nos basamos en trabajos previos en los que se había inducido la muerte celular de células IEC-18 y Caco-2 al mantenerlas en suspensión. Este fenómeno de muerte

celular por falta de sustrato se da en muchos tipos de células epiteliales y es conocido como anoikis. En el caso del intestino, se piensa que se produce cuando las células llegan a la punta de la vellosidad y son eliminadas al lumen intestinal (Karam, 1999; Beaulieu, 1992).

Dado que este método para obtener la muerte celular ha sido muy poco usado en las células Caco-2, lo primero que hicimos fue caracterizar el grado de apoptosis que se producía. Como se demuestra en los resultados, la suspensión de las células produce un grado de apoptosis similar (30-40%) a la obtenida por la adición de butirato sódico mucho más rápidamente, necesitándose 20 horas de suspensión frente a 72 horas de tratamiento con butirato. Además, este método presenta la ventaja de que responde mejor al tratamiento con el inhibidor pancaspasas Z-VAD-FMK, ya que, en nuestra experiencia, la apoptosis por butirato no se vio influida por la presencia de Z-VAD-FMK, mientras que sí se produjo una recuperación parcial de la viabilidad celular en el caso de la muerte por suspensión.

La muerte celular es, finalmente, el otro fenómeno estudiado que produce cambios importantes en la expresión de *Arhe/RND3*. Actualmente se han descrito dos grandes elementos que cambian la expresión de *RND3* en diferentes tipos celulares, y que son la muerte celular y la actividad estrogénica (Villalonga *et al.*, 2004; Bektic *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2005; Akashi *et al.*, 2000). Nosotros observamos que, en las células Caco-2 *Rnd3* disminuye durante la apoptosis, lo que puede tener relación con la observación de que la apoptosis en astrocitos está relacionada con un aumento en la actividad de RhoA, proteína que contrarresta los efectos de *Rnd3* (Miñambres Herráiz *et al.*, 2005). La adición de Z-VAD-FMK protege parcialmente las células de la apoptosis y permite la recuperación de los niveles de *Rnd3*, lo que en principio vinculaba el cambio en la expresión de *Rnd3* al fenómeno de apoptosis únicamente.

Sin embargo, también decidimos estudiar la influencia de la vía de la PI3K en los cambios en la expresión de *Rnd3*. Existen muchas vías relacionadas con las proteínas Rho, pero de todas ellas la vía PI3K-Akt-mTOR es la que más claramente parece implicada en la señalización entre la matriz extracelular y la actividad de esas proteínas (Wang, 2004). Además, existen numerosos estudios

DISCUSIÓN

que han relacionado la falta de unión de las integrinas a sus ligandos con la actividad de esta vía, lo que da lugar finalmente a la muerte de aquellas células que han perdido contacto con la matriz extracelular (Xia *et al.*, 2004; Tian *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 1999). Este es un mecanismo bastante simple pero efectivo que los organismos multicelulares tienen para evitar la aparición de metástasis, ya que las células en el torrente circulatorio morirían al no estar unidas a un sustrato. Ante estos antecedentes, ensayamos el efecto que tendría la adición de un anticuerpo activador de la cadena $\beta 1$, que es la más abundante en los enterocitos, y la que parece más claramente relacionada con la supervivencia celular y la vía de la PI3K. Como esperábamos, la adición del anticuerpo activador favoreció la supervivencia celular de las células en apoptosis y recuperó la expresión de Rnd3, con un efecto similar al del inhibidor de caspasas. Esto es debido a que la unión del anticuerpo produce una activación de la vía de la integrina beta 1, lo que *engaña* a la célula haciéndole creer que aún está unida a la matriz extracelular. Sin embargo, el empleo de ambos protectores de la supervivencia celular conjuntamente no aumentó la cantidad de células viables, e incluso disminuyó la expresión de Rnd3. Este efecto puede ser debido a que, teniendo mecanismos diferentes para aumentar la supervivencia celular, compitieron entre sí limitando el efecto protector.

Este resultado nos planteó la duda de si la vía de la PI3K tenía efecto por sí misma sobre la expresión de Rnd3 o el responsable del cambio en Rnd3 era otro mecanismo relacionado con la aparición de apoptosis. Para aclarar este punto, procedimos a inhibir la vía de la PI3K en células tratadas con el anticuerpo activador de la integrina $\beta 1$ con el compuesto LY294002, que es un inhibidor específico de la PI3K. Esto evitaría el efecto protector del anticuerpo, dando lugar a la muerte de las células y la bajada en la expresión de Rnd3. Sin embargo, la adición de Z-VAD-FMK debía evitar la muerte celular, pero no sabíamos el efecto que tendría sobre la expresión de Rnd3. De nuestros resultados se deduce que una vía de la PI3K no inhibida es imprescindible para la recuperación de los niveles de Rnd3, ya que, si bien el Z-VAD-FMK aumenta la viabilidad celular en las células tratadas con LY294002, no es capaz de devolver la expresión de Rnd3 a sus niveles normales. Por lo tanto, es de esperar que la vía PI3K-Akt-mTOR dispare una señal en el núcleo que produzca la transcripción de *RND3*.

Para determinar si nuestro modelo experimental de anoikis era útil en otros tipos celulares diferentes de las líneas epiteliales intestinales, usamos otras dos líneas celulares: las células MCF7, que son epiteliales, pero de mama, y las células MG63, de osteosarcoma, que no son epiteliales ni intestinales pero sí requieren la adhesión al sustrato para crecer y vivir. De nuestros resultados se deduce que la adhesión al sustrato es imprescindible para que estas células mantengan su viabilidad, y que la proteína Rnd3 también disminuye cuando las células entran en apoptosis por mantenerlas en suspensión. Por tanto, podemos decir que la anoikis es un mecanismo general que se da en todos los tipos celulares adherentes y que, al menos en los tipos celulares explorados, se acompaña de una caída en los niveles de Rnd3, una proteína clave tanto en la forma celular como en la progresión del ciclo celular.

Para determinar si los cambios observados a nivel proteico se dan a nivel transcripcional, hemos procedido al aislamiento de la región promotora de *RND3* y su caracterización. Para el estudio del promotor, el primer paso consistió en la identificación del sitio de inicio de la transcripción dado que, en la mayoría de los genes, el promotor es una secuencia de DNA que se encuentra en el genoma cerca y por delante del sitio del inicio de la transcripción del gen. Para determinar el inicio de la transcripción hemos usado la técnica de extensión de cebadores (*primer extension*). El experimento se realizó partiendo de dos tipos de RNA, de intestino y de decidua placentaria. El primero fue usado debido a que habíamos demostrado la existencia de este mensajero en células epiteliales intestinales, el segundo debido a que varios de las EST y fragmentos correspondientes al mensajero publicados en la base NCBI de este gen procedían de placenta.

Empleamos un cebador presente en el exón 4 del mensajero para evitar la obtención de falsos positivos debidos a la presencia de fragmentos de DNA genómico contaminante o de RNA que aún no hubieran sido completamente procesados. Tanto en el caso del RNA de placenta como en el de intestino obtuvimos una banda mayoritaria de más de 400 bases. Simultáneamente, el grupo de Strausberg, publicó en la base NCBI un mensajero cuya región no traducida (UTR) 5' coincidía aproximadamente con el tamaño de la banda que habíamos obtenido. Para comprobar la secuencia y la veracidad de la información,

DISCUSIÓN

realizamos un sencillo experimento en el que se retrotranscribió RNA libre de DNA. El cDNA resultante fue sometido a PCR con dos cebadores diferentes en su extremo 5', en un caso el cebador se encontraba dentro de la secuencia que debía ser la UTR 5', mientras que en el otro el cebador estaba en el extremo y no debía dar producto a la temperatura a la que realizamos la reacción. El resultado demostró cuál era el inicio de la transcripción del gen con una precisión de ± 20 bases.

El estudio de la secuencia en torno a ese inicio de la transcripción con diferentes programas informáticos permitió determinar dos zonas que podían ser las cajas TATA de este gen. Uno de los programas (GenomatixSuite) predijo, incluso, la secuencia que podía ser la región promotora, que consistía en una región de unas 650 pb. Nosotros decidimos clonar un fragmento algo mayor que el predicho por GenomatixSuite, de 1000 pb, y estudiar su regulación al introducirlo en dos sistemas de vectores diferentes, pGL3-Basic y pDsRed-Express-1.

El promotor insertado en pGL3-Basic fue utilizado en transfecciones transitorias, ya que no permite la selección de clones celulares que hayan introducido el vector. Los experimentos realizados con este promotor pretendían demostrar su actividad, así como corroborar los resultados obtenidos por RT-PCR con respecto al comportamiento de *RND3* en las células HT29 en confluencia. Sin embargo, aunque observamos que la introducción del promotor daba lugar a una caída en la actividad luciferasa, y que ésta no era debida a la existencia de un inicio alternativo que diera una luciferasa menos activa, no conseguimos que se reprodujeran los resultados obtenidos por RT-PCR. Esto puede ser debido a que la eficiencia de transfección fuera demasiado baja como para observarse cambios en la emisión de luminiscencia, o a que hubiéramos clonado sólo parte del promotor. Otra posible explicación es que los cambios en la expresión del mensajero no se tradujeran después a nivel proteico.

Aún así, decidimos clonar este promotor en un vector que nos permitiera obtener clones estables con los que realizar más experimentos. El vector elegido fue pDsRed-Express-1, ya que produce una proteína estable y fuertemente fluorescente. Esta construcción fue utilizada para determinar la actividad del promotor en las células Caco-2 en suspensión. En este caso el comportamiento de

la actividad del promotor sí fue similar al de la proteína, lo que puede deberse al hecho de que estuviéramos trabajando con clones homogéneos más que con poblaciones celulares parcialmente transfectadas. En nuestros experimentos demostramos que la actividad del promotor disminuye durante la inducción de anoikis, se recupera en un 70% por la activación de la vía PI3K y mucho menos (20%) al evitar la muerte celular usando Z-VAD-FMK, y que la actividad depende de que la vía de la PI3K no haya sido inhibida, dado que cuando usamos el LY294002 la recuperación de la actividad caía al 20%.

Al realizar el estudio del promotor con el programa MatInspector identificamos varios posibles elementos de respuesta a factores de transcripción que, por lo que se conoce de su función, podían estar más relacionados con la actividad del promotor. Realizamos mutagénesis en estos sitios de unión en el promotor y observamos que el sitio de unión de NFκB parece ser fundamental para que la respuesta a la activación de las integrinas sea similar a los de los controles. En el caso del sitio de unión de E2F, la mutación dio lugar a una caída en la actividad del promotor, sobre todo en el caso de las células en suspensión.

Finalmente, hemos determinado que la regulación de *RND3/Arhe* en enterocitos extraídos de intestino de rata es similar a la que hemos observado en las diferentes líneas celulares. Por otro lado, la expresión de *Arhe* en intestinos de ratas tratadas con sulfato de dextrano también presenta una caída en los niveles, lo que relaciona la expresión de este gen con la enfermedad inflamatoria intestinal y que podría indicar un vínculo más entre la enfermedad inflamatoria intestinal y un aumento en la apoptosis de enterocitos en los intestinos afectados por la enfermedad.

Por lo tanto, hemos descrito la expresión del mensajero y/o la proteína *Arhe/RND3* en diferentes situaciones que se dan en el intestino. Tanto la diferenciación como la apoptosis celular producen una caída en los niveles de los productos de este gen. Estos cambios parecen estar relacionados con los vínculos que las células establecen con la matriz extracelular, en el caso de la diferenciación de IEC-6 en Matrigel, o la ausencia de señales de la matriz extracelular, en el caso de la muerte de células Caco-2 en suspensión. La restitución de la señalización por las integrinas en las células en suspensión permite, a través de la vía de la PI3K, mantener unos niveles normales de Rnd3.

DISCUSIÓN

esta regulación se da a nivel transcripcional, como demuestra el hecho de que los efectos observados han sido reproducidos en la construcción con el promotor en pDs-Red-Express. Finalmente, hemos identificado dos elementos de respuesta en el promotor que están relacionados con el control de la expresión de este gen, y que son reconocidos por dos factores de transcripción importantes en la apoptosis celular (NFκB) y en la diferenciación enterocítica (E2F).

6.- CONCLUSIONES

1.- Los niveles de mRNA del homólogo de *Rnd3* en rata (*Arhe*) disminuyen durante la diferenciación de los enterocitos de rata IEC-6. La adición de nucleósidos al medio los favorece y acelera los cambios morfológicos y enzimáticos de la diferenciación, así como la disminución en los niveles de *Arhe*.

2.- La apoptosis de las células Caco-2 disminuye los niveles de Rnd3, lo que es contrarrestado por la activación de las integrinas, efecto inhibido por el bloqueo de la vía de la fosfoinositol-3-quinasa, lo que demuestra que esta vía es la que controla la expresión de Rnd3 en células Caco-2.

3.- Hemos aislado la región promotora del gen *RND3* humano y hemos determinado que en su regulación intervienen los elementos de respuesta a E2F y NFκB es a través de la vía de integrinas-PI3K.

4.- La regulación *in vitro* de la expresión de *RND3/Arhe* en Caco-2 ha sido validada en enterocitos extraídos de intestino de rata.

7.- BIBLIOGRAFÍA

Abreu-Martin MT, Vidrich A, Lynch DH, Targan SR. Divergent induction of apoptosis and IL-8 secretion in HT-29 cells in response to TNF-alpha and ligation of Fas antigen. *J Immunol* 1995;155:4147-54.

Adachi T, Mori C, Sakurai K, Shihara N, Tsuda K, Yasuda K. Morphological changes and increased sucrase and isomaltase activity in small intestines of insulin-deficient and type 2 diabetic rats. *Endocr J* 2003;50:271-9.

Adams JC, Watt FM. Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development* 1993;117:1183-98.

Adress KJ, Basilion JP, Klausner RD, Rouault TA, Pardi A. Structure and dynamics of the iron responsive element RNA: implications for binding of the RNA by iron regulatory binding proteins. *J Mol Biol* 1997;274:72-83.

Aigner T, Neureiter D, Muller S, Kuspert G, Belke J, Kirchner T. Extracellular matrix composition and gene expression in collagenous colitis. *Gastroenterology* 1997;113:136-43.

Akashi H, Han HJ, Iizaka M, Nakamura Y. Growth-suppressive effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on 11 colon-cancer cell lines and fluorescence differential display of genes whose expression is influenced by sulindac. *Int J Cancer* 2000;88:873-80.

Alam T, An MR, Papaconstantinou J. Differential expression of three C/EBP isoforms in multiple tissues during the acute phase response. *J Biol Chem* 1992;267:5021-4.

Aliaga JC, Deschenes C, Beaulieu JF, Calvo EL, Rivard N. Requirement of the MAP kinase cascade for cell cycle progression and differentiation of human intestinal cells. *Am J Physiol* 1999;277:G631-41.

BIBLIOGRAFÍA

Almeida EA, Ilic D, Han Q, Hauck CR, Jin F, Kawakatsu H, Schlaepfer DD, Damsky CH. Matrix survival signaling: from fibronectin via focal adhesion kinase to c-Jun NH(2)-terminal kinase. *J Cell Biol* 2000;149:741-54.

Amano M, Chihara K, Kimura K, Fukata Y, Nakamura N, Matsuura Y, Kaibuchi K. Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. *Science* 1997;275:1308-11.

Anderle P, Rakhmanova V, Woodford K, Zerangue N, Sadee W. Messenger RNA expression of transporter and ion channel genes in undifferentiated and differentiated Caco-2 cells compared to human intestines. *Pharm Res* 2003;20:3-15.

Aplin AE, Howe AK, Juliano RL. Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11:737-44.

Arceci RJ, King AA, Simon MC, Orkin SH, Wilson DB. Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart. *Mol Cell Biol* 1993;13:2235-46.

Arnone MI, Davidson EH. The hardwiring of development: organization and function of genomic regulatory systems. *Development* 1997;124:1851-64.

Attaix D, Meslin JC. Changes in small intestinal mucosa morphology and cell renewal in suckling, prolonged-suckling, and weaned lambs. *Am J Physiol* 1991;261:R811-8.

Attwell S, Roskelley C, Dedhar S. The integrin-linked kinase (ILK) suppresses anoikis. *Oncogene* 2000;19:3811-5.

Augeron C, Labois CL. Emergence of permanently differentiated cell clones in a human colonic cancer cell line in culture after treatment with sodium butyrate. *Cancer Res* 1984;44:3961-9.

Autore G, Capasso F, Mascolo N. Phenolphthalein stimulates the formation of histamine, 5-hydroxytryptamine and prostaglandin-like material by rat jejunum, ileum and colon. *Br J Pharmacol* 1984;81:347-9.

Avivi-Green C, Polak-Charcon S, Madar Z, Schwartz B. Different molecular events account for butyrate-induced apoptosis in two human colon cancer cell lines. *J Nutr* 2002;132:1812-8.

Aznar S, Lacal JC. Rho signals to cell growth and apoptosis. *Cancer Lett* 2001;165:1-10.

Backert S, Gelos M, Kobalz U, Hanski ML, Bohm C, Mann B, Lovin N, Gratchev A, Mansmann U, Moyer MP, Riecken EO, Hanski C. Differential gene expression in colon carcinoma cells and tissues detected with a cDNA array. *Int J Cancer* 1999;82:868-74.

Baghdiguian S, Verrier B, Gerard C, Fantini J. Insulin like growth factor I is an autocrine regulator of human colon cancer cell differentiation and growth. *Cancer Lett* 1992;62:23-33.

Barnard JA, Beauchamp RD, Coffey RJ, Moses HL. Regulation of intestinal epithelial cell growth by transforming growth factor type beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:1578-82.

Barshishat M, Polak-Charcon S, Schwartz B. Butyrate regulates E-cadherin transcription, isoform expression and intracellular position in colon cancer cells. *Br J Cancer* 2000;82:195-203.

Basora N, Herring-Gillam FE, Boudreau F, Perreault N, Pageot LP, Simoneau M, Bouatrouss Y, Beaulieu JF. Expression of functionally distinct variants of the beta(4)A integrin subunit in relation to the differentiation state in human intestinal cells. *J Biol Chem* 1999;274:29819-25.

BIBLIOGRAFÍA

Basora N, Vachon PH, Herring-Gillam FE, Perreault N, Beaulieu JF. Relation between integrin alpha7Bbeta1 expression in human intestinal cells and enterocytic differentiation. *Gastroenterology* 1997;113:1510-21.

Basque JR, Levy E, Beaulieu JF, Menard D. Apolipoproteins in human fetal colon: immunolocalization, biogenesis, and hormonal regulation. *J Cell Biochem* 1998;70:354-65.

Basson MD, Emenaker NJ, Sanders MA. Alpha integrin subunits regulate human (Caco-2) intestinal epithelial proliferation and phenotype. *Cell Physiol Biochem* 2000;10:27-36.

Basson MD, Modlin IM, Madri JA. Human enterocyte (Caco-2) migration is modulated in vitro by extracellular matrix composition and epidermal growth factor. *J Clin Invest* 1992;90:15-23.

Basson MD, Turowski G, Emenaker NJ. Regulation of human (Caco-2) intestinal epithelial cell differentiation by extracellular matrix proteins. *Exp Cell Res* 1996;225:301-5.

Basson MD, Turowski GA, Rashid Z, Hong F, Madri JA. Regulation of human colonic cell line proliferation and phenotype by sodium butyrate. *Dig Dis Sci* 1996;41:1989-93.

Beaulieu JF. Differential expression of the VLA family of integrins along the crypt-villus axis in the human small intestine. *J Cell Sci* 1992;102 (Pt 3):427-36.

Beaulieu JF. Extracellular matrix components and integrins in relationship to human intestinal epithelial cell differentiation. *Prog Histochem Cytochem* 1997;31:1-78.

Beaulieu JF. Integrins and human intestinal cell functions. *Front Biosci* 1999;4:D310-21.

Beaulieu JF, Calvert R. Influences of dexamethasone on the maturation of fetal mouse intestinal mucosa in organ culture. *Comp Biochem Physiol A* 1985;82:91-5.

Beaulieu JF, Millane G, Calvert R. Developmental expression of two antigens associated with mouse intestinal crypts. *Dev Dyn* 1992;193:325-31.

Beaulieu JF, Nichols B, Quaroni A. Posttranslational regulation of sucrase-isomaltase expression in intestinal crypt and villus cells. *J Biol Chem* 1989;264:20000-11.

Beaulieu JF, Quaroni A. Clonal analysis of sucrase-isomaltase expression in the human colon adenocarcinoma Caco-2 cells. *Biochem J* 1991;280 (Pt 3):599-608.

Beaulieu JF, Vachon PH. Reciprocal expression of laminin A-chain isoforms along the crypt-villus axis in the human small intestine. *Gastroenterology* 1994;106:829-39.

Bektic J, Pfeil K, Berger AP, Ramoner R, Pelzer A, Schafer G, Kofler K, Bartsch G, Klocker H. Small G-protein RhoE is underexpressed in prostate cancer and induces cell cycle arrest and apoptosis. *Prostate* 2005;64:332-40.

Bektic J, Wrulich OA, Dobler G, Kofler K, Ueberall F, Culig Z, Bartsch G, Klocker H. Identification of genes involved in estrogenic action in the human prostate using microarray analysis. *Genomics* 2004;83:34-44.

Benya RV, Duncan MD, Mishra L, Bass BL, Voyles NR, Korman LY. Extracellular matrix composition influences insulinlike growth factor I receptor expression in rat IEC-18 cells. *Gastroenterology* 1993;104:1705-11.

BIBLIOGRAFÍA

Boshuizen JA, Reimerink JH, Korteland-van Male AM, van Ham VJ, Koopmans MP, Buller HA, Dekker J, Einerhand AW. Changes in small intestinal homeostasis, morphology, and gene expression during rotavirus infection of infant mice. *J Virol* 2003;77:13005-16.

Bossard P, Zaret KS. GATA transcription factors as potentiators of gut endoderm differentiation. *Development* 1998;125:4909-17.

Bouatrouss Y, Herring-Gillam FE, Gosselin J, Poisson J, Beaulieu JF. Altered expression of laminins in Crohn's disease small intestinal mucosa. *Am J Pathol* 2000;156:45-50.

Boudreau F, Rings EH, van Wering HM, Kim RK, Swain GP, Krasinski SD, Moffett J, Grand RJ, Suh ER, Traber PG. Hepatocyte nuclear factor-1 alpha, GATA-4, and caudal related homeodomain protein Cdx2 interact functionally to modulate intestinal gene transcription. Implication for the developmental regulation of the sucrase-isomaltase gene. *J Biol Chem* 2002;277:31909-17.

Boudreau F, Zhu Y, Traber PG. Sucrase-isomaltase gene transcription requires the hepatocyte nuclear factor-1 (HNF-1) regulatory element and is regulated by the ratio of HNF-1 alpha to HNF-1 beta. *J Biol Chem* 2001;276:32122-8.

Boudreau NJ, Jones PL. Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come. *Biochem J* 1999;339 (Pt 3):481-8.

Boulenc X, Bourrie M, Fabre I, Roque C, Joyeux H, Berger Y, Fabre G. Regulation of cytochrome P450IA1 gene expression in a human intestinal cell line, Caco-2. *J Pharmacol Exp Ther* 1992;263:1471-8.

Brassard DL, Maxwell E, Malkowski M, Nagabhushan TL, Kumar CC, Armstrong L. Integrin alpha(v)beta(3)-mediated activation of apoptosis. *Exp Cell Res* 1999;251:33-45.

Bry L, Falk P, Huttner K, Ouellette A, Midtvedt T, Gordon JI. Paneth cell differentiation in the developing intestine of normal and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:10335-9.

Buddington RK. Intestinal nutrient transport during ontogeny of vertebrates. *Am J Physiol* 1992;263:R503-9.

Bullock DW, Lamb DJ, Rider VC, Kima PE. The rabbit progesterone receptor and uteroglobin gene expression. *Adv Exp Med Biol* 1987;230:79-97.

Cai S, Bulus N, Fonseca-Siesser PM, Chen D, Hanks SK, Pozzi A, Zent R. CD98 modulates integrin beta1 function in polarized epithelial cells. *J Cell Sci* 2005;118:889-99.

Calderwood DA, Shattil SJ, Ginsberg MH. Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. *J Biol Chem* 2000;275:22607-10.

Calvert R, Millane G, Pothier P, Beaulieu JF. An intestinal secretory protein is found in most glands associated with the gastrointestinal tract: von Ebner's and salivary glands, gallbladder, and pancreas. *J Histochem Cytochem* 1993;41:1223-31.

Campbell DJ, Habener JF. Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat. *J Clin Invest* 1986;78:31-9.

Cario-Toumaniantz C, Reillaudoux G, Sauzeau V, Heutte F, Vaillant N, Finet M, Chardin P, Loirand G, Pacaud P. Modulation of RhoA-Rho kinase-mediated Ca²⁺ sensitization of rabbit myometrium during pregnancy - role of Rnd3. *J Physiol* 2003;552:403-13.

BIBLIOGRAFÍA

Carroll KM, Wong TT, Drabik DL, Chang EB. Differentiation of rat small intestinal epithelial cells by extracellular matrix. *Am J Physiol* 1988;254:G355-60.

Cary LA, Guan JL. Focal adhesion kinase in integrin-mediated signaling. *Front Biosci* 1999;4:D102-13.

Cary LA, Han DC, Guan JL. Integrin-mediated signal transduction pathways. *Histol Histopathol* 1999;14:1001-9.

Chakrabarti G, Zhou X, McClane BA. Death pathways activated in CaCo-2 cells by *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Infect Immun* 2003;71:4260-70.

Chantret I, Barbat A, Dussaulx E, Brattain MG, Zweibaum A. Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines. *Cancer Res* 1988;48:1936-42.

Chantret I, Rodolosse A, Barbat A, Dussaulx E, Brot-Laroche E, Zweibaum A, Rousset M. Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: evidence for glucose-dependent negative regulation. *J Cell Sci* 1994;107 (Pt 1):213-25.

Chen FW, Ioannou YA. Ribosomal proteins in cell proliferation and apoptosis. *Int Rev Immunol* 1999;18:429-48.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-9.

Chow A, Zhou W, Jacobson R. Regulation of AE2 Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger during intestinal development. *Am J Physiol* 1996;271:G330-7.

Chrzanowska-Wodnicka M, Burridge K. Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J Cell Biol* 1996;133:1403-15.

Clark EA, King WG, Brugge JS, Symons M, Hynes RO. Integrin-mediated signals regulated by members of the rho family of GTPases. *J Cell Biol* 1998;142:573-86.

Clemetson KJ, Clemetson JM. Integrins and cardiovascular disease. *Cell Mol Life Sci* 1998;54:502-13.

Clezardin P. Recent insights into the role of integrins in cancer metastasis. *Cell Mol Life Sci* 1998;54:541-8.

Cohen E, Ophir I, Shaul YB. Induced differentiation in HT29, a human colon adenocarcinoma cell line. *J Cell Sci* 1999;112 (Pt 16):2657-66.

Collins JF, Kiela PR, Xu H, Ghishan FK. Expression of rat, renal NHE2 and NHE3 during postnatal development. *Biochim Biophys Acta* 2000;1464:7-17.

Collins JF, Kiela PR, Xu H, Zeng J, Ghishan FK. Increased NHE2 expression in rat intestinal epithelium during ontogeny is transcriptionally mediated. *Am J Physiol* 1998;275:C1143-50.

Collins JF, Xu H, Kiela PR, Zeng J, Ghishan FK. Functional and molecular characterization of NHE3 expression during ontogeny in rat jejunal epithelium. *Am J Physiol* 1997;273:C1937-46.

Collins JF, Xu H, Kiela PR, Zeng J, Ghishan FK. Ontogeny of basolateral membrane sodium-hydrogen exchange (NHE) activity and mRNA expression of NHE-1 and NHE-4 in rat kidney and jejunum. *Biochim Biophys Acta* 1998;1369:247-58.

BIBLIOGRAFÍA

Colognato H, Yurchenco PD. Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn* 2000;218:213-34.

Cominelli F, Nast CC, Dinarello CA, Gentilini P, Zipser RD. Regulation of eicosanoid production in rabbit colon by interleukin-1. *Gastroenterology* 1989;97:1400-5.

Cowey SL, Quast M, Belalcazar LM, Wei J, Deng X, Given R, Singh P. Abdominal obesity, insulin resistance, and colon carcinogenesis are increased in mutant mice lacking gastrin gene expression. *Cancer* 2005;103:2643-53.

Critchley DR. Focal adhesions - the cytoskeletal connection. *Curr Opin Cell Biol* 2000;12:133-9.

Cross HS, Quaroni A. Inhibition of sucrose-isomaltase expression by EGF in the human colon adenocarcinoma cells Caco-2. *Am J Physiol* 1991;261:C1173-83.

Crossman MW, Hautt SM, Gordon JI. The mouse ileal lipid-binding protein gene: a model for studying axial patterning during gut morphogenesis. *J Cell Biol* 1994;126:1547-64.

Cunliffe VT. Memory by modification: the influence of chromatin structure on gene expression during vertebrate development. *Gene* 2003;305:141-50.

Darcy-Vrillon B, Morel MT, Cherbuy C, Bernard F, Posho L, Blachier F, Meslin JC, Duee PH. Metabolic characteristics of pig colonocytes after adaptation to a high fiber diet. *J Nutr* 1993;123:234-43.

Davidson G, Mao B, del Barco Barrantes I, Niehrs C. Kremen proteins interact with Dickkopf1 to regulate anteroposterior CNS patterning. *Development* 2002;129:5587-96.

Davidson NO, Hausman AM, Ifkovits CA, Buse JB, Gould GW, Burant CF, Bell GI. Human intestinal glucose transporter expression and localization of GLUT5. *Am J Physiol* 1992;262:C795-800.

Davis CA, Monnier JM, Nick HS. A coding region determinant of instability regulates levels of manganese superoxide dismutase mRNA. *J Biol Chem* 2001;276:37317-26.

De Arcangelis A, Neuville P, Boukamel R, Lefebvre O, Kedinger M, Simon-Assmann P. Inhibition of laminin alpha 1-chain expression leads to alteration of basement membrane assembly and cell differentiation. *J Cell Biol* 1996;133:417-30.

de Melker AA, Sonnenberg A. Integrins: alternative splicing as a mechanism to regulate ligand binding and integrin signaling events. *Bioessays* 1999;21:499-509.

Debiec H, Cross HS, Peterlik M. 1,25-Dihydroxycholecalciferol-related Na⁺/D-glucose transport in brush-border membrane vesicles from embryonic chick jejunum. Modulation by triiodothyronine. *Eur J Biochem* 1991;201:709-13.

Dedhar S. Cell-substrate interactions and signaling through ILK. *Curr Opin Cell Biol* 2000;12:250-6.

Dedhar S, Hannigan GE. Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembrane signalling. *Curr Opin Cell Biol* 1996;8:657-69.

Desloges N, Basora N, Perreault N, Bouatrouss Y, Sheppard D, Beaulieu JF. Regulated expression of the integrin alpha9beta1 in the epithelium of the developing human gut and in intestinal cell lines: relation with cell proliferation. *J Cell Biochem* 1998;71:536-45.

Dib K. BETA 2 integrin signaling in leukocytes. *Front Biosci* 2000;5:D438-51.

BIBLIOGRAFÍA

Dillon N, Festenstein R. Unravelling heterochromatin: competition between positive and negative factors regulates accessibility. *Trends Genet* 2002;18:252-8.

Drummond F, Sowden J, Morrison K, Edwards YH. The caudal-type homeobox protein Cdx-2 binds to the colon promoter of the carbonic anhydrase 1 gene. *Eur J Biochem* 1996;236:670-81.

Dufour G, Demers MJ, Gagne D, Dydensborg AB, Teller IC, Bouchard V, Degongre I, Beaulieu JF, Cheng JQ, Fujita N, Tsuruo T, Vallee K, Vachon PH. Human intestinal epithelial cell survival and anoikis. Differentiation state-distinct regulation and roles of protein kinase B/Akt isoforms. *J Biol Chem* 2004;279:44113-22.

Duluc I, Freund JN, Leberquier C, Kedinger M. Fetal endoderm primarily holds the temporal and positional information required for mammalian intestinal development. *J Cell Biol* 1994;126:211-21.

Dupont C. [Neuro-hormonal regulation of the function of the enterocyte]. *Presse Med* 1984;13:931-4.

Duprey P, Chowdhury K, Dressler GR, Balling R, Simon D, Guenet JL, Gruss P. A mouse gene homologous to the *Drosophila* gene *caudal* is expressed in epithelial cells from the embryonic intestine. *Genes Dev* 1988;2:1647-54.

Dvorak B, Holubec H, LeBouton AV, Wilson JM, Koldovsky O. Epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha mRNA in rat small intestine: in situ hybridization study. *FEBS Lett* 1994;352:291-5.

Dvorak B, Koldovsky O. The presence of transforming growth factor-alpha in the suckling rat small intestine and pancreas and the absence in rat milk. *Pediatr Res* 1994;35:348-53.

Dvorak B, Kolinska J, McWilliam DL, Williams CS, Higdon T, Zakostelecka M, Koldovsky O. The expression of epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha mRNA in the small intestine of suckling rats: organ culture study. *FEBS Lett* 1998;435:119-24.

Dzierzewicz Z, Kwapisz I, Cwalina B, Wilczok T. The role of butiric acid in growth, proliferation and differentiation of colonocytes. *Gastroenterol. Pol.* 1999:153-159.

Dzierzewicz Z, Orchel A, Weglarz L, Latocha M, Wilczok T. Changes in the cellular behaviour of human colonic cell line Caco-2 in response to butyrate treatment. *Acta Biochim Pol* 2002;49:211-20.

Ebert EC. Mechanisms of colon cancer binding to substratum and cells. *Dig Dis Sci* 1996;41:1551-6.

Eisenhofer G, Aneman A, Friberg P, Hooper D, Fandriks L, Lonroth H, Hunyady B, Mezey E. Substantial production of dopamine in the human gastrointestinal tract. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3864-71.

Eklblom M, Falk M, Salmivirta K, Durbeej M, Eklblom P. Laminin isoforms and epithelial development. *Ann N Y Acad Sci* 1998;857:194-211.

Erickson BA, Longo WE, Panesar N, Mazuski JE, Kaminski DL. The effect of selective cyclooxygenase inhibitors on intestinal epithelial cell mitogenesis. *J Surg Res* 1999;81:101-7.

Escaffit F, Boudreau F, Beaulieu JF. Differential expression of claudin-2 along the human intestine: Implication of GATA-4 in the maintenance of claudin-2 in differentiating cells. *J Cell Physiol* 2005;203:15-26.

BIBLIOGRAFÍA

Escaffit F, Perreault N, Jean D, Francoeur C, Herring E, Rancourt C, Rivard N, Vachon PH, Pare F, Boucher MP, Auclair J, Beaulieu JF. Repressed E-cadherin expression in the lower crypt of human small intestine: a cell marker of functional relevance. *Exp Cell Res* 2005;302:206-20.

Evans GS, Flint N, Potten CS. Primary cultures for studies of cell regulation and physiology in intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol* 1994;56:399-417.

Felsenfeld G, Groudine M. Controlling the double helix. *Nature* 2003;421:448-53.

Ferreira AC, Almeida S, Tavares M, Canedo P, Pereira F, Regalo G, Figueiredo C, Trindade E, Seruca R, Carneiro F, Amil J, Machado JC, Tavela-Veloso F. NOD2/CARD15 and TNFA, but not IL1B and IL1RN, are associated with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:331-9.

Finch PW, Pricolo V, Wu A, Finkelstein SD. Increased expression of keratinocyte growth factor messenger RNA associated with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1996;110:441-51.

Fiorentini C, Matarrese P, Straface E, Falzano L, Fabbri A, Donelli G, Cossarizza A, Boquet P, Malorni W. Toxin-induced activation of Rho GTP-binding protein increases Bcl-2 expression and influences mitochondrial homeostasis. *Exp Cell Res* 1998;242:341-50.

Fogh J, Fogh JM, Orfeo T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 1977;59:221-6.

Foster R, Hu KQ, Lu Y, Nolan KM, Thissen J, Settleman J. Identification of a novel human Rho protein with unusual properties: GTPase deficiency and in vivo farnesylation. *Mol Cell Biol* 1996;16:2689-99.

Fraser JD, Keller D, Martinez V, Santiso-Mere D, Straney R, Briggs MR. Utilization of recombinant adenovirus and dominant negative mutants to characterize hepatocyte nuclear factor 4-regulated apolipoprotein AI and CIII expression. *J Biol Chem* 1997;272:13892-8.

Frech K, Quandt K, Werner T. Finding protein-binding sites in DNA sequences: the next generation. *Trends Biochem Sci* 1997;22:103-4.

Freeman TC, Wood IS, Sirinathsinghji DJ, Beechey RB, Dyer J, Shirazi-Beechey SP. The expression of the Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1) gene in lamb small intestine during postnatal development. *Biochim Biophys Acta* 1993;1146:203-12.

Frigeri A, Gropper MA, Turck CW, Verkman AS. Immunolocalization of the mercurial-insensitive water channel and glycerol intrinsic protein in epithelial cell plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:4328-31.

Frigeri A, Gropper MA, Umenishi F, Kawashima M, Brown D, Verkman AS. Localization of MIWC and GLIP water channel homologs in neuromuscular, epithelial and glandular tissues. *J Cell Sci* 1995;108 (Pt 9):2993-3002.

Frisch SM, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* 1994;124:619-26.

Frisch SM, Vuori K, Ruoslahti E, Chan-Hui PY. Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase. *J Cell Biol* 1996;134:793-9.

Fujikura J, Yamato E, Yonemura S, Hosoda K, Masui S, Nakao K, Miyazaki Ji J, Niwa H. Differentiation of embryonic stem cells is induced by GATA factors. *Genes Dev* 2002;16:784-9.

BIBLIOGRAFÍA

Fuller PJ, Verity K. Colonic sodium-potassium adenosine triphosphate subunit gene expression: ontogeny and regulation by adrenocortical steroids. *Endocrinology* 1990;127:32-8.

Galindo CL, Fadl AA, Sha J, Pillai L, Gutierrez C, Jr., Chopra AK. Microarray and proteomics analyses of human intestinal epithelial cells treated with the *Aeromonas hydrophila* cytotoxic enterotoxin. *Infect Immun* 2005;73:2628-43.

Gamet L, Daviaud D, Denis-Pouxviel C, Remesy C, Murat JC. Effects of short-chain fatty acids on growth and differentiation of the human colon-cancer cell line HT29. *Int J Cancer* 1992;52:286-9.

Gassler N, Rohr C, Schneider A, Kartenbeck J, Bach A, Obermuller N, Otto HF, Autschbach F. Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:G216-28.

Gaudio E, Taddei G, Vetuschi E, Sferra R, Frieri G, Ricciardi G, Caprilli R. Dextran sulfate sodium (DSS) colitis in rats. Clinical, structural, and ultrastructural aspects. *Dig Dis Sci* 1999;44:1458-75.

Gauthier R, Laprise P, Cardin E, Harnois C, Plourde A, Reed JC, Vezina A, Vachon PH. Differential sensitivity to apoptosis between the human small and large intestinal mucosae: linkage with segment-specific regulation of BCL-2 homologs and involvement of signaling pathways. *J Cell Biochem* 2001;82:339-55.

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;119:493-501.

Geberhiwot T, Ingerpuu S, Pedraza C, Neira M, Virtanen I, Tryggvason K, Patarroyo M. Erythromegakaryocytic cells synthesize laminin-8 (alpha4beta1gamma1). *Exp Cell Res* 2000;254:189-95.

Giancotti FG. Signal transduction by the alpha 6 beta 4 integrin: charting the path between laminin binding and nuclear events. *J Cell Sci* 1996;109 (Pt 6):1165-72.

Giancotti FG. Complexity and specificity of integrin signalling. *Nat Cell Biol* 2000;2:E13-4.

Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science* 1999;285:1028-32.

Giuliano M, Lauricella M, Calvaruso G, Carabillo M, Emanuele S, Vento R, Tesoriere G. The apoptotic effects and synergistic interaction of sodium butyrate and MG132 in human retinoblastoma Y79 cells. *Cancer Res* 1999;59:5586-95.

Gonzalez-Zulueta M, Bender CM, Yang AS, Nguyen T, Beart RW, Van Tornout JM, Jones PA. Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. *Cancer Res* 1995;55:4531-5.

Gordon JI. Intestinal epithelial differentiation: new insights from chimeric and transgenic mice. *J Cell Biol* 1989;108:1187-94.

Gordon JI, Hermiston ML. Differentiation and self-renewal in the mouse gastrointestinal epithelium. *Curr Opin Cell Biol* 1994;6:795-803.

Gordon JI, Schmidt GH, Roth KA. Studies of intestinal stem cells using normal, chimeric, and transgenic mice. *Faseb J* 1992;6:3039-50.

BIBLIOGRAFÍA

Gordon PV, Paxton JB, Fox NS. A methodology for distinguishing divergent cell fates within a common progenitor population: adenoma- and neuroendocrine-like cells are confounders of rat ileal epithelial cell (IEC-18) culture. *BMC Cell Biol* 2005;6:2.

Goulet O, Kedinger M, Brousse N, Cuenod B, Colomb V, Patey N, de Potter S, Mougenot JF, Canioni D, Cerf-Bensussan N, et al. Intractable diarrhea of infancy with epithelial and basement membrane abnormalities. *J Pediatr* 1995;127:212-9.

Gout SP, Jacquier-Sarlin MR, Rouard-Talbot L, Rousselle P, Block MR. RhoA-dependent switch between alpha2beta1 and alpha3beta1 integrins is induced by laminin-5 during early stage of HT-29 cell differentiation. *Mol Biol Cell* 2001;12:3268-81.

Greig ER, Boot-Handford RP, Mani V, Sandle GI. Decreased expression of apical Na⁺ channels and basolateral Na⁺, K⁺-ATPase in ulcerative colitis. *J Pathol* 2004;204:84-92.

Grossmann J. Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis--Anoikis". *Apoptosis* 2002;7:247-60.

Grossmann J, Maxson JM, Whitacre CM, Orosz DE, Berger NA, Fiocchi C, Levine AD. New isolation technique to study apoptosis in human intestinal epithelial cells. *Am J Pathology* 1998;153:53-62.

Grosvenor CE, Picciano MF, Baumrucker CR. Hormones and growth factors in milk. *Endocr Rev* 1993;14:710-28.

Guasch RM, Scambler P, Jones GE, Ridley AJ. RhoE regulates actin cytoskeleton organization and cell migration. *Mol Cell Biol* 1998;18:4761-71.

Gupta N, Miyauchi S, Martindale RG, Herdman AV, Podolsky R, Miyake K, Mager S, Prasad PD, Ganapathy ME, Ganapathy V. Upregulation of the amino acid transporter ATB_{0,+} (SLC6A14) in colorectal cancer and metastasis in humans. *Biochim Biophys Acta* 2005;1741:215-23.

Hafez MM, Hsu S, Yan Z, Winawer S, Friedman E. Two roles for transforming growth factor beta 1 in colon enterocytic cell differentiation. *Cell Growth Differ* 1992;3:753-62.

Hague A, Elder DJE, Butt AJ, Paraskeva C. Growth, differentiation and apoptosis: mechanisms of control and deregulation during colorectal tumorigenesis. Halter F, Winton D, Wright NA, editors. *The gut as a model in cell and molecular biology* 1997:291-305.

Hahn U, Stallmach A, Hahn EG, Riecken EO. Basement membrane components are potent promoters of rat intestinal epithelial cell differentiation in vitro. *Gastroenterology* 1990;98:322-35.

Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 1998;279:509-14.

Hannigan GE, Leung-Hagesteijn C, Fitz-Gibbon L, Coppolino MG, Radeva G, Filmus J, Bell JC, Dedhar S. Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature* 1996;379:91-6.

Hansen SH, Zegers MM, Woodrow M, Rodriguez-Viciano P, Chardin P, Mostov KE, McMahon M. Induced expression of Rnd3 is associated with transformation of polarized epithelial cells by the Raf-MEK-extracellular signal-regulated kinase pathway. *Mol Cell Biol* 2000;20:9364-75.

Hasegawa H, Zhang R, Dohrman A, Verkman AS. Tissue-specific expression of mRNA encoding rat kidney water channel CHIP28k by in situ hybridization. *Am J Physiol* 1993;264:C237-45.

BIBLIOGRAFÍA

Hassig CA, Tong JK, Schreiber SL. Fiber-derived butyrate and the prevention of colon cancer. *Chem Biol* 1997;4:783-9.

Hauptmann S, Zardi L, Siri A, Carnemolla B, Borsi L, Castellucci M, Klosterhalfen B, Hartung P, Weis J, Stocker G, et al. Extracellular matrix proteins in colorectal carcinomas. Expression of tenascin and fibronectin isoforms. *Lab Invest* 1995;73:172-82.

Hauri HP, Sterchi EE, Bienz D, Fransen JA, Marxer A. Expression and intracellular transport of microvillus membrane hydrolases in human intestinal epithelial cells. *J Cell Biol* 1985;101:838-51.

Heerdt BG, Houston MA, Augenlicht LH. Potentiation by specific short-chain fatty acids of differentiation and apoptosis in human colonic carcinoma cell lines. *Cancer Res* 1994;54:3288-93.

Hemler ME, Elices MJ, Parker C, Takada Y. Structure of the integrin VLA-4 and its cell-cell and cell-matrix adhesion functions. *Immunol Rev* 1990;114:45-65.

Henning SJ. Plasma concentrations of total and free corticosterone during development in the rat. *Am J Physiol* 1978;235:E451-6.

Henning SJ. Postnatal development: coordination of feeding, digestion, and metabolism. *Am J Physiol* 1981;241:G199-214.

Henning SJ, Ballard PL, Kretchmer N. A study of the cytoplasmic receptors for glucocorticoids in intestine of pre- and postweanling rats. *J Biol Chem* 1975;250:2073-9.

Hermiston ML, Gordon JI. Use of transgenic mice to characterize the multipotent intestinal stem cell and to analyze regulation of gene expression in various epithelial cell lineages as a function of their position along the cephalocaudal and crypt-to-villus (or crypt-to-surface epithelial cuff) axes of the gut. *Semin Dev Biol* 1993;275-291.

Hermiston ML, Gordon JI. Inflammatory bowel disease and adenomas in mice expressing a dominant negative N-cadherin. *Science* 1995;270:1203-7.

Hermiston ML, Gordon JI. In vivo analysis of cadherin function in the mouse intestinal epithelium: essential roles in adhesion, maintenance of differentiation, and regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1995;129:489-506.

Hippenstiel S, Schmeck B, N'Guessan PD, Seybold J, Krull M, Preissner K, Eichel-Streiber CV, Suttrop N. Rho protein inactivation induced apoptosis of cultured human endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;283:L830-8.

Hirano S, Kataoka K. Histogenesis of the mouse jejunal mucosa, with special reference to proliferative cells and absorptive cells. *Arch Histol Jpn* 1986;49:333-48.

Hockenbery D. Defining apoptosis. *Am J Pathol* 1995;146:16-9.

Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, Nahm M, Korsmeyer SJ. BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:6961-5.

Hodin RA, Shei A, Meng S. Transcriptional Activation of the Human Villin Gene During Enterocyte Differentiation. *J Gastrointest Surg* 1997;1:433-438.

Hokfelt T, Pernow B, Wahren J. Substance P: a pioneer amongst neuropeptides. *J Intern Med* 2001;249:27-40.

BIBLIOGRAFÍA

Howe AK, Juliano RL. Distinct mechanisms mediate the initial and sustained phases of integrin-mediated activation of the Raf/MEK/mitogen-activated protein kinase cascade. *J Biol Chem* 1998;273:27268-74.

Hu WP, Tay SK, Zhao Y. Endometriosis-Specific Genes Identified by Real-Time RT-PCR Expression Profiling of Endometriosis versus Autologous Uterine Endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 2005.

Huet C, Sahuquillo-Merino C, Coudrier E, Louvard D. Absorptive and mucus-secreting subclones isolated from a multipotent intestinal cell line (HT-29) provide new models for cell polarity and terminal differentiation. *J Cell Biol* 1987;105:345-57.

Hughes PE, Renshaw MW, Pfaff M, Forsyth J, Keivens VM, Schwartz MA, Ginsberg MH. Suppression of integrin activation: a novel function of a Ras/Raf-initiated MAP kinase pathway. *Cell* 1997;88:521-30.

Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603.

Humphries MJ. Integrin structure. *Biochem Soc Trans* 2000;28:311-39.

Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992;69:11-25.

Ishibashi K, Sasaki S, Saito F, Ikeuchi T, Marumo F. Structure and chromosomal localization of a human water channel (AQP3) gene. *Genomics* 1995;27:352-4.

Jakowlew SB, Mathias A, Lillehoj HS. Transforming growth factor-beta isoforms in the developing chicken intestine and spleen: increase in transforming growth factor-beta 4 with coccidia infection. *Vet Immunol Immunopathol* 1997;55:321-39.

James R, Erler T, Kazenwadel J. Structure of the murine homeobox gene *cdx-2*. Expression in embryonic and adult intestinal epithelium. *J Biol Chem* 1994;269:15229-37.

James R, Kazenwadel J. Homeobox gene expression in the intestinal epithelium of adult mice. *J Biol Chem* 1991;266:3246-51.

Jin XH, Wang ZQ, Siragy HM, Guerrant RL, Carey RM. Regulation of jejunal sodium and water absorption by angiotensin subtype receptors. *Am J Physiol* 1998;275:R515-23.

Johansson S, Kjellen L, Hook M, Timpl R. Substrate adhesion of rat hepatocytes: a comparison of laminin and fibronectin as attachment proteins. *J Cell Biol* 1981;90:260-4.

Joseph RR, Yazer E, Hanakawa Y, Stadnyk AW. Prostaglandins and activation of AC/cAMP prevents anoikis in IEC-18. *Apoptosis*. 2005; [Epub ahead of print].

Karam SM. Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. *Front Biosci* 1999;4:D286-98.

Karatzas G, Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Chatzigianni E, Papanikolaou S, Riza F, Papanikolaou D. E-cadherin expression correlates with tumor differentiation in colorectal cancer. *Hepatology* 1999;46:232-5.

Katoh H, Harada A, Mori K, Negishi M. Socius is a novel Rnd GTPase-interacting protein involved in disassembly of actin stress fibers. *Mol Cell Biol* 2002;22:2952-64.

BIBLIOGRAFÍA

Kedinger M, Haffen K, Simon-Assmann P. Intestinal tissue and cell cultures. *Differentiation* 1987;36:71-85.

Kedinger M, Simon PM, Grenier JF, Haffen K. Role of epithelial--mesenchymal interactions in the ontogenesis of intestinal brush-border enzymes. *Dev Biol* 1981;86:339-47.

Kelly D, McFadyen M, King TP, Morgan PJ. Characterization and autoradiographic localization of the epidermal growth factor receptor in the jejunum of neonatal and weaned pigs. *Reprod Fertil Dev* 1992;4:183-91.

Ketola I, Pentikainen V, Vaskivuo T, Ilvesmaki V, Herva R, Dunkel L, Tapanainen JS, Toppari J, Heikinheimo M. Expression of transcription factor GATA-4 during human testicular development and disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3925-31.

Kiela PR, Hines ER, Collins JF, Ghishan FK. Regulation of the rat NHE3 gene promoter by sodium butyrate. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:G947-56.

Kiela PR, LeSueur J, Collins JF, Ghishan FK. Transcriptional regulation of the rat NHE3 gene. Functional interactions between GATA-5 and Sp family transcription factors. *J Biol Chem* 2003;278:5659-68.

Kikuchi K, Kikuchi T, Ghishan FK. Ontogeny of the Na(+)-H⁺ exchanger in rat ileal brush-border membrane vesicles. *J Membr Biol* 1990;114:257-65.

Kirkland SC. Endocrine differentiation by a human rectal adenocarcinoma cell line (HRA-19). *Differentiation* 1986;33:148-55.

Kleinman HK, Martin GR. Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol.* 2005 Oct;15(5):378-86.

Knudsen KA, Frankowski C, Johnson KR, Wheelock MJ. A role for cadherins in cellular signaling and differentiation. *J Cell Biochem Suppl* 1998;30-31:168-76.

Kojima H, Hidaka H, Matsumura K, Fujita Y, Nishio Y, Maegawa H, Haneda M, Yasuda H, Fujimiya M, Kikkawa R, Kashiwagi A. Concerted regulation of early enterocyte differentiation by insulin-like growth factor I, insulin, and transforming growth factor-beta1. *Proc Assoc Am Physicians* 1998;110:197-206.

Koretz K, Schlag P, Boumsell L, Moller P. Expression of VLA-alpha 2, VLA-alpha 6, and VLA-beta 1 chains in normal mucosa and adenomas of the colon, and in colon carcinomas and their liver metastases. *Am J Pathol* 1991;138:741-50.

Krasinski SD, Van Wering HM, Tannemaat MR, Grand RJ. Differential activation of intestinal gene promoters: functional interactions between GATA-5 and HNF-1 alpha. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:G69-84.

Krestow JK, Rak J, Filmus J, Kerbel RS. Functional dissociation of anoikis-like cell death and activity of stress activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;260:48-53.

Ku NO, Zhou X, Toivola DM, Omary MB. The cytoskeleton of digestive epithelia in health and disease. *Am J Physiol* 1999;277:G1108-37.

Kurokawa M, Lynch K, Podolsky DK. Effects of growth factors on an intestinal epithelial cell line: transforming growth factor beta inhibits proliferation and stimulates differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;142:775-82.

Lambert M, Colnot S, Suh E, L'Horset F, Blin C, Calliot ME, Raymondjean M, Thomasset M, Traber PG, Perret C. cis-Acting elements and transcription factors involved in the intestinal specific expression of the rat calbindin-D9K gene: binding of the intestine-specific transcription factor Cdx-2 to the TATA box. *Eur J Biochem* 1996;236:778-88.

BIBLIOGRAFÍA

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissoe SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001;409:860-921.

Landowski CP, Anderle P, Sun D, Sadee W, Amidon GL. Transporter and ion channel gene expression after Caco-2 cell differentiation using 2 different microarray technologies. *Aaps J* 2004;6:e21.

Laprise P, Langlois MJ, Boucher MJ, Jobin C, Rivard N. Down-regulation of MEK/ERK signaling by E-cadherin-dependent PI3K/Akt pathway in differentiating intestinal epithelial cells. *J Cell Physiol* 2004;199:32-9.

Laudanna C, Campbell JJ, Butcher EC. Role of Rho in chemoattractant-activated leukocyte adhesion through integrins. *Science* 1996;271:981-3.

Laverriere AC, MacNeill C, Mueller C, Poelmann RE, Burch JB, Evans T. GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut. *J Biol Chem* 1994;269:23177-84.

Lawson LD, Powell DW. Bradykinin-stimulated eicosanoid synthesis and secretion by rabbit ileal components. *Am J Physiol* 1987;252:G783-90.

LeDuc LE, McRoberts JA, Vidrich A. Eicosanoid production by a differentiated canine colonic epithelial cell line, VNCC. *Gastroenterology* 1994;106:297-305.

Leeper LL, Henning SJ. Development and tissue distribution of sucrase-isomaltase mRNA in rats. *Am J Physiol* 1990;258:G52-8.

Leitinger B, McDowall A, Stanley P, Hogg N. The regulation of integrin function by Ca(2+). *Biochim Biophys Acta* 2000;1498:91-8.

Leivo I, Tani T, Laitinen L, Bruns R, Kivilaakso E, Lehto VP, Burgeson RE, Virtanen I. Anchoring complex components laminin-5 and type VII collagen in intestine: association with migrating and differentiating enterocytes. *J Histochem Cytochem* 1996;44:1267-77.

Lekstrom-Himes J, Xanthopoulos KG. Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. *J Biol Chem* 1998;273:28545-8.

Lescalle-Matys L, Dyer J, Scott D, Freeman TC, Wright EM, Shirazi-Beechey SP. Regulation of the ovine intestinal Na⁺/glucose co-transporter (SGLT1) is dissociated from mRNA abundance. *Biochem J* 1993;291 (Pt 2):435-40.

Lesuffleur T, Barbat A, Dussaulx E, Zweibaum A. Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells. *Cancer Res* 1990;50:6334-43.

Lesuffleur T, Kornowski A, Augeron C, Dussaulx E, Barbat A, Laboisie C, Zweibaum A. Increased growth adaptability to 5-fluorouracil and methotrexate of HT-29 sub-populations selected for their commitment to differentiation. *Int J Cancer* 1991;49:731-7.

BIBLIOGRAFÍA

Lesuffleur T, Porchet N, Aubert JP, Swallow D, Gum JR, Kim YS, Real FX, Zweibaum A. Differential expression of the human mucin genes MUC1 to MUC5 in relation to growth and differentiation of different mucus-secreting HT-29 cell subpopulations. *J Cell Sci* 1993;106 (Pt 3):771-83.

Levin RJ, Koldovsky O, Hoskova J, Jirsova V, Uher J. Electrical activity across human foetal small intestine associated with absorption processes. *Gut* 1968;9:206-13.

Levy E, Beaulieu JF, Delvin E, Seidman E, Yotov W, Basque JR, Menard D. Human crypt intestinal epithelial cells are capable of lipid production, apolipoprotein synthesis, and lipoprotein assembly. *J Lipid Res* 2000;41:12-22.

Levy P, Robin H, Bertrand F, Kornprobst M, Capeau J. Butyrate-treated colonic Caco-2 cells exhibit defective integrin-mediated signaling together with increased apoptosis and differentiation. *J Cell Physiol* 2003;197:336-47.

Levy P, Robin H, Kornprobst M, Capeau J, Cherqui G. Enterocytic differentiation of the human Caco-2 cell line correlates with alterations in integrin signaling. *J Cell Physiol* 1998;177:618-27.

Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997;91:479-89.

Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 1992;257:967-71.

Liberto M, Cobrinik D, Minden A. Rho regulates p21(CIP1), cyclin D1, and checkpoint control in mammary epithelial cells. *Oncogene* 2002;21:1590-9.

Litvak DA, Evers BM, Hwang KO, Hellmich MR, Ko TC, Townsend CM, Jr. Butyrate-induced differentiation of Caco-2 cells is associated with apoptosis and early induction of p21Waf1/Cip1 and p27Kip1. *Surgery* 1998;124:161-9; discussion 169-70.

Liu YW, Sanders MA, Basson MD. Human Caco-2 intestinal epithelial motility is associated with tyrosine kinase and cytoskeletal focal adhesion kinase signals. *J Surg Res* 1998;77:112-8.

Longhurst CM, Jennings LK. Integrin-mediated signal transduction. *Cell Mol Life Sci* 1998;54:514-26.

Lopez-Navarro AT, Ortega MA, Peragon J, Bueno JD, Gil A, Sanchez-Pozo A. Deprivation of dietary nucleotides decreases protein synthesis in the liver and small intestine in rats. *Gastroenterology* 1996;110:1760-9.

Lorentz O, Duluc I, Arcangelis AD, Simon-Assmann P, Kedinger M, Freund JN. Key role of the Cdx2 homeobox gene in extracellular matrix-mediated intestinal cell differentiation. *J Cell Biol* 1997;139:1553-65.

Louvard D, Kedinger M, Hauri HP. The differentiating intestinal epithelial cell: establishment and maintenance of functions through interactions between cellular structures. *Annu Rev Cell Biol* 1992;8:157-95.

Lu Y, Lin YZ, LaPushin R, Cuevas B, Fang X, Yu SX, Davies MA, Khan H, Furui T, Mao M, Zinner R, Hung MC, Steck P, Siminovitch K, Mills GB. The PTEN/MMAC1/TEP tumor suppressor gene decreases cell growth and induces apoptosis and anoikis in breast cancer cells. *Oncogene* 1999;18:7034-45.

Lussier C, Basora N, Bouatrouss Y, Beaulieu JF. Integrins as mediators of epithelial cell-matrix interactions in the human small intestinal mucosa. *Microsc Res Tech* 2000;51:169-78.

BIBLIOGRAFÍA

Lyahyai J, Goldammer T, Beattie AE, Zaragoza P, Martin-Burriel I. Positional and functional characterisation of apoptosis related genes belonging to the BCL2 family in sheep. *Cytogenet Genome Res* 2005;109:519-26.

Ma F, Zhang C, Prasad KV, Freeman GJ, Schlossman SF. Molecular cloning of Porimin, a novel cell surface receptor mediating oncotic cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:9778-83.

Madara JL, Stafford J, Dharmasathaphorn K, Carlson S. Structural analysis of a human intestinal epithelial cell line. *Gastroenterology* 1987;92:1133-45.

Mahida YR, Makh S, Hyde S, Gray T, Borriello SP. Effect of *Clostridium difficile* toxin A on human intestinal epithelial cells: induction of interleukin 8 production and apoptosis after cell detachment. *Gut* 1996;38:337-47.

Mahraoui L, Rodolosse A, Barbat A, Dussaulx E, Zweibaum A, Rousset M, Brot-Laroche E. Presence and differential expression of SGLT1, GLUT1, GLUT2, GLUT3 and GLUT5 hexose-transporter mRNAs in Caco-2 cell clones in relation to cell growth and glucose consumption. *Biochem J* 1994;298 Pt 3:629-33.

Mahraoui L, Rousset M, Dussaulx E, Darmoul D, Zweibaum A, Brot-Laroche E. Expression and localization of GLUT-5 in Caco-2 cells, human small intestine, and colon. *Am J Physiol* 1992;263:G312-8.

Malo C, Berteloot A. Analysis of kinetic data in transport studies: new insights from kinetic studies of Na(+)-D-glucose cotransport in human intestinal brush-border membrane vesicles using a fast sampling, rapid filtration apparatus. *J Membr Biol* 1991;122:127-41.

Mannick EE, Bonomolo JC, Horswell R, Lentz JJ, Serrano MS, Zapata-Velandia A, Gastanaduy M, Himel JL, Rose SL, Udall JN, Jr., Hornick CA, Liu Z. Gene expression in mononuclear cells from patients with inflammatory bowel disease. *Clin Immunol* 2004;112:247-57.

Mariadason JM, Arango D, Corner GA, Aranes MJ, Hotchkiss KA, Yang W, Augenlicht LH. A gene expression profile that defines colon cell maturation in vitro. *Cancer Res* 2002;62:4791-804.

Mariadason JM, Bordonaro M, Aslam F, Shi L, Kuraguchi M, Velcich A, Augenlicht LH. Down-regulation of beta-catenin TCF signaling is linked to colonic epithelial cell differentiation. *Cancer Res* 2001;61:3465-71.

Mariadason JM, Nicholas C, L'Italien KE, Zhuang M, Smartt HJ, Heerdt BG, Yang W, Corner GA, Wilson AJ, Klampfer L, Arango D, Augenlicht LH. Gene expression profiling of intestinal epithelial cell maturation along the crypt-villus axis. *Gastroenterology* 2005;128:1081-8.

Mariadason JM, Rickard KL, Barkla DH, Augenlicht LH, Gibson PR. Divergent phenotypic patterns and commitment to apoptosis of Caco-2 cells during spontaneous and butyrate-induced differentiation. *J Cell Physiol* 2000;183:347-54.

Markowitz AJ, Wu GD, Bader A, Cui Z, Chen L, Traber PG. Regulation of lineage-specific transcription of the sucrase-isomaltase gene in transgenic mice and cell lines. *Am J Physiol* 1995;269:G925-39.

Markowitz AJ, Wu GD, Birkenmeier EH, Traber PG. The human sucrase-isomaltase gene directs complex patterns of gene expression in transgenic mice. *Am J Physiol* 1993;265:G526-39.

Marrs JA, Nelson WJ. Cadherin cell adhesion molecules in differentiation and embryogenesis. *Int Rev Cytol* 1996;165:159-205.

Martin SJ, Cotter TG. Disruption of microtubules induces an endogenous suicide pathway in human leukaemia HL-60 cells. *Cell Tissue Kinet* 1990;23:545-59.

BIBLIOGRAFÍA

Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green DR. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 1995;182:1545-56.

Martinez C, Bhattacharya S, Freeman T, Churchman M, Ilyas M. Expression profiling of murine intestinal adenomas reveals early deregulation of multiple matrix metalloproteinase (Mmp) genes. *J Pathol* 2005;206:100-10.

Martinez E. Multi-protein complexes in eukaryotic gene transcription. *Plant Mol Biol* 2002;50:925-47.

Martins LM, Earnshaw W. Apoptosis: alive and kicking in 1997. *Trends Cell Biol* 1997;111-114.

Matsubara K, Kubota M, Adachi S, Kuwakado K, Hirota H, Wakazono Y, Akiyama Y, Mikawa H. Different mode of cell death induced by calcium ionophore in human leukemia cell lines: possible role of constitutive endonuclease. *Exp Cell Res* 1994;210:19-25.

Matsumoto K, Takao Y, Akazawa S, Yano M, Uotani S, Kawasaki E, Takino H, Yamasaki H, Okuno S, Yamaguchi Y, et al. Developmental change of facilitative glucose transporter expression in rat embryonal and fetal intestine. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;193:1275-82.

Matsumura H, Shimizu Y, Ohsawa Y, Kawahara A, Uchiyama Y, Nagata S. Necrotic death pathway in Fas receptor signaling. *J Cell Biol* 2000;151:1247-56.

McCarthy JB, Palm SL, Furcht LT. Migration by haptotaxis of a Schwann cell tumor line to the basement membrane glycoprotein laminin. *J Cell Biol* 1983;97:772-7.

McDonald MC, Henning SJ. Synergistic effects of thyroxine and dexamethasone on enzyme ontogeny in rat small intestine. *Pediatr Res* 1992;32:306-11.

McGovern DP, van Heel DA, Ahmad T, Jewell DP. NOD2 (CARD15), the first susceptibility gene for Crohn's disease. *Gut* 2001;49:752-4.

McGowan KA, Marinkovich MP. Laminins and human disease. *Microsc Res Tech* 2000;51:262-79.

Menard D, Beaulieu JF. Human intestinal brush border membrane hydrolases. Bkaily G, editor. *Membrane physiopatology* 1994:319-341.

Menard D, Dagenais P, Calvert R. Morphological changes and cellular proliferation in mouse colon during fetal and postnatal development. *Anat Rec* 1994;238:349-59.

Menard D, Pothier P. Radioautographic localization of epidermal growth factor receptors in human fetal gut. *Gastroenterology* 1991;101:640-9.

Meredith JE, Jr., Fazeli B, Schwartz MA. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell* 1993;4:953-61.

Meredith JE, Jr., Schwartz MA. Integrins, adhesion and apoptosis. *Trends Cell Biol* 1997:146-150.

Mesonero J, Mahraoui L, Matosin M, Rodolosse A, Rousset M, Brot-Laroche E. Expression of the hexose transporters GLUT1-GLUT5 and SGLT1 in clones of Caco-2 cells. *Biochem Soc Trans* 1994;22:681-4.

Meyer BI, Gruss P. Mouse Cdx-1 expression during gastrulation. *Development* 1993;117:191-203.

BIBLIOGRAFÍA

Mills EM, Xu D, Fergusson MM, Combs CA, Xu Y, Finkel T. Regulation of cellular oncosis by uncoupling protein 2. *J Biol Chem* 2002;277:27385-92.

Miñambres Herráiz R, Guash Aguilar RM, Pérez Aragón MA, Guerri Sirena C. Estudio del mecanismo de activación de ROCK-1 durante la apoptosis inducida por etanol en astrositos. Libro de Actas del XXVIII Congreso de la SEBBM, Zaragoza, 2005.

Miranti CK, Brugge JS. Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nat Cell Biol* 2002;4:E83-90.

Mitchelmore C, Troelsen JT, Spodsberg N, Sjostrom H, Noren O. Interaction between the homeodomain proteins Cdx2 and HNF1alpha mediates expression of the lactase-phlorizin hydrolase gene. *Biochem J* 2000;346 Pt 2:529-35.

Miyamoto K, Hase K, Taketani Y, Minami H, Oka T, Nakabou Y, Hagihira H. Developmental changes in intestinal glucose transporter mRNA levels. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;183:626-31.

Molkentin JD. The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J Biol Chem* 2000;275:38949-52.

Molmenti EP, Ziambaras T, Perlmutter DH. Evidence for an acute phase response in human intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 1993;268:14116-24.

Montgomery RK, Mulberg AE, Grand RJ. Development of the human gastrointestinal tract: twenty years of progress. *Gastroenterology* 1999;116:702-31.

Morozevich GE, Kozlova NI, Chubukina AN, Berman AE. Role of integrin alphavbeta3 in substrate-dependent apoptosis of human intestinal carcinoma cells. *Biochemistry (Mosc)* 2003;68:416-23.

Moss SF, Agarwal B, Arber N, Guan RJ, Krajewska M, Krajewski S, Reed JC, Holt PR. Increased intestinal Bak expression results in apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;223:199-203.

Moxey PC, Trier JS. Specialized cell types in the human fetal small intestine. *Anat Rec* 1978;191:269-85.

Moyer MP, Huot RI, Ramirez A, Jr., Joe S, Meltzer MS, Gendelman HE. Infection of human gastrointestinal cells by HIV-1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1990;6:1409-15.

Murch SH, MacDonald TT, Walker-Smith JA, Levin M, Lionetti P, Klein NJ. Disruption of sulphated glycosaminoglycans in intestinal inflammation. *Lancet* 1993;341:711-4.

Nagtegaal ID, Gaspar CG, Peltenburg LT, Marijnen CA, Kapiteijn E, van de Velde CJ, Fodde R, van Krieken JH. Radiation induces different changes in expression profiles of normal rectal tissue compared with rectal carcinoma. *Virchows Arch* 2005;446:127-35.

Nakagawa I, Nakata M, Kawabata S, Hamada S. Cytochrome c-mediated caspase-9 activation triggers apoptosis in *Streptococcus pyogenes*-infected epithelial cells. *Cell Microbiol* 2001;3:395-405.

Nakano K, Mizuno T, Sowa Y, Orita T, Yoshino T, Okuyama Y, Fujita T, Ohtani-Fujita N, Matsukawa Y, Tokino T, Yamagishi H, Oka T, Nomura H, Sakai T. Butyrate activates the WAF1/Cip1 gene promoter through Sp1 sites in a p53-negative human colon cancer cell line. *J Biol Chem* 1997;272:22199-206.

Nanthakumar NN, Henning SJ. Ontogeny of sucrase-isomaltase gene expression in rat intestine: responsiveness to glucocorticoids. *Am J Physiol* 1993;264:G306-11.

BIBLIOGRAFÍA

Nguyen BP, Gil SG, Carter WG. Deposition of laminin 5 by keratinocytes regulates integrin adhesion and signaling. *J Biol Chem* 2000;275:31896-907.

Niessner M, Volk BA. Altered Th1/Th2 cytokine profiles in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease as assessed by quantitative reversed transcribed polymerase chain reaction (RT-PCR). *Clin Exp Immunol* 1995;101:428-35.

Nobes CD, Hall A. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 1995;81:53-62.

Nobes CD, Lauritzen I, Mattei MG, Paris S, Hall A, Chardin P. A new member of the Rho family, Rnd1, promotes disassembly of actin filament structures and loss of cell adhesion. *J Cell Biol* 1998;141:187-97.

O'Connor KL, Nguyen BK, Mercurio AM. RhoA function in lamellae formation and migration is regulated by the alpha6beta4 integrin and cAMP metabolism. *J Cell Biol* 2000;148:253-8.

O'Connor TP, Diamond J. Ontogeny of intestinal safety factors: lactase capacities and lactose loads. *Am J Physiol* 1999;276:R753-65.

Odle J, Zijlstra RT, Donovan SM. Intestinal effects of milkborne growth factors in neonates of agricultural importance. *J Anim Sci* 1996;74:2509-22.

Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:603-6.

Okahara S, Arimura Y, Yabana T, Kobayashi K, Gotoh A, Motoya S, Imamura A, Endo T, Imai K. Inflammatory gene signature in ulcerative colitis with cDNA macroarray analysis. *Aliment Pharmacol Ther* 2005;21:1091-7.

Oliver BL, Sha'afi RI, Hajjar JJ. Transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor activate mitogen-activated protein kinase and its substrates in intestinal epithelial cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995;210:162-70.

Ophir I, Cohen E, Ben Shaul Y. Apical polarity in human colon carcinoma cell lines. *Tissue Cell* 1995;27:659-66.

Orian-Rousseau V, Aberdam D, Fontao L, Chevalier L, Meneguzzi G, Kedinger M, Simon-Assmann P. Developmental expression of laminin-5 and HD1 in the intestine: epithelial to mesenchymal shift for the laminin gamma-2 chain subunit deposition. *Dev Dyn* 1996;206:12-23.

Orkin SH. GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood* 1992;80:575-81.

Orphanides G, Reinberg D. A unified theory of gene expression. *Cell* 2002;108:439-51.

Ortega MA, Gil A, Sanchez-Pozo A. Maturation status of small intestine epithelium in rats deprived of dietary nucleotides. *Life Sci* 1995;56:1623-30.

Ortega MA, Nunez MC, Gil A, Sanchez-Pozo A. Dietary nucleotides accelerate intestinal recovery after food deprivation in old rats. *J Nutr* 1995;125:1413-8.

Pacha J, Miksik I. Distribution of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase along the rat intestine. *Life Sci* 1994;54:745-9.

Pacha J, Miksik I. 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase in developing rat intestine. *J Endocrinol* 1996;148:561-6.

BIBLIOGRAFÍA

Pacha J, Miksik I, Lisa V, Pohlova I. Hormonal regulation of intestinal 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Life Sci* 1997;61:2391-6.

Pacha J, Popp M, Capek K. Amiloride-sensitive sodium transport of the rat distal colon during early postnatal development. *Pflugers Arch* 1987;409:194-9.

Pacha J, Teisinger J, Popp M, Capek K. Na,K-ATPase and the development of Na⁺ transport in rat distal colon. *J Membr Biol* 1991;120:201-10.

Pageot LP, Perreault N, Basora N, Francoeur C, Magny P, Beaulieu JF. Human cell models to study small intestinal functions: recapitulation of the crypt-villus axis. *Microsc Res Tech* 2000;49:394-406.

Paul EC, Hochman J, Quaroni A. Conditionally immortalized intestinal epithelial cells: novel approach for study of differentiated enterocytes. *Am J Physiol* 1993;265:C266-78.

Paul-Samojedny M, Kokocinska D, Samojedny A, Mazurek U, Partyka R, Lorenz Z, Wilczok T. Expression of cell survival/death genes: Bcl-2 and Bax at the rate of colon cancer prognosis. *Biochim Biophys Acta* 2005;1741:25-9.

Paulsson M. The role of Ca²⁺ binding in the self-aggregation of laminin-nidogen complexes. *J Biol Chem* 1988;263:5425-30.

Pedraza C, Geberhiwot T, Ingerpuu S, Assefa D, Wondimu Z, Kortessmaa J, Tryggvason K, Virtanen I, Patarroyo M. Monocytic cells synthesize, adhere to, and migrate on laminin-8 (alpha 4 beta 1 gamma 1). *J Immunol* 2000;165:5831-8.

Pelsters MM, Namiot Z, Kisielewski W, Namiot A, Januszkiewicz M, Hermens WT, Glatz JF. Intestinal-type and liver-type fatty acid-binding protein in the intestine. Tissue distribution and clinical utility. *Clin Biochem* 2003;36:529-35.

Penttila IA, van Spriel AB, Zhang MF, Xian CJ, Steeb CB, Cummins AG, Zola H, Read LC. Transforming growth factor-beta levels in maternal milk and expression in postnatal rat duodenum and ileum. *Pediatr Res* 1998;44:524-31.

Perez-Tomas R, Cullere X, Asbert M, Diaz-Ruiz C. Immunoelectron microscopic localisation of transforming growth factor alpha in rat colon. *Gut* 1994;35:1086-9.

Perez-Tomas R, Cullere X, Diaz C. Immunohistochemical localization of transforming growth factor alpha in the developing rat colon. *Gastroenterology* 1993;104:789-95.

Perreault N, Beaulieu JF. Primary cultures of fully differentiated and pure human intestinal epithelial cells. *Exp Cell Res* 1998;245:34-42.

Perreault N, Herring-Gillam FE, Desloges N, Belanger I, Pageot LP, Beaulieu JF. Epithelial vs mesenchymal contribution to the extracellular matrix in the human intestine. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;248:121-6.

Perreault N, Jean-Francois B. Use of the dissociating enzyme thermolysin to generate viable human normal intestinal epithelial cell cultures. *Exp Cell Res* 1996;224:354-64.

Perreault N, Vachon PH, Beaulieu JF. Appearance and distribution of laminin A chain isoforms and integrin alpha 2, alpha 3, alpha 6, beta 1, and beta 4 subunits in the developing human small intestinal mucosa. *Anat Rec* 1995;242:242-50.

Pfundt R, van Ruissen F, van Vlijmen-Willems IM, Alkemade HA, Zeeuwen PL, Jap PH, Dijkman H, Fransen J, Croes H, van Erp PE, Schalkwijk J. Constitutive and inducible expression of SKALP/elafin provides anti-elastase defense in human epithelia. *J Clin Invest* 1996;98:1389-99.

BIBLIOGRAFÍA

Piazza GA, Rahm AL, Krutzsch M, Sperl G, Paranka NS, Gross PH, Brendel K, Burt RW, Alberts DS, Pamukcu R, et al. Antineoplastic drugs sulindac sulfide and sulfone inhibit cell growth by inducing apoptosis. *Cancer Res* 1995;55:3110-6.

Pinto M, Appay M-D, Simon-Assmann P, Chevalier G, Dracopoli N, Foch J, Zweibaum A. Enterocytic differentiation of cultured human colon cancer cells by replacement of glucose by galactose in the medium. *Biol Cell* 1982:193-196.

Pinto M, Robine-Leon S, Appay MD, Keding M, Triadou N, Dussaulx E, Lacroix B, Simon-Assmann P, Haffen K, Fogh J, Zweibaum A. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol Cell* 1983:323-330.

Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW. Ligand binding to integrins. *J Biol Chem* 2000;275:21785-8.

Podolsky DK. Inflammatory bowel disease (2). *N Engl J Med* 1991;325:1008-16.

Podolsky DK. Inflammatory bowel disease (1). *N Engl J Med* 1991;325:928-37.

Podolsky DK, Lynch-Devaney K, Stow JL, Oates P, Murgue B, De-Beaumont M, Sands BE, Mahida YR. Identification of human intestinal trefoil factor. Goblet cell-specific expression of a peptide targeted for apical secretion. *J Biol Chem* 1993;268:12230.

Pohlova I, Miksik I, Pacha J. The role of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in maturation of the intestine. *Mech Ageing Dev* 1997;98:139-50.

Poirier J. Cuadernos de Histología. 1985.

Potten CS. Epithelial cell growth and differentiation. II. Intestinal apoptosis. *Am J Physiol* 1997;273:G253-7.

Potten CS, Allen TD. Ultrastructure of cell loss in intestinal mucosa. *J Ultrastruct Res* 1977;60:272-7.

Potter GD, Burlingame SM. Glucose-coupled sodium absorption in the developing rat colon. *Am J Physiol* 1986;250:G221-6.

Potter GD, Schmidt KL, Lester R. Glucose absorption by in vitro perfused colon of the fetal rat. *Am J Physiol* 1983;245:G424-30.

Prasad KN. Butyric acid: a small fatty acid with diverse biological functions. *Life Sci* 1980;27:1351-8.

Pringault E, Arpin M, Garcia A, Finidori J, Louvard D. A human villin cDNA clone to investigate the differentiation of intestinal and kidney cells in vivo and in culture. *Embo J* 1986;5:3119-24.

Probstmeier R, Martini R, Schachner M. Expression of J1/tenascin in the crypt-villus unit of adult mouse small intestine: implications for its role in epithelial cell shedding. *Development* 1990;109:313-21.

Qian BF, Hammarstrom ML, Danielsson A. Differential expression of vasoactive intestinal polypeptide receptor 1 and 2 mRNA in murine intestinal T lymphocyte subtypes. *J Neuroendocrinol* 2001;13:818-25.

Qian BF, Zhou GQ, Hammarstrom ML, Danielsson A. Both substance P and its receptor are expressed in mouse intestinal T lymphocytes. *Neuroendocrinology* 2001;73:358-68.

Quaroni A, Beaulieu JF. Cell dynamics and differentiation of conditionally immortalized human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 1997;113:1198-213.

BIBLIOGRAFÍA

Quaroni A, Isselbacher KJ. Cytotoxic effects and metabolism of benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in duodenal and ileal epithelial cell cultures. *J Natl Cancer Inst* 1981;67:1353-62.

Quaroni A, May RJ. Establishment and characterization of intestinal epithelial cell cultures. *Methods Cell Biol* 1980;21B:403-27.

Quaroni A, Paul EC, Nichols BL. Intracellular degradation and reduced cell-surface expression of sucrase-isomaltase in heat-shocked Caco-2 cells. *Biochem J* 1993;292 (Pt 3):725-34.

Quaroni A, Wands J, Trelstad RL, Isselbacher KJ. Epithelioid cell cultures from rat small intestine. Characterization by morphologic and immunologic criteria. *J Cell Biol* 1979;80:248-65.

Qureshi FG, Leaphart C, Cetin S, Li J, Grishin A, Watkins S, Ford HR, Hackam DJ. Increased expression and function of integrins in enterocytes by endotoxin impairs epithelial restitution. *Gastroenterology* 2005;128:1012-22.

Rao M, Manishen WJ, Maheshwari Y, Sykes DE, Siyanova EY, Tyner AL, Weiser MM. Laminin receptor expression in rat intestine and liver during development and differentiation. *Gastroenterology* 1994;107:764-72.

Riedel BD, Ghishan FK. Maturation of chloride-bicarbonate exchange in rat ileal brush border membrane vesicles. *Pediatr Res* 1989;25:189-93.

Riedl SE, Faissner A, Schlag P, Von Herbay A, Koretz K, Moller P. Altered content and distribution of tenascin in colitis, colon adenoma, and colorectal carcinoma. *Gastroenterology* 1992;103:400-6.

Riento K, Guasch RM, Garg R, Jin B, Ridley AJ. RhoE binds to ROCK I and inhibits downstream signaling. *Mol Cell Biol* 2003;23:4219-29.

Riento K, Totty N, Villalonga P, Garg R, Guasch R, Ridley AJ. RhoE function is regulated by ROCK I-mediated phosphorylation. *Embo J* 2005;24:1170-80.

Riento K, Villalonga P, Garg R, Ridley A. Function and regulation of RhoE. *Biochem Soc Trans* 2005;33:649-51.

Robertson KD. DNA methylation and chromatin - unraveling the tangled web. *Oncogene* 2002;21:5361-79.

Rojiani MV, Finlay BB, Gray V, Dedhar S. In vitro interaction of a polypeptide homologous to human Ro/SS-A antigen (calreticulin) with a highly conserved amino acid sequence in the cytoplasmic domain of integrin alpha subunits. *Biochemistry* 1991;30:9859-66.

Rousset M. The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie* 1986;68:1035-40.

Ruemmele FM, Dionne S, Beaulieu JF, Levy E, Seidman EG. TNFalpha-induced human intestinal crypt cell growth inhibition is mediated via the p55 TNF-R1. *Gastroenterology* 1998:A1176.

Ruemmele FM, Russo P, Beaulieu J, Dionne S, Levy E, Lentze MJ, Seidman EG. Susceptibility to FAS-induced apoptosis in human nontumoral enterocytes: role of costimulatory factors. *J Cell Physiol* 1999;181:45-54.

Ruemmele FM, Schwartz S, Seidman EG, Dionne S, Levy E, Lentze MJ. Butyrate induced Caco-2 cell apoptosis is mediated via the mitochondrial pathway. *Gut* 2003;52:94-100.

Ruoslahti E. Stretching is good for a cell. *Science* 1997;276:1345-6.

Rutzky LP, Moyer MP. Human cell lines in colon cancer research. Moyer MP, Poste GH, editors. *Colon cancer cells* 1990;155-202.

BIBLIOGRAFÍA

Sahai E, Marshall CJ. RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2:133-42.

Salahshor S, Goncalves J, Chetty R, Gallinger S, Woodgett JR. Differential gene expression profile reveals deregulation of pregnancy specific beta1 glycoprotein 9 early during colorectal carcinogenesis. *BMC Cancer* 2005;5:66.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 1989.

Scarpa S, D'Orazi G, Modesti A, Valia S, Zucco F, Stamatii A. Expression and synthesis of fibronectin and laminin by an intestinal epithelial cell line. *Tissue Cell* 1988;20:305-12.

Scheving LA, Jin WH, Chong KM, Gardner W, Cope FO. Dying enterocytes downregulate signaling pathways converging on Ras: rescue by protease inhibition. *Am J Physiol* 1998;274:C1363-72.

Schlaepfer DD, Hanks SK, Hunter T, van der Geer P. Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* 1994;372:786-91.

Schlaepfer DD, Hunter T. Integrin signalling and tyrosine phosphorylation: just the FAKs? *Trends Cell Biol* 1998;8:151-7.

Schmehl K, Florian S, Jacobasch G, Salomon A, Korber J. Deficiency of epithelial basement membrane laminin in ulcerative colitis affected human colonic mucosa. *Int J Colorectal Dis* 2000;15:39-48.

Schmidt GH, Garbutt DJ, Wilkinson MM, Ponder BA. Clonal analysis of intestinal crypt populations in mouse aggregation chimaeras. *J Embryol Exp Morphol* 1985;85:121-30.

Schoenwaelder SM, Burridge K. Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11:274-86.

Schwartz B, Avivi-Green C, Polak-Charcon S. Sodium butyrate induces retinoblastoma protein dephosphorylation, p16 expression and growth arrest of colon cancer cells. *Mol Cell Biochem* 1998;188:21-30.

Schwartz MA, Ginsberg MH. Networks and crosstalk: integrin signalling spreads. *Nat Cell Biol* 2002;4:E65-8.

Sebastio G, Hunziker W, O'Neill B, Malo C, Menard D, Auricchio S, Semenza G. The biosynthesis of intestinal sucrase-isomaltase in human embryo is most likely controlled at the level of transcription. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;149:830-9.

Settleman J. Getting in shape with Rho. *Nat Cell Biol* 2000;2:E7-9.

Shepherd RW, Hamilton JR, Gall DG. The postnatal development of sodium transport in the proximal small intestine of the rabbit. *Pediatr Res* 1980;14:250-3.

Shibayama H, Anzai N, Braun SE, Fukuda S, Mantel C, Broxmeyer HE. H-Ras is involved in the inside-out signaling pathway of interleukin-3-induced integrin activation. *Blood* 1999;93:1540-8.

Shie JL, Chen ZY, Fu M, Pestell RG, Tseng CC. Gut-enriched Kruppel-like factor represses cyclin D1 promoter activity through Sp1 motif. *Nucleic Acids Res* 2000;28:2969-76.

Shie JL, Chen ZY, O'Brien MJ, Pestell RG, Lee ME, Tseng CC. Role of gut-enriched Kruppel-like factor in colonic cell growth and differentiation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G806-14.

BIBLIOGRAFÍA

Shimizu T, Suzuki M, Fujimura J, Hisada K, Yoshikazu O, Obinata K, Yamashiro Y. The relationship between the concentration of dextran sodium sulfate and the degree of induced experimental colitis in weanling rats. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2003; 37:481-6.

Shintani T, Fushiki T, Fukuoka S, Takahashi-Iwanaga H, Sugimoto E. Differentiation of intestinal epithelial cell line (IEC-18) by an acid extract of rat small intestine. *FEBS Lett* 1989;255:423-6.

Shivdasani RA. Molecular regulation of vertebrate early endoderm development. *Dev Biol* 2002;249:191-203.

Shu R, David ES, Ferraris RP. Dietary fructose enhances intestinal fructose transport and GLUT5 expression in weaning rats. *Am J Physiol* 1997;272:G446-53.

Shu R, David ES, Ferraris RP. Luminal fructose modulates fructose transport and GLUT-5 expression in small intestine of weaning rats. *Am J Physiol* 1998;274:G232-9.

Silberg DG, Swain GP, Suh ER, Traber PG. Cdx1 and cdx2 expression during intestinal development. *Gastroenterology* 2000;119:961-71.

Simon-Assmann P, Duclos B, Orian-Rousseau V, Arnold C, Mathelin C, Engvall E, Kedinger M. Differential expression of laminin isoforms and alpha 6-beta 4 integrin subunits in the developing human and mouse intestine. *Dev Dyn* 1994;201:71-85.

Simon-Assmann P, Kedinger M. Heterotypic cellular cooperation in gut morphogenesis and differentiation. *Semin Cell Biol* 1993;4:221-30.

Simon-Assmann P, Lefebvre O, Bellissent-Waydelich A, Olsen J, Orian-Rousseau V, De Arcangelis A. The laminins: role in intestinal morphogenesis and differentiation. *Ann N Y Acad Sci* 1998;859:46-64.

Simoneau A, Herring-Gillam FE, Vachon PH, Perreault N, Basora N, Bouatrous Y, Pageot LP, Zhou J, Beaulieu JF. Identification, distribution, and tissular origin of the alpha5(IV) and alpha6(IV) collagen chains in the developing human intestine. *Dev Dyn* 1998;212:437-47.

Sinicrope FA, Ruan SB, Cleary KR, Stephens LC, Lee JJ, Levin B. bcl-2 and p53 oncoprotein expression during colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 1995;55:237-41.

Smith JW, Piotrowicz RS, Mathis D. A mechanism for divalent cation regulation of beta 3-integrins. *J Biol Chem* 1994;269:960-7.

Smith MW. Autoradiographic analysis of alanine uptake by newborn pig intestine. *Experientia* 1981;37:868-70.

Smith MW, James PS. Absorption of methionine by foetal and neonatal lamb colon. *J Agri Sci* 1979:39-43.

Smyth N, Vatansever HS, Murray P, Meyer M, Frie C, Paulsson M, Edgar D. Absence of basement membranes after targeting the LAMC1 gene results in embryonic lethality due to failure of endoderm differentiation. *J Cell Biol* 1999;144:151-60.

Sonoda Y, Watanabe S, Matsumoto Y, Aizu-Yokota E, Kasahara T. FAK is the upstream signal protein of the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt survival pathway in hydrogen peroxide-induced apoptosis of a human glioblastoma cell line. *J Biol Chem* 1999;274:10566-70.

BIBLIOGRAFÍA

Sonoyama K, Pholnukulkit P, Toyoda M, Rutatip S, Kasai T. Upregulation of activin A gene by butyrate in human colon cancer cell lines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284:G989-95.

Sonoyama K, Rutatip S, Kasai T. Gene expression of activin, activin receptors, and follistatin in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;278:G89-97.

Sordat I, Bosman FT, Dorta G, Rousselle P, Aberdam D, Blum AL, Sordat B. Differential expression of laminin-5 subunits and integrin receptors in human colorectal neoplasia. *J Pathol* 1998;185:44-52.

Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995;267:1445-9.

Sterling KM, Jr., Cutroneo KR. Differentiation-dependent induction of CYP1A1 in cultured rat small intestinal epithelial cells, colonocytes, and human colon carcinoma cells: basement membrane-mediated apoptosis. *J Cell Biochem* 2002;86:440-50.

Stevens C, Walz G, Singaram C, Lipman ML, Zanker B, Muggia A, Antonioli D, Peppercorn MA, Strom TB. Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6 expression in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1992;37:818-26.

Storz G. An expanding universe of noncoding RNAs. *Science* 2002;296:1260-3.

Strausberg RL, Feingold EA, Grouse LH, Derge JG, Klausner RD, Collins FS, Wagner L, Shenmen CM, Schuler GD, Altschul SF, Zeeberg B, Buetow KH, Schaefer CF, Bhat NK, Hopkins RF, Jordan H, Moore T, Max SI, Wang J, Hsieh F, Diatchenko L, Marusina K, Farmer AA, Rubin GM, Hong L, Stapleton M, Soares MB, Bonaldo MF, Casavant TL, Scheetz TE, Brownstein MJ, Usdin TB, Toshiyuki S, Carninci P, Prange C, Raha SS, Loquellano NA, Peters GJ, Abramson RD, Mullahy SJ, Bosak SA, McEwan PJ, McKernan KJ, Malek JA, Gunaratne PH, Richards S, Worley KC, Hale S, Garcia AM, Gay LJ, Hulyk SW, Villalon DK, Muzny DM, Sodergren EJ, Lu X, Gibbs RA, Fahey J, Helton E, Kettman M, Madan A, Rodrigues S, Sanchez A, Whiting M, Madan A, Young AC, Shevchenko Y, Bouffard GG, Blakesley RW, Touchman JW, Green ED, Dickson MC, Rodriguez AC, Grimwood J, Schmutz J, Myers RM, Butterfield YS, Krzywinski MI, Skalska U, Smailus DE, Schnerch A, Schein JE, Jones SJ, Marra MA. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:16899-903.

Subramanian V, Meyer B, Evans GS. The murine Cdx1 gene product localises to the proliferative compartment in the developing and regenerating intestinal epithelium. *Differentiation* 1998;64:11-8.

Suh E, Chen L, Taylor J, Traber PG. A homeodomain protein related to caudal regulates intestine-specific gene transcription. *Mol Cell Biol* 1994;14:7340-51.

Suh E, Traber PG. An intestine-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation. *Mol Cell Biol* 1996;16:619-25.

Sukumar P, Loo A, Adolphe R, Nandi J, Oler A, Levine RA. Dietary nucleotides augment dextran sulfate sodium-induced distal colitis in rats. *J Nutr* 1999;129:1377-81.

BIBLIOGRAFÍA

Sun H, Lesche R, Li DM, Liliental J, Zhang H, Gao J, Gavrilova N, Mueller B, Liu X, Wu H. PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:6199-204.

Tabuchi Y, Arai Y, Kondo T, Takeguchi N, Asano S. Identification of genes responsive to sodium butyrate in colonic epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;293:1287-94.

Taylor JK, Levy T, Suh ER, Traber PG. Activation of enhancer elements by the homeobox gene Cdx2 is cell line specific. *Nucleic Acids Res* 1997;25:2293-300.

Teller IC, Beaulieu JF. Interactions between laminin and epithelial cells in intestinal health and disease. *Expert Rev Mol Med* 2001;2001:1-18.

Terranova VP, Liotta LA, Russo RG, Martin GR. Role of laminin in the attachment and metastasis of murine tumor cells. *Cancer Res* 1982;42:2265-9.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994;22:4673-80.

Thompson JF, van den Berg M, Stokkers PC. Developmental regulation of epidermal growth factor receptor kinase in rat intestine. *Gastroenterology* 1994;107:1278-87.

Tian B, Lessan K, Kahm J, Kleidon J, Henke C. beta 1 integrin regulates fibroblast viability during collagen matrix contraction through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/protein kinase B signaling pathway. *J Biol Chem* 2002;277:24667-75.

Timpl R, Brown JC. Supramolecular assembly of basement membranes. *Bioessays* 1996;18:123-32.

Timpl R, Rohde H, Robey PG, Rennard SI, Foidart JM, Martin GR. Laminin--a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem* 1979;254:9933-7.

Tolozá EM, Diamond J. Ontogenetic development of nutrient transporters in rat intestine. *Am J Physiol* 1992;263:G593-604.

Toyoda S, Lee PC, Lebenthal E. Interaction of epidermal growth factor with specific binding sites of enterocytes isolated from rat small intestine during development. *Biochim Biophys Acta* 1986;886:295-301.

Traber PG. Regulation of sucrase-isomaltase gene expression along the crypt-villus axis of rat small intestine. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;173:765-73.

Traber PG. Control of gene expression in intestinal epithelial cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1998;353:911-4.

Traber PG, Silberg DG. Intestine-specific gene transcription. *Annu Rev Physiol* 1996;58:275-97.

Traber PG, Yu L, Wu GD, Judge TA. Sucrase-isomaltase gene expression along crypt-villus axis of human small intestine is regulated at level of mRNA abundance. *Am J Physiol* 1992;262:G123-30.

Trahair J, Robinson P. The development of the ovine small intestine. *Anat Rec* 1986;214:294-303.

Trahair JF, Avila CG, Robinson PM. Growth of the fetal sheep small intestine. *Growth* 1986;50:201-16.

BIBLIOGRAFÍA

Trahair JF, Harding R, Bocking AD, Silver M, Robinson PM. The role of ingestion in the development of the small intestine in fetal sheep. *Q J Exp Physiol* 1986;71:99-104.

Trahair JF, Perry RA, Silver M, Robinson PM. Enterocyte migration in the foetal sheep small intestine. *Biol Neonate* 1986;50:214-20.

Trahair JF, Robinson PM. Perinatal development of the small intestine of the sheep. *Reprod Nutr Dev* 1986;26:1255-63.

Trezise AE, Romano PR, Gill DR, Hyde SC, Sepulveda FV, Buchwald M, Higgins CF. The multidrug resistance and cystic fibrosis genes have complementary patterns of epithelial expression. *Embo J* 1992;11:4291-303.

Trinh KY, Jin T, Drucker DJ. Identification of domains mediating transcriptional activation and cytoplasmic export in the caudal homeobox protein Cdx-3. *J Biol Chem* 1999;274:6011-9.

Troelsen JT, Mitchelmore C, Spodsberg N, Jensen AM, Noren O, Sjostrom H. Regulation of lactase-phlorizin hydrolase gene expression by the caudal-related homeodomain protein Cdx-2. *Biochem J* 1997;322 (Pt 3):833-8.

Tsuji S, Kawano S, Sawaoka H, Takei Y, Kobayashi I, Nagano K, Fusamoto H, Kamada T. Evidences for involvement of cyclooxygenase-2 in proliferation of two gastrointestinal cancer cell lines. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1996;55:179-83.

Turner CE, Burridge K. Transmembrane molecular assemblies in cell-extracellular matrix interactions. *Curr Opin Cell Biol* 1991;3:849-53.

Ueda K, Miyoshi Y, Tokino T, Watatani M, Nakamura Y. Induction of apoptosis in T98G glioblastoma cells by transfection of GML, a p53 target gene. *Oncol Res* 1999;11:125-32.

Uesaka T, Kageyama N. Cdx2 homeodomain protein regulates the expression of MOK, a member of the mitogen-activated protein kinase superfamily, in the intestinal epithelial cells. *FEBS Lett* 2004;573:147-54.

Vachon PH, Beaulieu JF. Transient mosaic patterns of morphological and functional differentiation in the Caco-2 cell line. *Gastroenterology* 1992;103:414-23.

Vachon PH, Beaulieu JF. Extracellular heterotrimeric laminin promotes differentiation in human enterocytes. *Am J Physiol* 1995;268:G857-67.

Vachon PH, Perreault N, Magny P, Beaulieu JF. Uncoordinated, transient mosaic patterns of intestinal hydrolase expression in differentiating human enterocytes. *J Cell Physiol* 1996;166:198-207.

Vachon PH, Simoneau A, Herring-Gillam FE, Beaulieu JF. Cellular fibronectin expression is down-regulated at the mRNA level in differentiating human intestinal epithelial cells. *Exp Cell Res* 1995;216:30-4.

Valizadeh A, Karayiannakis AJ, el-Hariry I, Kmiot W, Pignatelli M. Expression of E-cadherin-associated molecules (alpha-, beta-, and gamma-catenins and p120) in colorectal polyps. *Am J Pathol* 1997;150:1977-84.

Van Aelst L, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* 1997;11:2295-322.

Van Beers EH, Buller HA, Grand RJ, Einerdhand AW, Dekker J. Intestinal brush border glycohydrolases: structure, function, and development. *Crit Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1995:197-262.

BIBLIOGRAFÍA

van Wering HM, Huibregtse IL, van der Zwan SM, de Bie MS, Dowling LN, Boudreau F, Rings EH, Grand RJ, Krasinski SD. Physical interaction between GATA-5 and hepatocyte nuclear factor-1alpha results in synergistic activation of the human lactase-phlorizin hydrolase promoter. *J Biol Chem* 2002;277:27659-67.

Vandeput F, Zabeau M, Maenhaut C. Identification of differentially expressed genes in thyrotropin stimulated dog thyroid cells by the cDNA-AFLP technique. *Mol Cell Endocrinol* 2005;243:58-65.

Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998;38:97-120.

Vega YM, Puchal AA, Buddington RK. Intestinal amino acid and monosaccharide transport in suckling pigs fed milk replacers with different sources of carbohydrate. *J Nutr* 1992;122:2430-9.

Velazquez OC, Lederer HM, Rombeau JL. Butyrate and the colonocyte. Implications for neoplasia. *Dig Dis Sci* 1996;41:727-39.

Velcich A, Palumbo L, Jarry A, Laboisse C, Racevskis J, Augenlicht L. Patterns of expression of lineage-specific markers during the in vitro-induced differentiation of HT29 colon carcinoma cells. *Cell Growth Differ* 1995;6:749-57.

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995;184:39-51.

Vetter IR, Wittinghofer A. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 2001;294:1299-304.

Vider BZ, Zimmer A, Chastre E, Prevot S, Gespach C, Estlein D, Wolloch Y, Tronick SR, Gazit A, Yaniv A. Evidence for the involvement of the Wnt 2 gene in human colorectal cancer. *Oncogene* 1996;12:153-8.

Vieites JM, Sánchez-Pozo A, Gil A, Suárez A. Desarrollo de un protocolo de análisis de la expresión génica mediante "differential display" que reduce el número de falsos positivos. *Ars Pharmaceutica* 2005;46:193-204.

Villalonga P, Guasch RM, Riento K, Ridley AJ. RhoE inhibits cell cycle progression and Ras-induced transformation. *Mol Cell Biol* 2004;24:7829-40.

Vreugdenhil AC, Dentener MA, Snoek AM, Greve JW, Buurman WA. Lipopolysaccharide binding protein and serum amyloid A secretion by human intestinal epithelial cells during the acute phase response. *J Immunol* 1999;163:2792-8.

Wang CY, Eshleman JR, Willson JK, Markowitz S. Both transforming growth factor-beta and substrate release are inducers of apoptosis in a human colon adenoma cell line. *Cancer Res* 1995;55:5101-5.

Wang LH. Molecular signaling regulating anchorage-independent growth of cancer cells. *Mt Sinai J Med* 2004;71:361-7.

Wang TH, Wang HS, Ichijo H, Giannakakou P, Foster JS, Fojo T, Wimalasena J. Microtubule-interfering agents activate c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase through both Ras and apoptosis signal-regulating kinase pathways. *J Biol Chem* 1998;273:4928-36.

Wang Y, Harvey C, Rousset M, Swallow DM. Expression of human intestinal mRNA transcripts during development: analysis by a semiquantitative RNA polymerase chain reaction method. *Pediatr Res* 1994;36:514-21.

BIBLIOGRAFÍA

Watanabe S, Matsushita K, Stokes JB, McCray PB, Jr. Developmental regulation of epithelial sodium channel subunit mRNA expression in rat colon and lung. *Am J Physiol* 1998;275:G1227-35.

Watkins PB. The barrier function of CYP3A4 and P-glycoprotein in the small bowel. *Adv Drug Deliv Rev* 1997;27:161-170.

Weaver LT, Carrick BM. Changes in upper intestinal epithelial morphology and kinetics in the growing guinea pig. *Pediatr Res* 1989;26:31-3.

Weiner TM, Liu ET, Craven RJ, Cance WG. Expression of focal adhesion kinase gene and invasive cancer. *Lancet* 1993;342:1024-5.

Weintraub H, Groudine M. Chromosomal subunits in active genes have an altered conformation. *Science* 1976;193:848-56.

Wennerberg K, Forget MA, Ellerbroek SM, Arthur WT, Burridge K, Settleman J, Der CJ, Hansen SH. Rnd proteins function as RhoA antagonists by activating p190 RhoGAP. *Curr Biol* 2003;13:1106-15.

Werner T. Identification and functional modelling of DNA sequence elements of transcription. *Brief Bioinform* 2000;1:372-80.

Whitehead RH, Demmler K, Rockman SP, Watson NK. Clonogenic growth of epithelial cells from normal colonic mucosa from both mice and humans. *Gastroenterology* 1999;117:858-65.

Whitehead RH, Jones JK, Gabriel A, Lukies RE. A new colon carcinoma cell line (LIM1863) that grows as organoids with spontaneous differentiation into crypt-like structures in vitro. *Cancer Res* 1987;47:2683-9.

Whitehead RH, Watson NK. Gastrointestinal cell lines as a model for differentiation. Halter F, Winton D, Wright NA, editors. The gut as a model in cell and molecular biology 1997:275-290.

Williams CS, Mann M, DuBois RN. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene* 1999;18:7908-16.

Williams MJ, Hughes PE, O'Toole TE, Ginsberg MH. The inner world of cell adhesion: integrin cytoplasmic domains. *Trends Cell Biol* 1994;4:109-12.

Wolin MJ. Control of short chain volatile acid production in the colon. Short-chain Fatty Acids (Cummings, J., Binder, H. J. & Soergel, K., eds.) 1994:3-10.

Wolpert S, Wong ML, Bass BL. Matrix alters the proliferative response of enterocytes to growth factors. *Am J Surg* 1996;171:109-12.

Woodman AC, Sugiyama M, Yoshida K, Sugino T, Borgya A, Goodison S, Matsumura Y, Tarin D. Analysis of anomalous CD44 gene expression in human breast, bladder, and colon cancer and correlation of observed mRNA and protein isoforms. *Am J Pathol* 1996;149:1519-30.

Wunnenberg-Stapleton K, Blitz IL, Hashimoto C, Cho KW. Involvement of the small GTPases XRhoA and XRnd1 in cell adhesion and head formation in early *Xenopus* development. *Development* 1999;126:5339-51.

Xia H, Nho RS, Kahm J, Kleidon J, Henke CA. Focal adhesion kinase is upstream of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt in regulating fibroblast survival in response to contraction of type I collagen matrices via a beta 1 integrin viability signaling pathway. *J Biol Chem* 2004;279:33024-34.

BIBLIOGRAFÍA

Xu H, Bai L, Collins JF, Ghishan FK. Molecular cloning, functional characterization, tissue distribution, and chromosomal localization of a human, small intestinal sodium-phosphate (Na⁺-Pi) transporter (SLC34A2). *Genomics* 1999;62:281-4.

Xu H, Collins JF, Bai L, Kiela PR, Lynch RM, Ghishan FK. Epidermal growth factor regulation of rat NHE2 gene expression. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;281:C504-13.

Xu L, Rahimpour R, Ran L, Kong C, Biragyn A, Andrews J, Devries M, Wang JM, Kelvin DJ. Regulation of CCR2 chemokine receptor mRNA stability. *J Leukoc Biol* 1997;62:653-60.

Yamada KM, Miyamoto S. Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:681-9.

Yamashita S, Konishi K, Yamazaki Y, Taki Y, Sakane T, Sezaki H, Furuyama Y. New and better protocols for a short-term Caco-2 cell culture system. *J Pharm Sci* 2002;91:669-79.

Yeh KY, Yeh M, Montgomery RK, Grand RJ, Holt PR. Cortisone and thyroxine modulate intestinal lactase and sucrase mRNA levels and activities in the suckling rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;180:174-80.

Yurchenco PD, Cheng YS. Self-assembly and calcium-binding sites in laminin. A three-arm interaction model. *J Biol Chem* 1993;268:17286-99.

Zaret K. Developmental competence of the gut endoderm: genetic potentiation by GATA and HNF3/fork head proteins. *Dev Biol* 1999;209:1-10.

Zemanova Z, Pacha J. Localization of Na,K-ATPase activity in developing rat distal colon: role of corticosteroids. *Mech Ageing Dev* 1998;101:129-43.

Zemelman BV, Walker WA, Chu SH. Expression and developmental regulation of Na⁺,K⁺ adenosine triphosphatase in the rat small intestine. *J Clin Invest* 1992;90:1016-22.

Zhang X, Cromwell JW, Kunjummen BD, Yee D, Garcia-Aguilar J. The alpha2 and alpha3 integrins are required for morphologic differentiation of an intestinal epithelial cell line. *Surgery* 2003;133:429-37.

Zhang Z, Vuori K, Wang H, Reed JC, Ruoslahti E. Integrin activation by R-ras. *Cell* 1996;85:61-9.

Zhao H, Richards-Smith B, Baer AN, Green FA. Lipoxygenase mRNA in cultured human epidermal and oral keratinocytes. *J Lipid Res* 1995;36:2444-9.

Zheng P, Niu FL, Liu WZ, Shi Y, Lu LG. Anti-inflammatory mechanism of oxymatrine in dextran sulfate sodium-induced colitis of rats. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4912-4915

Zhou J, Wu K, Fernandes CL, Cheng AL, Finch PW. Keratinocyte growth factor down-regulates expression of the sucrase-isomaltase gene in Caco-2 intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 1998;273:33367-73.

Zweibaum A, Chantret I. Human colon carcinoma cell lines as in vitro models for the study of intestinal cell differentiation. Smith MW, Sepulveda FV, editors. *Adaptation and development of gastrointestinal functions* 1989:103-112.

Zweibaum A, Hauri HP, Sterchi E, Chantret I, Haffen K, Bamat J, Sordat B. Immunohistological evidence, obtained with monoclonal antibodies, of small intestinal brush border hydrolases in human colon cancers and foetal colons. *Int J Cancer* 1984;34:591-8.

BIBLIOGRAFÍA

Zweibaum A, Pinto M, Chevalier G, Dussaulx E, Triadou N, Lacroix B, Haffen K, Brun JL, Rousset M. Enterocytic differentiation of a subpopulation of the human colon tumor cell line HT-29 selected for growth in sugar-free medium and its inhibition by glucose. *J Cell Physiol* 1985;122:21-9.

Anexo: Lista completa de los motivos de unión previstos en la secuencia del promotor predicha por la Suite Genomatix, obtenida al usar el programa MatInspector.

Motivo de unión	Posición	Sentido	Similitud	Secuencia
B-cell-specific activating protein	8 - 36	(-)	0.857	gcctggGTCAcggtagtagactggc ttct
PAX5 paired domain protein	9 - 37	(-)	0.947	tgctgggTCACggtagtagactgg cttc
Bach2 bound TRE	18 - 42	(-)	0.813	aggcttgccTGGGtcacggtagtag
Progesterone receptor binding site	31 - 49	(+)	1.000	ccaggcaagccTGTTcttg
Glucocorticoid receptor, C2C2 zinc finger protein binds glucocorticoid dependent to GREs	31 - 49	(+)	1.000	ccaggcaagcctGTTCTtg
Androgene receptor binding site	31 - 49	(+)	1.000	ccaggcaagccTGTTcttg
Basonuclin, cooperates with USF1 in rDNA PolII transcription)	32 - 50	(+)	0.842	caggcaagccTGTTcttg
Thing1/E47 heterodimer, TH1 bHLH member specific expression in a variety of embryonic tissues	47 - 63	(-)	1.000	ctttattCCAGatgcaa
POU factor Brn-2 (N-Oct 3)	48 - 64	(+)	0.853	tgcattctgGAATAaaga
Mammalian C-type LTR CCAAT box	55 - 79	(-)	1.000	aCCAAtagatcagcctctttatcc
Transcriptional repressor CDP	64 - 80	(+)	0.806	aggctgATCTattggtc
Clox	64 - 80	(+)	0.806	aggctgATCTattggtc
cut-like homeodomain protein	65 - 81	(-)	1.000	ggaccaataGATCagcc
Homeobox protein MEIS1 binding site	67 - 79	(+)	1.000	cTGATctattggt
Nuclear factor Y (Y-box binding factor)	68 - 82	(-)	1.000	tggaCCAAtagatca

ANEXO

Farnesoid X - activated receptor (RXR/FXR dimer)	76 - 92	(+)	0.777	tggccaTGGCctatgt
Pancreatic and intestinal lim-homeodomain factor	99 - 119	(-)	1.000	tttttttTAATggtttga
Myocyte enhancer factor	101 - 123	(+)	1.000	caaaccatTAAAAAAAAAAaatag
Runt-related transcription factor 2 / CBFA1 (core-binding factor, runt domain, alpha subunit 1)	119 - 133	(-)	1.000	ttgaGTGGttctatt
Nuclear factor Y (Y-box binding factor)	122 - 136	(+)	0.750	agaaCCACtcaacta
Cellular and viral CCAAT box	122 - 132	(+)	0.826	agaaCCACtca
Homeodomain protein NKX3.2 (BAPX1, NKX3B, Bagpipe homolog)	123 - 135	(-)	1.000	agttgAGTGgttc
Elk-1	149 - 165	(-)	1.000	aacataGGAAGcaaatc
Homeobox protein MEIS1 binding site	161 - 173	(+)	0.750	aTGTTttatcact
GATA-binding factor 3	162 - 174	(-)	1.000	cagtGATAaaaca
GATA-binding factor 2	162 - 174	(-)	1.000	cagtGATAaaaca
GATA-binding factor 2	162 - 174	(-)	1.000	cagtGATAaaaca
GATA-binding factor 1	162 - 174	(-)	1.000	cagtGATAaaaca
GATA-binding factor 1	162 - 174	(-)	1.000	cagtGATAaaaca
GATA binding factor	162 - 174	(-)	1.000	cagtGATAaaaca
Brachyury	174 - 198	(+)	0.750	gtccttaacttGGGTgggaaatgt
Mammalian transcriptional repressor RBP-Jkappa/CBF1	185 - 199	(+)	1.000	tgggTGGGaaatgtt
Mammalian transcriptional repressor RBP-Jkappa/CBF1	185 - 199	(+)	1.000	tgggTGGGaaatgtt
Interferon regulatory factor 7 (IRF-7)	192 - 210	(-)	1.000	atGAAAacaaaaacatttc
Multifunctional c-Abl src type tyrosine kinase	197 - 207	(-)	1.000	aaAACAAAAaac
Fkh-domain factor FKHL1 (FOXO)	197 - 213	(-)	1.000	tttatgaaAACAAAAaac

Fork head related activator-2 (FOXF2)	197 - 213	(-)	0.750	tttatgAAAACaaaaaac
Xenopus fork head domain factor 3 (FoxA2a)	197 - 213	(-)	1.000	tttatgaaAACAAAAaac
Fork head related activator-4 (FOXD1)	197 - 213	(-)	1.000	tttatgaaAACAAAAaac
Octamer-binding factor 1	199 - 213	(-)	0.771	tttATGAAAacaaaa
Octamer binding site (OCT1/OCT2)	199 - 213	(-)	0.849	tttATGAAAacaaaa
Octamer-binding factor 1	199 - 213	(-)	1.000	ttTATGAAAacaaaa
Pituitary Homeobox 1 (Ptx1, Pitx-1)	228 - 244	(-)	0.878	taggggcTTATctgtag
GATA-binding factor 1	229 - 241	(+)	1.000	tacaGATAagccc
complex of Lmo2 bound to Tal-1, E2A proteins, and GATA-1, half-site 2	229 - 241	(+)	1.000	tacaGATAagccc
GATA-binding factor 2	229 - 241	(+)	1.000	tacaGATAagccc
GATA-binding factor 1	229 - 241	(+)	1.000	tacaGATAagccc
GATA-binding factor 3	229 - 241	(+)	1.000	tacaGATAagccc
GATA-binding factor 1	229 - 241	(+)	1.000	tacaGATAagccc
GATA binding factor	229 - 241	(+)	1.000	tacaGATAagccc
GATA-binding factor 1	229 - 241	(+)	1.000	tacaGATAagccc
Special AT-rich sequence-binding protein 1, predominantly expressed in thymocytes, binds to matrix attachment regions (MARs)	240 - 256	(-)	1.000	aatatagttAATaggg
Promyelocytic leukemia zink finger (TF with nine Krueppel-like zink fingers)	243 - 257	(-)	0.833	aaaTATAgtttaata
Myocyte enhancer factor	244 - 266	(-)	1.000	aatcccttTAAAtatagttaat
MEF2	246 - 268	(-)	1.000	acaatcccttTAAAtatagtta
Homeobox protein engrailed (en-1)	249 - 265	(+)	1.000	actataTTTAaagggat

ANEXO

Cell cycle gene homology region (CDE/CHR tandem elements regulate cell cycle dependent repression)	267 - 279	(-)	1.000	tgatTTGAactac
Growth factor independence 1 zinc finger protein Gfi-1B	272 - 286	(+)	1.000	tcaAATCagtatgca
Octamer-binding factor 1, POU-specific domain	276 - 288	(+)	1.000	atcagtATGCaca
Octamer-binding factor 1	279 - 293	(+)	1.000	agTATGcacagatac
GATA-binding factor 2	285 - 297	(+)	1.000	cacaGATAccagt
Muscle-specific Mt binding site	287 - 295	(-)	0.884	tggATCTg
Mammalian transcriptional repressor RBP-Jkappa/CBF1	293 - 307	(-)	1.000	aaggTGGGaaactgg
Mammalian transcriptional repressor RBP-Jkappa/CBF1	293 - 307	(-)	1.000	aaggTGGGaaactgg
Se-Cys tRNA gene transcription activating factor	296 - 318	(+)	1.000	gtttCCCAccttgcctgtggac
Se-Cys tRNA gene transcription activating factor	296 - 318	(+)	1.000	gtttCCCAccttgcctgtggac
Epstein-Barr virus transcription factor R	300 - 320	(-)	1.000	aagtccacagggcaaGGTGgg
Tumor suppressor p53 (3' half site)	314 - 334	(-)	0.921	gatgctttgctgaCAAGtcca
Ribonucleoprotein associated zinc finger protein MOK-2 (human)	348 - 368	(+)	1.000	tgttgctaaagagCCTTggtc
cut-like homeodomain protein	367 - 383	(+)	1.000	tctaaaataGATCccga
Rat C2H2 Zn finger protein involved in olfactory neuronal differentiation	386 - 402	(+)	1.000	ggGCACcctagaggcg

Rat C2H2 Zn finger protein involved in olfactory neuronal differentiation	387 - 403	(-)	0.750	gcGCCcTctagggtgcc
Erythroid krueppel like factor (EKLF)	388 - 400	(-)	1.000	ccctctaGGGTgc
Drosophila hairy and enhancer of split homologue 1 (HES-1)	396 - 410	(-)	0.944	aagcagtGCGCctc
Fork head related activator-4 (FOXD1)	401 - 417	(-)	0.750	aaaatgtaAGCAgtgcg
Interferon regulatory factor 3 (IRF-3)	402 - 420	(-)	0.758	ccgaaaatGTAAgcagtgc
PAR-type chicken vitellogenin promoter-binding protein	408 - 418	(+)	1.000	cTTACattttc
Octamer-binding factor 1	419 - 433	(+)	1.000	ggcATGCaacgccaa
Zinc finger / POZ domain transcription factor	433 - 443	(-)	1.000	gcgaGCGCtgt
Muscle Initiator Sequence	447 - 465	(+)	1.000	caggctCCATaaaagggga
Serum responsive factor	448 - 466	(-)	1.000	ctccccttttATGGagcct
Zinc finger with interaction domain	448 - 460	(+)	1.000	agGCTCcataaaa
Serum response factor	449 - 467	(+)	1.000	ggctCCATaaaaggggagg
Serum responsive factor	449 - 467	(+)	0.847	ggctccataaAAGGggagg
Mammalian C-type LTR TATA box	451 - 467	(+)	1.000	ctccaTAAAaggggagg
cellular and viral TATA box elements	451 - 467	(+)	1.000	ctccaTAAAaggggagg
cellular and viral TATA box elements	520 - 536	(+)	1.000	gcgtaTAAAgccgcgca
Muscle TATA box	520 - 536	(+)	1.000	gcgtaTAAAgccgcgca
Cell cycle-dependent element, CDF-1 binding site (CDE/CHR tandem elements regulate cell cycle dependent repression)	526 - 538	(-)	1.000	tctgCGCGgcttt

ANEXO

E2F, involved in cell cycle regulation, interacts with Rb p107 protein	538 - 552	(+)	1.000	agagcgtGAAAcAAA
E2F, involved in cell cycle regulation, interacts with Rb p107 protein	538 - 552	(+)	0.774	agagCGTGaaacAAA
TCF/LEF-1, involved in the Wnt signal transduction pathway	542 - 558	(+)	1.000	cgtgaaaCAAAGcagtc
Barbiturate-inducible element	546 - 560	(+)	1.000	aaacAAAGcagtcgg
POU-factor Tst-1/Oct-6	562 - 576	(+)	1.000	tcggAATTggacttg
Myc associated zinc finger protein (MAZ)	574 - 586	(+)	1.000	ttggGAGGcgcgg
Cell cycle-dependent element, CDF-1 binding site (CDE/CHR tandem elements regulate cell cycle dependent repression)	578 - 590	(+)	1.000	gaggCGCGgtgag
BTB/POZ-bZIP transcription factor BACH1 forms heterodimers with the small Maf protein family	581 - 605	(+)	0.750	gcgcggtgaGGAGtcaggcttaaaa
Pax-6 paired domain binding site	588 - 606	(-)	0.773	gttttAAGCctgactcctc
MyT1 zinc finger transcription factor involved in primary neurogenesis	599 - 611	(-)	1.000	aacAAGTttaaag
Myc associated zinc finger protein (MAZ)	609 - 621	(+)	1.000	gttgGAGGggagt
Myeloid zinc finger protein MZF1	613 - 619	(+)	1.000	gaGGGGa
NF-kappaB	614 - 628	(+)	1.000	agGGGAgtaaccagc
NF-kappaB	614 - 628	(+)	1.000	agGGGAgtaaccagc
GAGA-Box	625 - 649	(-)	1.000	ggaggAGAGcagagaggagcagcgtg
Myc associated zinc finger protein (MAZ)	640 - 652	(-)	1.000	cgagGAGGagagc

Cell cycle-dependent element, CDF-1 binding site (CDE/CHR tandem elements regulate cell cycle dependent repression)	656 - 668	(+)	1.000	gcgcCGCGttca
--	-----------	-----	-------	--------------