

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

*“Acción de los nucleósidos exógenos sobre células epiteliales
intestinales IEC-6”*

Memoria presentada por D. Fernando Rodríguez Serrano para optar al grado de
Doctor Europeo en ciencias Biológicas

Granada, 10 de Mayo de 2005

D. ANTONIO RÍOS GUADIX CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

HACE CONSTAR:

Que D. Fernando Rodríguez Serrano ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral:” *Acción de los nucleósidos exógenos sobre células epiteliales intestinales IEC-6* ” durante los años 2000-2005 y corresponde fielmente a los resultados obtenidos.

Una vez redactada la presente memoria, ha sido revisada por mí y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor Europeo ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 10 de Mayo de 2005.

Fdo. Antonio Ríos Guadix

Dña. ANTONIA ARÁNEGA JIMÉNEZ, CATEDRÁTICA DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y EMBRIOLOGÍA HUMANA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

HACE CONSTAR:

Que D. Fernando Rodríguez Serrano ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral: ” *Acción de los nucleósidos exógenos sobre células epiteliales intestinales IEC-6* ” durante los años 2000-2005 y corresponde fielmente a los resultados obtenidos.

Una vez redactada la presente memoria, ha sido revisada por mí y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor Europeo ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 10 de Mayo de 2005.

Fdo. Antonia Aránega Jiménez

D. JUAN ANTONIO MARCHAL CORRALES, PROFESOR TITULAR
DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD DE
JAÉN.

HACE CONSTAR:

Que D. Fernando Rodríguez Serrano ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral:” *Acción de los nucleósidos exógenos sobre células epiteliales intestinales IEC-6* ” durante los años 2000-2005 y corresponde fielmente a los resultados obtenidos.

Una vez redactada la presente memoria, ha sido revisada por mí y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor Europeo ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 10 de Mayo de 2005.

Fdo. Juan Antonio Marchal Corrales

A loli

A todos mis familiares y
amigos

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos:

A mis directores Prof. Dña Antonia Aránega Jiménez, Prof. D. Antonio Ríos Guadix y Prof. D. Juan Antonio Marchal Corrales, por haberme permitido conocer el interesante mundo de la investigación científica.

Al Prof. D. Luis Álvarez, quien con su amabilidad y disponibilidad se hace indispensable en cada día de trabajo.

El desarrollo de una tesis doctoral es un camino largo en el que aunque sea por poco tiempo intervienen muchas personas. Quiero agradecer a Maribel Torres e Isabel Fernández la ayuda prestada principalmente cuando comencé a trabajar en el tema de la tesis, ya que en los primeros pasos suelen encontrarse más dificultades.

A mis compañeros Mohamed Tassi, Jose Ignacio Llorente, Octavio Caba, Antonio Martínez, Houria Boulaiz, Inés Suárez, Jose Carlos Prados, Esmeralda Carrillo, Celia Velez, Consolación Melguizo y Juan Emilio Fernández, agradecerles su amistad, y por compartir con agrado, cada día de trabajo.

A todos los miembros del departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad de Jaén, departamento de Biología Celular, y Anatomía y Embriología Humana de la Universidad de Granada

A todos los miembros del centro de Instrumentación Científica, por su asistencia continuada.

“Siempre que enseñes, enseña a la vez
a dudar de los que enseñas”

José Ortega y Gasset

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. INTESTINO DELGADO.....	2
1.1. Introducción.....	2
1.2. Estructura Anatómica e Histológica del Intestino Delgado.....	3
1.3. Renovación celular en el epitelio del intestino delgado.....	6
1.4. Diferenciación enterocítica. Caracterización molecular y ultraestructural.....	11
1.5. Modelos experimentales para el estudio del epitelio intestinal Líneas celulares intestinales.....	16
2. NUCLEÓTIDOS.....	18
2.1. Bioquímica y metabolismo de los nucleótidos.....	18
2.1.1 Estructura química y nomenclatura.....	18
2.1.2. Funciones metabólicas.....	20
2.1.3. Metabolismo de los nucleótidos.....	22
2.1.3.a) Biosíntesis de nucleótidos: de novo y ruta de recuperación.....	22
2.1.3.b) Metabolismo de las purinas.....	24
2.1.3.c) Metabolismo de las pirimidinas.....	25
2.1.4. Alteraciones del metabolismo de los nucleótidos.....	26
2.1.5. Antimetabolitos.....	27
2.2. Los alimentos como fuente de nucleótidos.....	28
2.3. Digestión y absorción de los nucleótidos.....	29
2.4. Efectos de los nucleótidos a nivel gastrointestinal.....	31
2.4.1. Efectos sobre el desarrollo y funcionalidad gastrointestinal.....	31
2.4.2. Efectos sobre la recuperación intestinal ante situaciones fisiopatológicas.....	33
2.4.3. Efectos sobre la flora intestinal.....	34
2.5. Efectos hepáticos.....	34
2.6. Efectos sobre el sistema inmune.....	36
2.7. Otros efectos.....	37
3. CICLO CELULAR.....	37
4. APOPTOSIS.....	39

5. 5-FLUOROURACILO.....	41
OBJETIVOS.....	42
MATERIAL Y MÉTODOS.....	44
1. CONDICIONES DE CULTIVO.....	45
1.1. Línea celular.....	45
1.2. Mantenimiento del cultivo.....	45
1.3 .Método de congelación celular.....	46
1.4. Método de descongelación celular.....	47
2.- NUCLEÓSIDOS.....	47
3.- CONDICIONES EXPERIMENTALES.....	50
4. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN.....	51
4.1. Curva de crecimiento.....	51
4.2. Determinación del número de células mediante cámara de Neubauer.....	53
5. ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DEL CICLO CELULAR.....	54
5.1. Fijación de las células.....	54
5.2. Tinción de las células.....	55
6. ENSAYO DE VIABILIDAD, NECROSIS Y APOPTOSIS.....	55
7. ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LAS CÉLULAS.....	57
7.1. Microscopía óptica.....	57
7.2. Microscopía electrónica.....	57
7.2.1. Fijación de las células.....	57
7.2.2. Inclusión de las muestras.....	58
7.2.3. Método de contraste.....	59
8. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA PARA CITOMETRÍA DE FLUJO.....	61
9. PROCESAMIENTO DE LOS CULTIVOS PARA ELECTROFORESIS EN SDS-PAGE Y WESTERN-BLOT.....	63
9.1. Fraccionamiento celular.....	63
9.2. Cuantificación proteica.....	64
9.3. SDS-PAGE.....	64
9.4. Western-blot.....	65
9.5. Inmunodetección de proteínas.....	66
9.6. Cuantificación de las bandas de proteína.....	67

10. ENSAYOS CON TRITIO.....	67
10.1. Nucleósidos tritiados y condiciones de cultivo.....	67
10.2. Determinación de la incorporación intracelular por contador de centelleo líquido.....	69
10.3. Autorradiografía para microscopía electrónica.....	70
11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LOS DATOS.....	75
RESULTADOS.....	77
1.- ENSAYOS A BAJA DENSIDAD CELULAR.....	78
1.1. Ensayos de proliferación.....	78
1.1.1. Curva de crecimiento.....	78
1.1.2. Determinación del número de células y de la viabilidad celular mediante cámara de Neubauer.....	80
1.1.3. Efecto de la concentración de los medios de cultivo experimentales sobre la proliferación.....	82
1.2. Análisis de la distribución del ciclo celular.....	85
1.3. Ensayo de viabilidad, necrosis y apoptosis.....	87
1.4. Estudio morfológico de las células.....	89
1.4.1. Microscopía óptica.....	89
1.4.2. Microscopía electrónica.....	91
1.5. Estudio de marcadores de diferenciación celular por Inmunofluorescencia indirecta en citometría de flujo.....	96
1.6. Contenido proteico total de los cultivos.....	98
2. ENSAYOS A ALTA DENSIDAD CELULAR.....	99
2.1 Estudio morfológico de las células a microscopía óptica.....	99
2.2 Determinación de los marcadores de diferenciación celular por inmunofluorescencia indirecta.....	102
2.3. Contenido proteico total de los cultivos.....	104
2.4. Estudio de marcadores de diferenciación mediante Western-Blot.....	105
3. ENSAYOS DE RECUPERACIÓN FRENTE AL TRATAMIENTO CON 5-FLUOROURACILO.....	106
3.1. Curva de crecimiento.....	106
3.2. Determinación del número de células mediante cámara de Neubauer....	109

3.3. Estudio morfológico de las células a microscopía óptica.....	111
3.3. Análisis de la distribución del ciclo celular.....	113
3.4. Ensayo de viabilidad, necrosis y apoptosis.....	116
4. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE DIFERENTES CONDICIONES EXPERIMENTALES.....	120
4.1 Efecto de la densidad celular y los medios de cultivo experimentales sobre el grado de diferenciación.....	120
4.1.1. Porcentaje de proteína total.....	120
4.1.2. Marcadores de diferenciación por citometría de flujo.....	121
4.2. Efectos del 5-Fluorouracilo y de los nucleósidos exógenos.....	125
4.2.1. Efectos del 5-Fluorouracilo y de los nucleósidos sobre la proliferación celular.....	125
4.2.2. Efectos del 5-Fluorouracilo y de los nucleósidos sobre el ciclo celular.....	127
4.2.3. Efectos del 5-Fluorouracilo y los nucleósidos sobre las tasas de viabilidad, necrosis y apoptosis.....	129
5. ANÁLISIS DE LA INCORPORACIÓN INTRACELULAR DE NUCLEÓSIDOS TRITIADOS.....	132
5.1. Determinación de la incorporación intracelular por contador de centelleo líquido.....	132
5.2. Autorradiografía para microscopía electrónica de transmisión.....	134
5.2.1. Relación entre tamaño del núcleo y citoplasma.....	134
5.2.2. Análisis de las marcas radioactivas.....	137
5.2.3. Análisis de la ruta intracelular de incorporación de los nucleósidos tritiados.....	140
DISCUSIÓN	143
Condiciones de baja densidad celular.....	144
Ensayos a alta densidad celular.....	151
Recuperación con 5-Fluorouracilo.....	154
Análisis de la incorporación de nucleósidos marcados.....	158
CONCLUSIONES	162
BIBLIOGRAFÍA	165

INTRODUCCIÓN

1. INTESTINO DELGADO

1.1. Introducción

La nutrición puede ser definida como el conjunto de actividades a través de las cuales un organismo incorpora en sus estructuras, elementos del medio en el que vive. Para que esto sea posible se requiere la digestión de los alimentos, es decir, que se transformen en moléculas sencillas capaces de atravesar las barreras celulares. El aparato digestivo es el encargado de la degradación física y química de los alimentos para posteriormente realizar la absorción de los productos de dicha degradación.

El aparato digestivo consta por un lado de tubo digestivo que comprende: Boca, faringe, esófago, estómago, intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon) e intestino grueso (ciego, colon, recto y conducto anal). Por otro lado, aparecen una serie de estructuras anexas: lengua, dientes, glándulas salivales, páncreas, hígado y vesícula biliar.

Las diferentes regiones están especializadas morfológica y funcionalmente. En la cavidad oral se tritura, macera y constituye el bolo alimenticio que pasa rápidamente por la faringe y esófago hasta desembocar en el estómago. Desde aquí el paso del contenido alimenticio a lo largo del resto del tubo digestivo es más lento y es donde se continúa con la digestión iniciada en la cavidad oral y se produce la absorción, principalmente a través de la pared del intestino delgado. Los restos de alimento no digeridos, junto a moco, bacterias, células exfoliadas y pigmentos biliares, son eliminados como materia fecal.

Además de la función digestiva, la pared gastrointestinal constituye una barrera crucial entre el medio externo e interno, separando este último de un amplio espectro de sustancias nocivas e inmunogénicas presentes en la luz del tubo. Así, en el curso de muchas enfermedades se observa daño y deterioro de

dicha barrera, que posibilita la entrada y absorción de componentes que crean un desequilibrio en la homeostasis del individuo (Dignass, 2001).

1.2. Estructura Anatómica e Histológica del Intestino Delgado.

Es el componente más largo del tubo digestivo, con más de 6 metros en humanos, y se extiende en “asas” desde el píloro hasta su desembocadura en el ciego (válvula ileocecal), en la fosa ilíaca derecha. Está dividido en tres porciones anatómicas:

- **Duodeno:** Es la primera región, de unos 25 cm. de largo, dispuesto en forma de “C”. En la porción inicial aparecen las glándulas de Brunner en la submucosa, cuya secreción alcalina protege a la mucosa de la acidez del quimo. En la segunda porción aparecen dos salientes en la mucosa: carúncula duodenal mayor, donde se abre la ampolla de Vater, desembocadura conjunta del conducto pancreático principal (de Wirsung) y colédoco (de la vía biliar), y carúncula duodenal menor, que desemboca el conducto pancreático accesorio (de Santorini).
- **Yeyuno:** Es de unos 2’5 m. de largo. Comienza en el ángulo formado con el duodeno denominado ángulo duodenoyeyunal para desembocar en el Íleon.
- **Íleon:** De unos 3’5 m., discurre distalmente para terminar en la válvula ileocecal, que es el límite con el intestino grueso (Martín y cols., 1994).

La pared del intestino delgado está constituida por cuatro capas bien diferenciadas, que desde la luz hacia fuera son:

-Mucosa: Constituida por un epitelio de revestimiento que subyace en tejido conjuntivo (lámina propia) y una capa de músculos liso (muscular de la mucosa). En el epitelio hay hasta cinco tipos celulares diferentes:

- Enterocitos: Son células cilíndricas que realizan la función de absorción, siendo además las células más abundantes de las que aparecen en el epitelio intestinal.
- Células Caliciformes: Se denominan así por su singular morfología. Presentan gránulos intracelulares que son descargados en la superficie epitelial constituyendo una capa de moco que protege y lubrica la mucosa (Wright, 2000).
- Células de Paneth: Son células granuladas que secretan péptidos y enzimas antimicrobianas como criptidinas, defensinas y lisozimas, por lo que se las sugiere como células especializadas en la defensa de la mucosa del intestino delgado. Del mismo modo parecen participar en la regulación de la composición iónica luminal, inflamación intestinal y digestión (Porter y cols., 2002).
- Células enteroendocrinas: Producen y secretan diferentes hormonas de manera endocrina o paracrina, como la serotonina, sustancia P y secretina (Lee y cols., 2004).
- Células M: Son células que cubren grandes nódulos linfáticos de la lámina propia del íleon. Presentan invaginaciones de la membrana basolateral que es ocupada por linfocitos. Actúan presentando microorganismos y antígenos que son captados en el lumen intestinal a los linfocitos, permitiendo por tanto, que se produzca una respuesta inmunológica (Man y cols., 2004)

La lámina propia contiene diferentes tipos celulares: fibroblastos, fibrocitos, endotelio vascular, células musculares lisas, varios tipos celulares sanguíneos y miofibroblastos (miofibroblastos subepiteliales intestinales) que secretan diferentes factores de crecimiento esenciales para la proliferación y diferenciación celular. Por todo ello, la lámina propia no solo representa el

entramado que sustenta el epitelio intestinal sino que además regula diferentes aspectos de su funcionalidad (Leedham y cols., 2005).

-Submucosa: Es una capa de tejido conjuntivo denso que en algunas localizaciones contiene acúmulos de adipocitos. En la porción inicial del duodeno aparecen las glándulas de Brunner.

-Muscular: Se compone de una capa interna de células musculares lisas dispuestas circularmente y una capa externa longitudinal.

-Serosa: Es la capa más externa que aparece en las partes del intestino delgado cubiertas por peritoneo y localizadas dentro de la cavidad abdominal. Es una membrana que consiste en un epitelio simple plano (mesotelio) y una pequeña cantidad de tejido conjuntivo (Ross y cols., 2005)

La capacidad de absorción intestinal va a depender, entre otras cosas, de la extensión de superficie que relacione el epitelio de la mucosa con el contenido intestinal. En el intestino delgado existen especializaciones encaminadas a aumentar dicha superficie, y aparecen tanto en las células que tapizan la mucosa, como en la propia mucosa y submucosa como tejidos. Así, encontramos los pliegues circulares, que son dobleces de la mucosa y submucosa extendidos perpendicularmente al eje del tubo intestinal, que comienzan a aparecer a unos centímetros del píloro. Estos pliegues multiplican por tres la superficie de absorción. Las vellosidades intestinales son otro tipo de especializaciones que consisten en evaginaciones digitiformes de la mucosa proyectadas hacia la luz del intestino, pudiendo alcanzar hasta 1 mm. de longitud, y consiguen incrementar por diez la superficie de absorción.

Entre los puntos de inserción de las vellosidades se ven orificios donde desembocan glándulas intestinales denominadas glándulas o criptas de Lieberkühn. Son estructuras tubulares que se extienden a través del espesor de la lámina propia. Su epitelio se continúa con el de las vellosidades. Finalmente, los enterocitos también presentan diferenciaciones estructurales

encaminadas a incrementar la superficie de absorción. Son las microvellosidades apicales que aparecen en número elevado, unas 2000-3000 por célula, que son capaces de multiplicar por veinte la superficie de absorción. Al microscopio óptico presentan un aspecto estriado, por lo que se denomina borde o chapa estriada al conjunto de las microvellosidades apicales de los enterocitos (Junqueira y cols., 1996; García-Porrero y cols., 2005)

1.3. Renovación celular en el epitelio del intestino delgado.

En las criptas de Lieberkühn se lleva a cabo un proceso dinámico celular que posibilita la renovación del epitelio intestinal adulto. Existen células madre multipotentes, localizadas en nichos específicos en la base de la cripta intestinal, capaces de dar origen a todos los tipos celulares que componen el epitelio (Clatworthy y cols., 2001). Se estima que hay entre una y seis células madre por cripta, que tras duplicarse origina una población de células progenitoras que siguen dividiéndose conforme migran hacia el lumen intestinal.

Una vez que las células alcanzan la vellosidad intestinal se produce un bloqueo del ciclo celular y por consiguiente un cese en la actividad proliferativa. Del mismo modo, a lo largo de la migración se va produciendo la diferenciación celular, tanto funcional como morfológicamente, que adquiere su grado máximo al alcanzar la región apical de la vellosidad, donde las células son finalmente descamadas (Sancho y cols., 2003). El recambio de las células epiteliales intestinales es muy rápido, con una duración de 2-3 días para la mayoría de mamíferos y de 3-5 días para humanos (Cairnie y cols., 1965). Las células progenitoras se diferencian hacia enterocitos, células caliciformes o enteroendocrinas, mientras que las células de Paneth se diferencian en la base de la cripta (Figura 1).

El mantenimiento de la homeostasis epitelial intestinal se produce por tres procesos complementarios. Primero, la producción de células es

compensada por la descamación que se produce en el ápice de la vellosidad. Segundo, la lámina de células epiteliales describe un movimiento continuo en sentido ascendente respecto al eje establecido entre la cripta y la vellosidad, exceptuando las células madre y las de Paneth que localizadas en la base de la cripta, no sufren ese proceso de migración ascendente. Tercero, la capacidad proliferativa no es propia de un determinado grupo de células, sino de una determinada localización en la cripta intestinal. Dicha localización se corresponde con el nicho ocupado por las células madre multipotentes. Es probable que este nicho esté constituido por células mesenquimáticas y por factores de la matriz extracelular que en definitiva proporcionan el microambiente adecuado para la actividad de las células allí situadas (Sancho y cols., 2004).

La capacidad proliferativa del intestino adulto es muy grande. En el intestino delgado de ratón hay aproximadamente 1.1 millones de criptas, conteniendo cada una entre 530 células de media que aparecen en el duodeno y 360 células en el íleon. Cada cripta es capaz de producir entre 13-16 células por hora. Por otra parte el número de criptas que suministran células por cada vellosidad varía respecto al eje cefalo-caudal, con una proporción de 14 en el duodeno proximal y de 6 en el íleon (Gordon y cols., 1992).

Entre los mecanismos moleculares que controlan el desarrollo gastrointestinal y la renovación del epitelio intestinal intervienen las rutas de señalización Wnt/ β -catenina y la Notch/Delta a través de los factores de transcripción Hes1 y Math1, así como otro tipo de moléculas: APC (complejo proteico supresor de tumores -poliposis adenomatosa de colon-), Tcf-4 (Factor de células T), Fkh-6 (factor de transcripción de la familia "helix/forkhead"), E2f4, Cdx-1, Cdx-2, Nkx2-3 (codificado por genes hoemobox), Ihh (Indian Hedgehog, molécula de señalización), Shh (Sonic Hedgehog, molécula de señalización), BMP (proteína morfogénica de hueso), HNF1 alpha (factor nuclear hepatocitario), p38 MAPK (proteína quinasa activada por mitógeno), activina, EGF (factor de crecimiento epidérmico), Insulina, IGF-I e IGF-II (factor de crecimiento similar a la insulina I y II), TGF- β 1 (factor de crecimiento

transformador), GLP-2 (péptido similar a glucagón-2), gastrina y la Integrina $\beta 4$ (Brittan y cols., 2002; Sancho y cols., 2003; Wang y cols., 2003; Leedham y cols., 2005; Madison y cols., 2005; Walters, 2005).

La familia de proteínas de señalización Wnt, interviene en diferentes procesos durante la embriogénesis y en la homeostasis en individuos adultos. Las proteínas Wnt son liberadas o presentadas en la superficie celular actuando sobre células diana a través de receptores específicos, en las que tras una cascada de reacciones se produce la inhibición de la degradación del regulador transcripcional β -catenina, y la consecuente acumulación del factor. En el núcleo celular la β -catenina interacciona con diversos factores de transcripción tal como el factor de células T/ factor intensificador linfocitario (TCF/LEF) afectando finalmente a la transcripción de diferentes genes (Logan y cols., 2004). Existen numerosas evidencias de la importante implicación de esta ruta en el desarrollo y mantenimiento del epitelio intestinal. Ratones transgénicos que expresan el inhibidor de la ruta Wnt, Dickkopf-1 (dck-1) (Glinka y cols., 1998) sufren una reducción de la proliferación epitelial intestinal, pérdida de las criptas y ausencia mayoritaria de células secretoras (Pinto y cols., 2003). La Tcf-4, miembro de la familia de factores TCF/LEF, es necesario para el mantenimiento de las células madre de la cripta y de la actividad proliferativa (Korinek y cols., 1998; van de Wetering y cols., 2002). Por otro lado, las células proliferativas de la cripta intestinal acumulan cantidades relativamente grandes de β -catenina en su citoplasma y principalmente en el núcleo (van Noort y cols., 2002).

Los factores Cdx-1 y Cdx-2, codificados por genes "Homeobox", parecen intervenir en la regulación de la proliferación y diferenciación de las células madre de las criptas, así como de las características morfológicas propias de zona del epitelio intestinal (Brittan y cols., 2002). Las proteínas kinasas p38 participan en el proceso de diferenciación como elementos reguladores de la función de Cdx-2 (Houde y cols., 2001). El E2f4 es un factor de transcripción que juega un papel esencial en el desarrollo de los compartimentos

proliferativos del epitelio intestinal, tanto en el intestino embrionario como en el adulto (Rempel y cols., 2000).

La activina es un miembro de la familia TGF- β que se expresa en células epiteliales intestinales. Actúa en la regulación de la diferenciación celular, contribuyendo por tanto a la homeostasis del epitelio (Sonoyama y cols., 2000). EGF interviene en la reorganización del citoesqueleto celular necesario para la diferenciación y reparación del epitelio intestinal (McCormack y cols., 1998). IGF-I estimula la proliferación y la migración de las células epiteliales, jugando un importante papel en la reparación del tejido epitelial tras una lesión (Kojima y cols., 1998; Chen y cols., 1999), por el contrario IGF-II e insulina están más relacionadas con la diferenciación (Jehle y cols., 1999; Georgiev y cols., 2003).

GLP-2 incrementa la proliferación celular (Jasleen y cols., 2002) así como la expresión de la enzima sacarasa-isomaltasa, siendo un potente inductor del crecimiento intestinal en condiciones desfavorables como ocurre en la nutrición parenteral (Kitchen y cols., 2000). Muchas citoquinas ejercen un papel regulador en el desarrollo intestinal. IL-2 (Interleucina-2) y FGF (factor de crecimiento de fibroblastos) actúan en conjunción de contactos intercelulares y de célula-matriz extracelular, dando lugar a diferentes señales de diferenciación (Burgess, 1998). Por otro lado, diferentes estudios *in vitro* apuntan a la gastrina como un agente inductor de la proliferación, migración y diferenciación de las células epiteliales intestinales (Wang y cols., 2003).

En el proceso de diferenciación de las células progenitoras hacia los cuatro linajes celulares adultos intervienen factores como Math1 y Hes1 (Figura 2). La expresión de Hes1 inhibe la expresión de Math1 dirigiendo la diferenciación hacia enterocitos. La ausencia de Hes1 incrementa la expresión de Math1 y la célula progenitora queda comprometida en la línea secretora. Otros factores tiene que intervenir hasta que finalmente aparezcan las células maduras (Yang y cols., 2001). Rac1, miembro de la familia Rho de proteínas de unión al GTP, participa en la diferenciación hacia células de Paneth y linaje enterocítico (Stappenbeck y cols., 2000) mientras que el factor de transcripción

BETA2/NeuroD se ha implicado en la diferenciación enteroendocrina (Schonhoff y cols., 2004).

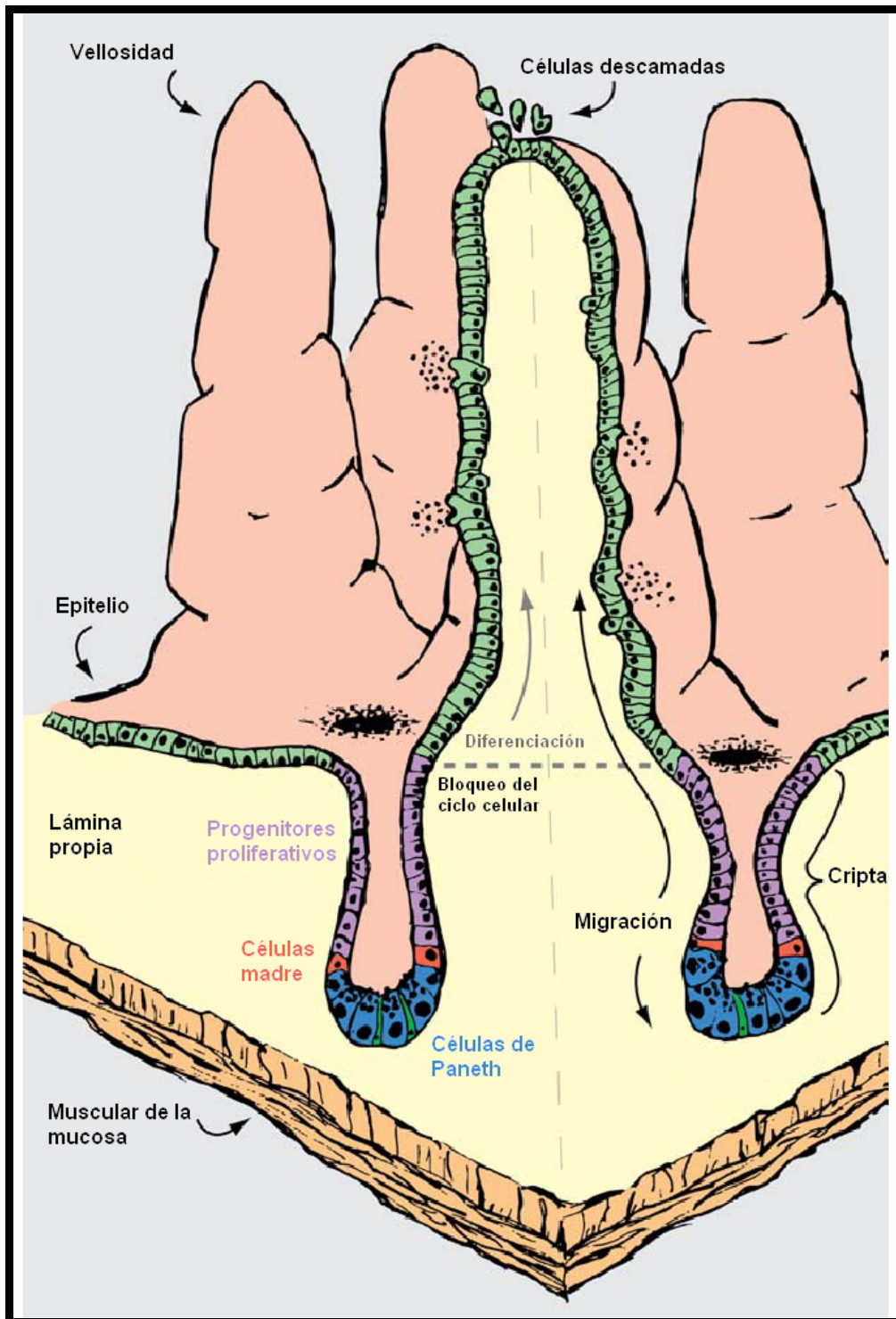


Figura 1. Esquema de la mucosa y dinámica epitelial del intestino delgado (Sancho y cols., 2004)

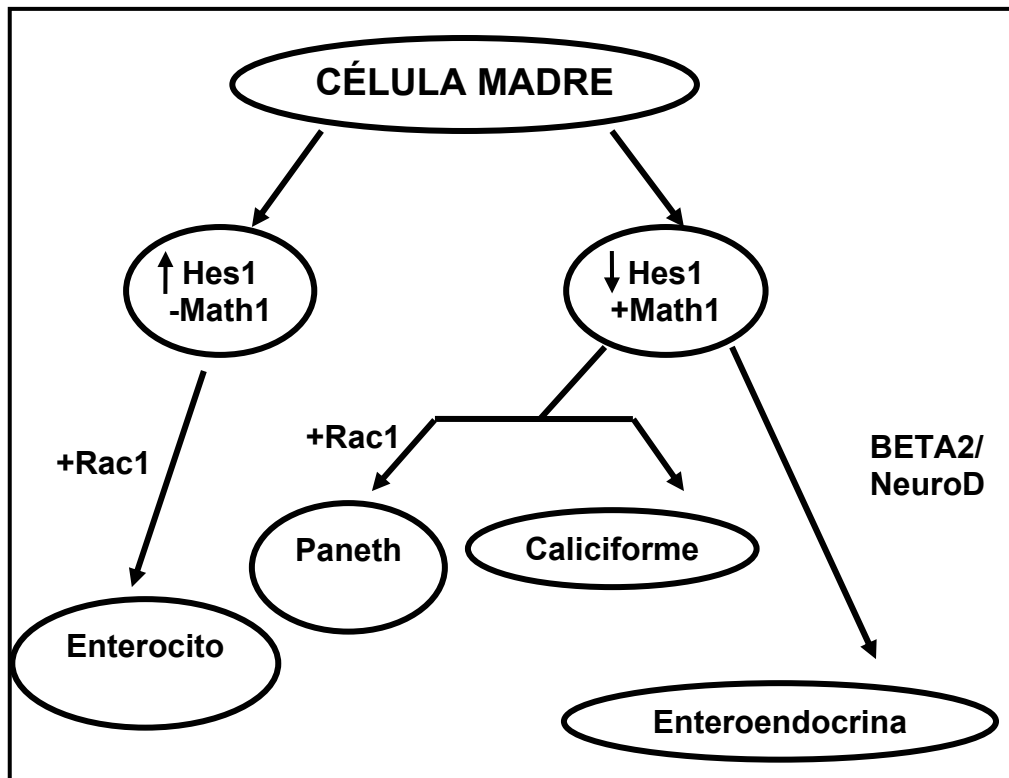


Figura 2. Diferenciación de los distintos tipos celulares del epitelio intestinal (Brittan y cols., 2002)

1.4. Diferenciación enterocítica. Caracterización molecular y ultraestructural.

El proceso de diferenciación epitelial intestinal puede ser caracterizado mediante la monitorización del cambio en la expresión y/o actividad de enzimas y proteínas específicas, determinación de la capacidad para desarrollar el transporte de diferentes sustratos, detección de la secreción de moléculas y el estudio de los cambios morfológicos estructurales y ultraestructurales (Ametani y cols., 1996).

Los enterocitos son células columnares que muestran orgánulos con un patrón de organización polarizado. En la mitad inferior aparece el núcleo celular ovalado, acompañado por sacos y vesículas del aparato de Golgi dispuestos supranuclearmente. Las mitocondrias se acumulan en la región

apical y el retículo endoplasmático queda distribuido por el resto del citoplasma. En el extremo libre superior se encuentran las microvellosidades constituyendo la chapa estriada, cubierta por una red fibrilar de carácter glucídico denominada glicocálix. Existe una clara separación del dominio celular basolateral y apical de los enterocitos, establecido a través de uniones intercelulares del tipo uniones estrechas y desmosomas. De esta manera, el tejido epitelial se constituye como una barrera que controla el paso de moléculas procedentes del lumen intestinal.

Mariadason y cols. han puesto de manifiesto que la reprogramación genética que tiene lugar durante el proceso de diferenciación del epitelio a lo largo del eje cripta-vellosidad del intestino delgado de ratón, implica a un total de 1113 genes entre los que aparecen marcadores de diferenciación enterocítico, genes relacionados con el control de las fases del ciclo celular, procesado de ARN, citoesqueleto y captación de lípidos (Mariadason y cols., 2005).

Entre los marcadores específicos de células enterocíticas maduras se encuentra la fosfatasa alcalina, disacaridasas, peptidasas, gamma-glutamyltransferasa, transportador de glucosa de pendientes de sodio SGLT 1, transportadores de fructosa como Glut 2 y Glut5, antígeno 104K, 5-nucleosidasa, villina, Fabpi/FabpL, Apolipoproteína B, Anexina y otros (Carroll y cols., 1988; Massey-Harroche, 2000; Sancho y cols., 2004).

La fosfatasa alcalina es una enzima dimérica presente en la mayoría de los organismos que cataliza la hidrólisis de ésteres monofosfato a pH alcalino, liberando fosfato inorgánico. En humanos, se conocen cuatro isoenzimas, una no específica de tejido que se expresa en una amplia variedad de tejidos como hígado, hueso y riñones (Calhau y cols., 2000), y tres específicas de tejido que reciben el nombre en función del órgano en el que son más abundantes, intestinal, placentar y de las células germinales (Le Du y cols., 2002). A nivel intestinal la enzima fue detectada en la membrana del borde estriado (Colbeau y cols., 1978), membrana basolateral (Hanna y cols., 1979) y citosol. También

se puso de manifiesto su existencia en los vasos linfáticos de las vellosidades, por lo que se sugirió un transporte del enzima desde el citosol de las células intestinales hacia los vasos (Miura y cols., 1990).

La fosfatasa alcalina se localiza en la membrana de las microvellosidades, fijada a la superficie a través de un anclaje GPI (fosfatidilinositol-glicosilado) (Wong y cols., 1992). A diferencia de otras especies, en la mucosa intestinal de las ratas se han encontrado dos ARNm con masas moleculares de 68 y 90kD respectivamente, que codifican dos isoformas de fosfatasa alcalina intestinal, rIAP-I y rIAP-II, con un 79% de homología. (Engle y cols., 1992; Grewal y cols., 2004). La isoforma rIAP-II se caracteriza por encontrarse exclusivamente en la mucosa duodenal por lo que parece ser la responsable de las diferentes propiedades cinéticas y de sensibilidad a drogas de la fosfatasa alcalina entre el duodeno y yeyuno de rata (Calhau y cols., 2000).

La ingesta de alimentos proporciona grasas que son procesadas por los enterocitos. Los triglicéridos son empaquetados en gotitas de lipoproteínas, siendo la Apolipoproteína B el componente más importante (Morel y cols., 2004). Los complejos triglicérido-apolipoproteína están rodeados por una membrana que contiene fosfatasa alcalina, y se van desplazando a lo largo de la célula, hasta que finalmente la grasa junto con la membrana que las recubre es liberada en el espacio basolateral (Mahmood y cols., 2003). Por otro lado, la acción detergente realizada por las sales biliares presentes en el fluido intestinal, lleva a cabo la emulsión de componentes proteicos anclados en la membrana de las células epiteliales intestinales, tales como la fosfatasa alcalina, constituyendo un elemento muy relevante en el proceso de recambio de dicha enzima (Shiozaki y cols., 1995).

La villina, es una proteína monomérica de 92.5-kD que forma parte del grupo de proteínas asociadas a actina moduladas por calcio (Pringault y cols., 1991). El corazón de las microvellosidades esta ocupado por filamentos paralelos de actina que se disponen desde el ápice de la vellosidad hasta la

superficie celular. En el tracto digestivo y urinario, la villina se asocia a estos filamentos con gran afinidad, a través de tres diferentes sitios, dos dependientes de calcio y otro independiente, realizando una función de mantenimiento de la morfología característica de la superficie de los enterocitos. Por otro lado, la villina parece tener un papel en la dinámica del citoesqueleto en contextos tales como la motilidad celular, morfogénesis celular e infecciones bacterianas, a través de la mediación en el estado de polimerización de la actina y en la organización espacial de los profilamentos (Athman y cols., 2002).

La expresión de villina incrementa durante el proceso de diferenciación de los enterocitos (Wang y cols., 2003), es decir, desde la cripta hasta el extremo superior de la vellosidad. Además de ser un marcador de diferenciación, la villina es usada como marcador frente a tejidos tumorales y metastáticos, que de forma original no la producen. La metaplasia de Barrett's de tipo intestinal, se caracteriza por que el 100% de los afectados presenta la expresión de villina (MacLennan y cols., 1999), y para los enfermos de adenocarcinoma pulmonar, se sugiere el empleo de este marcador tanto en términos de expresión de la proteína como de la detección de ARNm alterados de la misma (Nambu y cols., 1998).

Las disacaridasas son enzimas encargadas del paso final en la digestión de los hidratos de carbono. La determinación de las actividades enzimáticas maltasa, sacarasa, y lactasa son muy frecuentemente utilizadas como marcador en estudios de diferenciación epitelial intestinal (He y cols., 1993; Sato y cols., 1999; Fan y cols., 2001). El complejo enzimático sacarasa-isomaltasa es una glucoporteína heterodimérica de la membrana de las microvellosidades, que lleva a cabo la degradación de ciertos azúcares. Una de las subunidades presenta actividad sacarasa y maltasa, mientras que la otra isomaltasa y maltasa (Hauri y cols., 1979). En el intestino grueso el complejo sacarasa-isomaltasa tiene características inmunológicas diferentes a las presentadas en el intestino delgado, lo que sugiere diferencias en la estructura de ambas proteínas (Beaulieu y cols., 1990).

En las tres cuartas partes inferiores de las microvellosidades de los enterocitos maduros aparece Anexina XIII. Esta proteína es exclusiva de los enterocitos y pertenece a la familia de las anexinas, que son proteínas citoplasmáticas de unión a la membrana fosfolipídica y/o al citoesqueleto, de manera dependiente de calcio. Otras anexinas que aparecen de manera no exclusiva, son la anexina IV y anexina II en la membrana basolateral de los enterocitos (Massey-Harroche, 2000).

Un aspecto interesante a destacar en cuanto a los marcadores enzimáticos de diferenciación son las variaciones que aparecen en los niveles basales de las enzimas marcadoras respecto a la región considerada. En ratas adultas, se ha puesto de manifiesto mediante el empleo de técnicas inmunocitoquímicas, un gradiente descendente desde la inserción proximal del intestino delgado, de la tinción específica frente a la fosfatasa alcalina del borde en cepillo de la vellosidad (Shields y cols., 1984), también se ha comprobado que la actividad específica de la fosfatasa alcalina es muy alta en la región superior del intestino delgado de rata, al parecer debido a que en dicha zona se realiza principalmente la absorción de los alimentos (Wada y cols., 2001). Fan y colaboradores estudiaron en cerdos neonatos las modificaciones en las actividades de varios marcadores a lo largo del eje cripta-vellosidad del intestino delgado y demostraron la existencia de un gradiente decreciente para la fosfatasa alcalina, aminopeptidasa N, sacarasa y lactasa desde la vellosidad hasta la cripta (Fan y cols., 2001).

La maduración de los enterocitos lleva implícito la adquisición de marcadores que característicos de las células maduras y la pérdida de otros marcadores tal como Ki67, p21 (inhibidor de kinasa dependiente de ciclinas) y el marcador específico de gránulos de secreción MIM-1/39, que son expresados exclusivamente por las células de la cripta intestinal. Sin embargo, se ha observado que esta regla no se cumple completamente en humanos, ya que se ha detectado presencia de aminopeptidasa N y sacarasa-isomaltasa en estadios celulares no diferenciados (Pageot y cols., 2000).

1.5. Modelos experimentales para el estudio del epitelio intestinal. Líneas celulares intestinales.

El empleo de cultivos celulares en la experimentación científica conlleva una serie de ventajas, como el control de las condiciones ambientales, la homogeneidad de las muestras y el desuso de animales de experimentación. No obstante, existen aspectos desfavorables como las estrictas condiciones de asepsia que tiene que ser mantenidas a la hora de desarrollar las diferentes técnicas de cultivo.

Para el estudio del epitelio intestinal se han ido desarrollando diferentes líneas celulares tanto normales como tumorales, humanas y de otras especies. Las líneas HT-29 y Caco-2, proceden de tumores primarios de colon humano de grado II, moderadamente diferenciados, capaces de generar tumores bien diferenciados de tipo enterocítico al ser inoculados en ratones (Zweibaum y cols., 1984; Chantret y cols., 1987; Zweibaum, 1993). Estas líneas, cultivadas con las condiciones adecuadas, expresan características típicas de la diferenciación de los enterocitos normales.(Pinto y cols., 1982; Hauri y cols., 1985; Rousset y cols., 1985). Sin embargo no proceden de células normales no tumorales, por lo pueden existir diferentes características metabólicas que las alejen de la situación epitelial normal in vivo e in vitro.

La línea IEC-6 fue establecida a partir de células epiteliales procedentes de yeyuno de rata. Tiene características fenotípicas indiferenciadas, capaces de sintetizar fibronectina y colágeno, y son consideradas como derivadas de las criptas del intestino delgado (Quaroni y cols., 1979). Han sido utilizadas en estudios de proliferación celular (He y cols., 1993; Corkins y cols., 1995; Wolpert y cols., 1996; Sato y cols., 1999; Jasleen y cols., 2002; Tuhacek y cols., 2004), diferenciación (Carroll y cols., 1988; He y cols., 1993; Suh y cols., 1996; Soubeyran y cols., 1999), reparación de daño tisular (Sturm y cols., 1999; Beck y cols., 2003; Hirata y cols., 2003; Tabel y cols., 2003; Liu y cols., 2005), evaluación de infecciones (McGee y cols., 1993; Tabel y cols., 2003; Upperman

y cols., 2003), prueba de la calidad nutricional de alimentos (Thoreux y cols., 1996), etc

Carroll y cols. describieron un método para la inducción morfológica y funcional de la diferenciación de las células IEC-6 en cultivo. Consiste en crecer las células sobre una matriz de membrana basal obtenida a partir de tejido de sarcoma Engelbreth-Holm-Swarm de ratón (Carroll y cols., 1988). Comercialmente este material se conoce con el nombre de Matrigel[®] y en su composición se encuentra en primer lugar la laminina, seguido de colágeno IV, entactina y proteoglicanos de heparán sulfato (Kleinman y cols., 1982). Posteriormente otros autores determinaron que las células IEC-6 son capaces por si solas de diferenciarse en ausencia de Matrigel cuando el cultivo se encuentra en postconfluencia (Ametani y cols., 1996; Wood y cols., 2003).

El comportamiento de las células IEC-6 en cultivo se asemeja al que experimentan las células epiteliales intestinales in vivo. Inicialmente las células proliferan de manera intensa tal como ocurre en la base de las criptas intestinales. Tras aparecer confluencia se van constituyendo zonas donde la monocapa se va engrosando y aparecen más capas superpuestas de células. Después se produce un bloqueo de la proliferación, expresión de marcadores como la fosfatasa alcalina intestinal y desarrollo de microvellosidades en su superficie celular. Esta nueva situación se corresponde con la localización de las células a nivel de la vellosidad intestinal, donde los enterocitos van adquiriendo el grado máximo de diferenciación. Finalmente las células van perdiendo adherencia al sustrato y son descamadas hacia el medio de cultivo con el resultado de muerte celular por apoptosis. Un balance establecido entre las células diferenciadas que van desapareciendo y otras indiferenciadas proliferativas, mantienen constante el número de células del cultivo postconfluente (Ametani y cols., 1996).

Otras líneas celulares disponibles de epitelio intestinal de rata son las IEC-17 e IEC-18 (Quaroni y cols., 1999), aunque son menos utilizadas que las anteriores en estudios sobre la biología de los enterocitos.

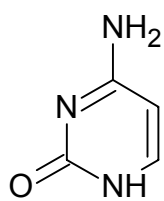
2. NUCLEÓTIDOS

2.1. BIOQUÍMICA Y METABOLISMO DE LOS NUCLEÓTIDOS

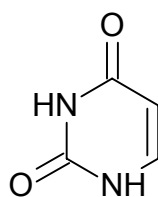
2.1.1 Estructura química y nomenclatura

Los nucleótidos son biomoléculas de bajo peso molecular constituidas por una base nitrogenada derivada de una purina o pirimidina, una pentosa (ribosa o desoxirribosa) y uno o mas grupos fosfato, generalmente en posición 5' (nucleótido mono, di o trifosfato). Los nucleósidos se forman a partir de una base nitrogenada y una pentosa, por lo que los nucleótidos son ésteres fosfato de los nucleósidos.

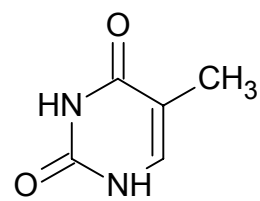
Las bases pirimidínicas consisten en anillos de seis miembros entre las que se encuentran la citosina, el uracilo y la timina. Las bases púricas además del anillo pirimidínico presentan un segundo anillo de cinco miembros, apareciendo en este grupo la adenina, guanina, inosina e hipoxantina.



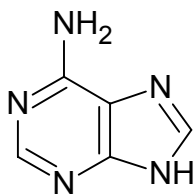
Citosina



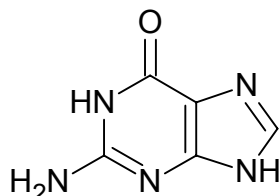
Uracilo



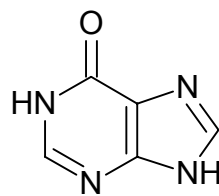
Timina



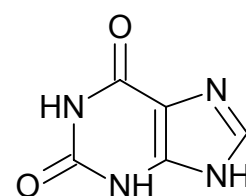
Adenina



Guanina

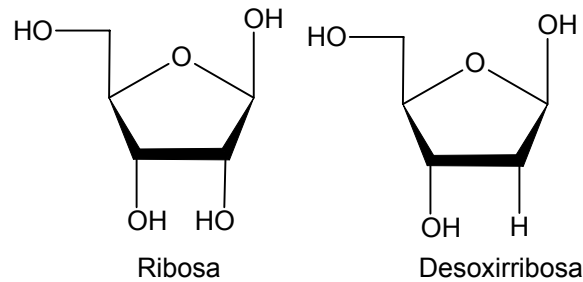


Hipoxantina



Xantina

Bases nitrogenadas



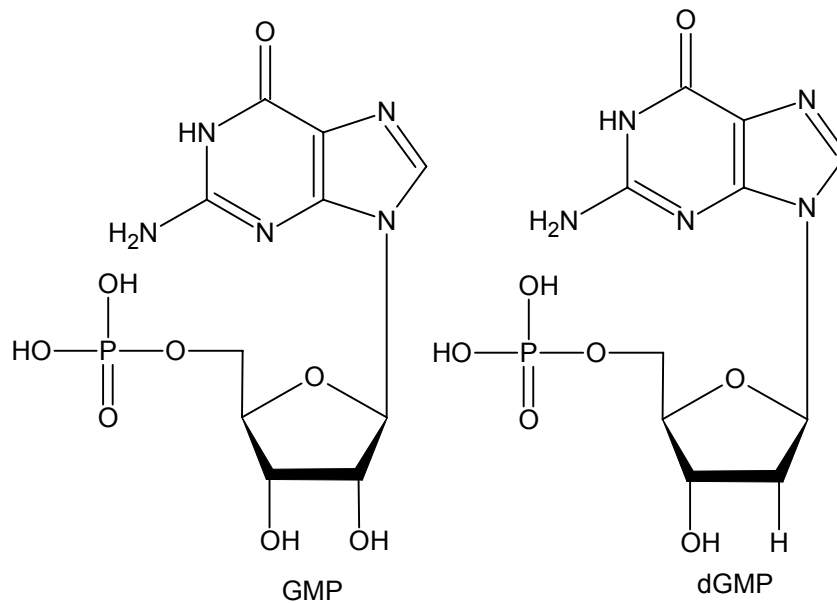
Pentosas

Los nucleótidos y nucleósidos que incluyen ribosa en su molécula se denominan ribonucleótidos o ribonucleósidos respectivamente, mientras que si se trata de 2'-desoxirribosa se denominarían introduciendo el prefijo "desoxi-" (Stryer, 1995; Devlin, 1997).

En la siguiente tabla se recoge la nomenclatura y abreviatura de las bases, y de los nucleósidos y nucleótidos derivados de ellas:

Base nitrogenada	Nucleósido	Nucleótido	Abreviatura
Adenina	Adenosina (A)	Adenosín mono-, di- y trifosfato	AMP, ADP, ATP
Guanina	Guanosina (G)	Guanosín mono-, di- y trifosfato	GMP, GDP, GTP
Citosina	Citidina (C)	Citidín mono-, di- y trifosfato	CMP, CDP, CTP
Hipoxantina	Inosina (I)	Inosín mono-, di- y trifosfato	IMP, IDP, ITP
Xantina	Xantosina (X)	Xantosín mono-, di- y trifosfato	XMP, XDP, XTP
Uracilo	Uridina (U)	Uridín mono-, di- y trifosfato	UMP, UDP, UTP
Timidina	Desoxitimidina (dT)	Desoxitimidina mono-, di- y trifosfato	dTMP, dTDP, dTTP

La presencia de desoxirribosa se especifica con el prefijo "desoxi" o "d" (Gil y cols., 1993)



Nucleótidos monofosfato de Guanina

2.1.2. Funciones metabólicas

Los nucleótidos participan en casi todos los procesos bioquímicos del organismo, de diferente forma:

1. Precursores de ácidos nucleicos. Los nucleótidos constituyen las unidades monoméricas tanto del ADN (desoxirribonucleótidos) como del ARN (ribonucleótidos). Estas moléculas son el soporte para el almacenamiento, transferencia, y expresión de la información genética.
2. Moléculas energéticas. La liberación de los grupos fosfato terminales por parte de los nucleótidos trifosfato conduce a la liberación de energía, por lo que dicho proceso se acopla a otros en los que se requiere aporte energético o la donación de grupos fosfato. En este sentido, el ATP se considera la moneda energética universal en los sistemas biológicos.

3. Intermediarios en rutas biosintéticas. Los nucleótidos participan en muchas rutas biosintéticas como transportadores de intermediarios activados. Por ejemplo, la UDP-glucosa aporta los residuos de azúcares necesarios para la biosíntesis de glucógeno y glucoproteínas; CDP-colina y CDP-etanolamina están involucrados en el metabolismo de los fosfolípidos.
4. Componentes de coenzimas. Los nucleótidos de adenina son componentes de importantes coenzimas: dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD), dinucleótido de flavina y adenina (FAD), sus formas reducidas y del coenzimaA.
5. Mediadores celulares. Los nucleótidos y sus derivados intervienen como moléculas mediadoras en diferentes procesos. La adenosina 3', 5' fosfato cíclico (AMP cíclico) es sintetizada a partir de ATP, tras la estimulación celular por hormonas como la adrenalina.
6. Efectores alostéricos. Muchos puntos de regulación de las rutas metabólicas son controladas a través de la concentración intracelular de nucleótidos (Gil y cols., 1993; Stryer, 1995; Devlin, 1997)
7. Reguladores biológicos. La presencia extracelular de nucleótidos y sus derivados podría conducir, a través de receptores específicos, a la activación de sistemas de transducción de señales y por consiguiente, a la modulación de ciertos procesos biológicos. Así, la adenosina a través de receptores A2a interviene produciendo un efecto antiinflamatorio, limitando y finalizando tanto la respuesta inflamatoria específica de tejido como la sistémica (Ohta y cols., 2001). Mediante receptores A3 la adenosina inhibe la proliferación de varios tipos de células tumorales entre las que se encuentran células malignas de melanoma, colon y próstata (Fishman y cols., 2002). También es un importante componente regulador para el sistema cardiovascular y renal, produciendo entre otros efectos la inhibición de la liberación de renina, retención renal de sodio, inhibición de la agregación plaquetaria, vasodilatación y control del aporte de oxígeno al

miocardio (Shryock y cols., 1997). El ATP a través de receptores purinérgicos P2 actúa como un agente inductor de la proliferación celular en una amplia variedad de líneas celulares (Huang y cols., 1989).

2.1.3. Metabolismo de los nucleótidos

Los niveles intracelulares tanto de ribonucleótidos como de desoxirribonucleótidos oscilan de manera importante respecto a la fase del ciclo celular en la que se dispongan y ante determinadas situaciones metabólicas. La forma química principal de pirimidinas y purinas en las células es la de nucleótido-5' y sus derivados. Las concentraciones de ribonucleótidos son generalmente milimolares, donde el ATP presenta la mayor concentración (entre 2-10 mmol/L). Por el contrario, los desoxirribonucleótidos aparecen en un rango micromolar (Rudolph, 1994; Devlin, 1997).

a) Biosíntesis de nucleótidos: de novo y ruta de recuperación

Las purinas y pirimidinas pueden ser sintetizadas de novo, a partir de moléculas sencillas, con un importante costo energético en forma de ATP, o bien, sintetizadas por la denominada vía de recuperación, en la se realiza la síntesis de nuevos nucleótidos mediante la reutilización de bases nitrogenadas y nucleósidos preformados, procedentes de la dieta, del hígado por vía circulatoria, o de la degradación de ácidos nucleicos y nucleótidos celulares (Moyer y cols., 1981; Fontana, 1993; Gil y cols., 1993) (Figura 3).

La existencia de la síntesis de novo hace que los nucleótidos no sean considerados nutrientes esenciales. De hecho, no se ha propuesto ninguna patología determinada en respuesta a un déficit en el aporte exógeno de nucleótidos (Sanchez-Pozo y cols., 2002). Sin embargo, algunas localizaciones, como la mucosa intestinal, tienen una limitada capacidad para la síntesis de novo, que es estimulada ante la ausencia de purinas exógenas en

el alimento (LeLeiko y cols., 1983) y cuyas tasas de producción son menores que las alcanzadas en la ruta de recuperación, por lo que en ausencia de aporte externo los enterocitos sufren una reducción en la cantidad total de ácidos nucleicos (Fontana, 1993). Estos resultados sugieren que el intestino es fuertemente dependiente de la ruta de recuperación de nucleótidos para llevar a cabo un desarrollo adecuado.

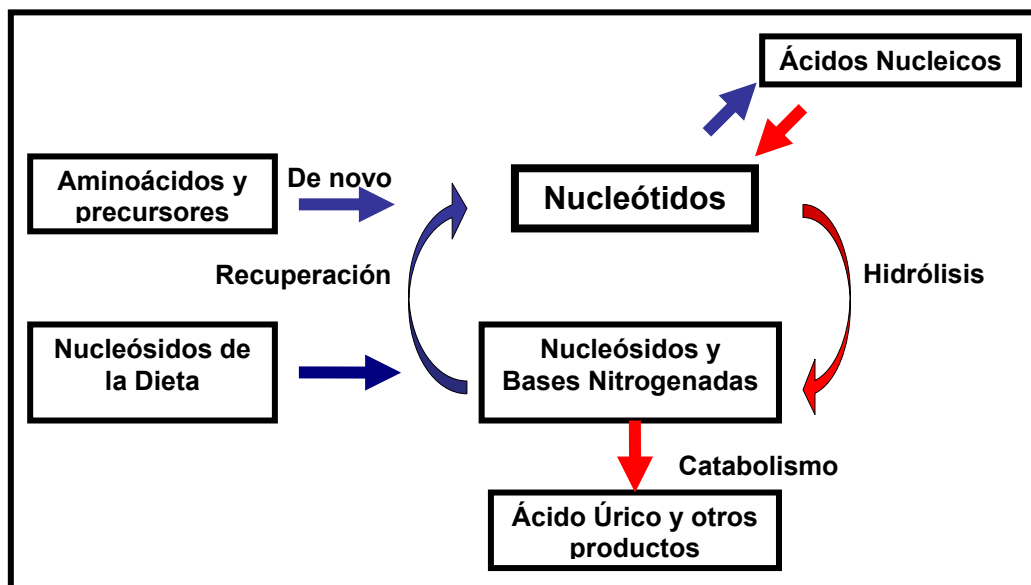


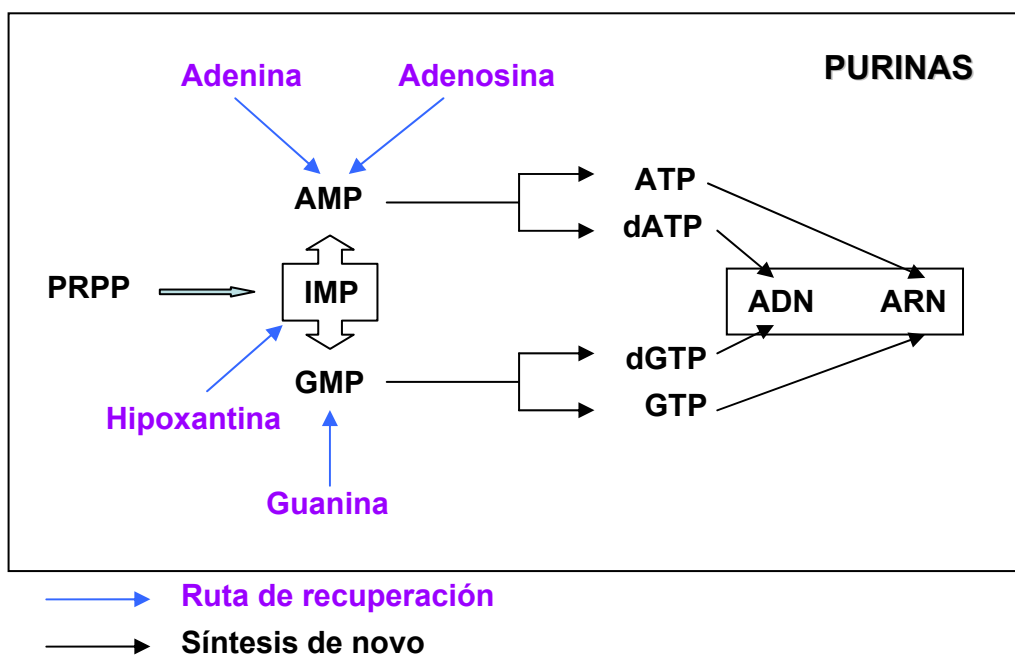
Figura 3.- Relación entre la captación de nucleótidos, síntesis de novo, recuperación y catabolismo (Rudolph, 1994).

La disponibilidad de sustrato para la ruta de recuperación podría optimizar la funcionalidad tisular, bien a través de un ahorro energético directo, o bien mediante el aporte exógeno de los nutrientes para aquellos tejidos con menor capacidad biosintetizadora de novo, tejidos con rápido recambio celular, o ante determinadas circunstancias especiales como crecimiento, recuperación de una determinada agresión tisular, etc. En este sentido, los nucleótidos pueden ser considerados como biomoléculas semiesenciales o condicionalmente esenciales (Van Buren y cols., 1997; Sanchez-Pozo y cols., 2002).

b) Metabolismo de las purinas

Un punto común entre la síntesis de purinas, de pirimidinas y la conversión de bases nitrogenadas en los correspondientes nucleótidos es la biosíntesis de fosforribosil pirofosfato (PRPP), que se forma a partir de ribosa-5'-fosfato procedente de la vía de las pentosas fosfato (Gil y cols., 1993).

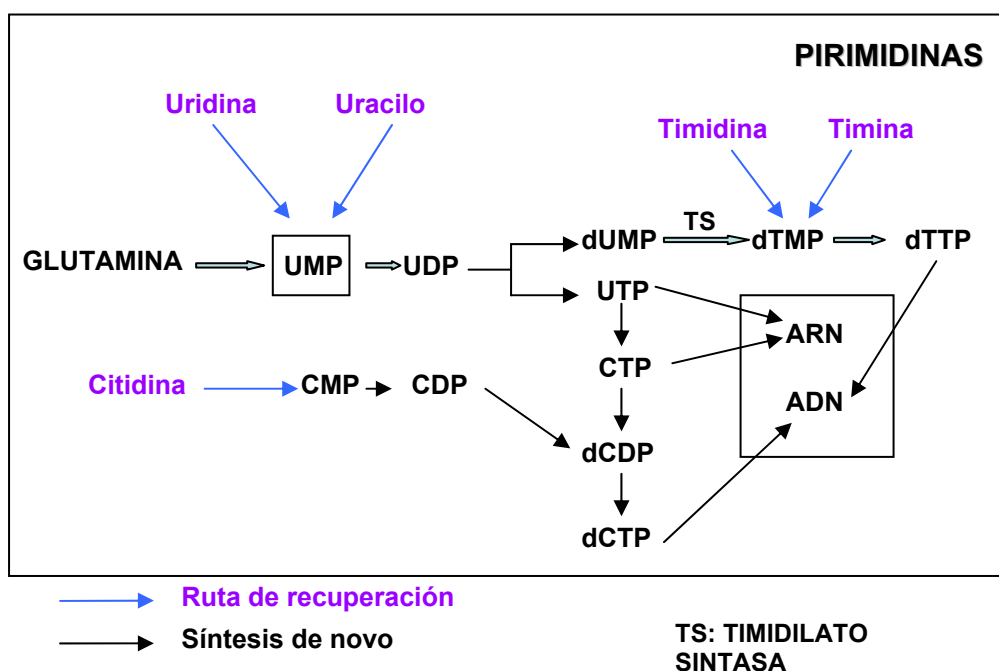
En la formación de purinas, el PRPP es transformado hasta IMP mediante la adición de átomos procedentes de dos moléculas de glutamina, una de aspartato y una de glicina. El IMP sirve de precursor para AMP y GMP, que serán transformados por la enzima ribonucleótido reductasa hacia sus formas de desoxirribonucleótidos, que finalmente formarán parte del ADN. Respecto a la recuperación de las purinas aparecen en este nivel varios enzimas que intervienen en la conversión de guanina e hipoxantina en GMP e IMP respectivamente, así como de adenina en AMP (Figura 3). La degradación de nucleótidos, nucleósidos y bases púricas se realiza hasta ácido úrico (Stryer, 1995; Devlin, 1997).



c) Metabolismo de las pirimidinas

En la síntesis de pirimidinas se parte de glutamina, que es anabolizada hacia ácido orótico y posteriormente a UMP. A partir de este nucleótido se sintetiza UDP que pasa a dUDP y dUMP, sustrato de la enzima Timidilato sintasa, la cual cataliza una reacción en la que se origina Timidilato (dTMP). El dTMP es fosforilado hasta dTTP. Por otro lado, a partir de UDP se forma UTP, CTP y dCTP (Carver y cols., 1995).

En la recuperación del uracilo y de la timina participa la enzima timidina fosforilasa, que realiza la conversión hacia uridina y timidina respectivamente. Sobre estas y sobre la citidina actúan kinasas que realizan la fosforilación de las moléculas originando los respectivos nucleótidos monofosfato UMP, dTMP y CMP. Otra ruta de recuperación del uracilo se basa en la actuación de una fosforribosil transferasa, que cataliza la transferencia de un grupo fosforribosil al uracilo para dar UMP (Gil y cols., 1993) (Figura 2 y 3). En la degradación de las purinas se produce en primer lugar la liberación de las bases nitrogenadas uracilo y timina. La citidina es desaminada dando uridina. El uracilo y la timina son degradados hasta dar como productos finales β -alanina y ácido β -aminoisobutírico respectivamente (Stryer, 1995; Devlin, 1997).



2.1.4. Alteraciones del metabolismo de los nucleótidos

Ciertas enfermedades se originan por alteraciones del metabolismo de los nucleótidos, y generalmente se relacionan con la acumulación de intermediarios y productos finales de las diferentes rutas metabólicas.

El catabolismo de las purinas origina ácido úrico, pudiéndose producir unos niveles séricos excesivos, debido a un incremento de la síntesis de novo y de las tasas de degradación de purinas (Puig y cols., 1994a), de una disminución en la excreción renal de urato, o una combinación de ambas (Puig y cols., 1994b). El resultado es una patología denominada gota, donde las manifestaciones clínicas responden a la precipitación de cristales de ácido úrico en tejidos blandos, riñones y articulaciones. Del mismo modo, en personas susceptibles, la ingesta de alimentos ricos en purinas estimula la aparición de los síntomas característicos (Gil y cols., 1993).

El síndrome de Lesh-Nyhan (SLN) consiste en un trastorno genético asociado a la sobreproducción de ácido úrico y a una disfunción neurológica grave. El origen del síndrome se encuentra en la ausencia de actividad de la enzima hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferasa, encargada de la reacción de recuperación de la hipoxantina y guanina a las formas nucleotídicas. Como consecuencia, se produce una reducción en las vías de recuperación de purinas e incremento de las síntesis de novo, dando como resultado el aumento de la síntesis de ácido úrico generando gota (De Antonio y cols., 2002). La relación entre la ausencia de la transferencia y los signos neurológicos como deficiencia mental, espasmos, comportamiento de autodestructivo y agresividad, son un enigma (Stryer, 1995).

La aciduria orótica hereditaria es una enfermedad caracterizada por la ausencia de la enzima UMP sintasa, encargada de la formación de UMP a partir de orotato. Como consecuencia se produce acumulación de ácido orótico excretado en orina, retraso en el crecimiento y desarrollo, leucopenia y anemia megaloblástica (Worthy y cols., 1974; Carver y cols., 1995).

2.1.5. Antimetabolitos

Se conoce como antimetabolitos a moléculas naturales o sintéticas estructuralmente análogas a purinas y pirimidinas, que actúan como inhibidores específicos de enzimas involucradas en el metabolismo de los nucleótidos. Es muy extendida su utilización como agentes anticancerígenos, antivirales, para el tratamiento de la gota e hiperuricemia y como inmunosupresores (Cory, 1997).

Análogos de la desoxiguanosina como el aciclovir y su prodroga, el valaciclovir, presentan gran actividad frente a infecciones producidas por varios tipos de herpes simple y zoster (Lee y cols., 2003; Kumar, 2004). El fármaco, es transformado intracelularmente en aciclovir trifosfato, que compitiendo con la molécula natural inhibe de manera irreversible la polimerasa vírica, impidiendo la elongación de la cadena de ADN (Chakrabarty y cols., 2005).

Importantes son los éxitos obtenidos a través del empleo de análogos de nucleósidos y nucleótidos como inhibidores de la transcriptasa inversa, en el tratamiento del sida. Entre estas moléculas encontramos Abacavir (prodroga de un análogo del nucleótido dGTP), Didanosina (análogo de la desoxiadenosina), Estavudina (análogo de la timidina) y Lamivudina (análogo de la desoxicidina) Zalcitabina (estructuralmente similar a la Lamivudina) y Zidovudina o AZT (análogo de la timidina) (Lee y cols, 2003).

La 6-mercaptopurina, análogo de la hipoxantina, es un importante fármaco antineoplásico e inmunosupresor (Tartakover Matalon y cols., 2005) que junto al metotrexano, constituye la base terapéutica de la leucemia linfoblástica aguda infantil (Estlin, 2001). Del mismo modo, tanto la 6-mercaptopurina como su prodroga, la azatioprina están siendo usados desde hace más de 30 años para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal (colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn), actuando posiblemente como inhibidores de la proliferación de células involucradas en la amplificación de la respuesta inmunológica (Nielsen y cols., 2001).

Además de la 6-mercaptopurina otros compuestos como la citarabina (1- β -D-arabinofuranosilcitosina) y cladribina producen una buena respuesta frente a diferentes leucemias, mientras que otros fármacos como la gemcitabina, el 5-fluorouracilo y sus prodrogas se utilizan preferentemente en el caso de tumores sólidos (Matsuda y cols., 2004).

2.2. Los alimentos como fuente de nucleótidos

Todos los alimentos presentan una mayor o menor cantidad de nucleótidos y derivados, tanto de forma libre como formando parte de los ácidos nucleicos. El aporte de ácidos nucleicos dependerá del contenido celular del alimento considerado. Vísceras, carne, pescado y legumbres son muy ricas, mientras que huevos, verduras, frutas (Clifford y cols., 1976) y leche (Gil y cols., 1981; Gil y cols., 1982) lo son menos.

Aunque el contenido relativo de nucleótidos en la leche es bajo respecto a otros orígenes, es de gran importancia debido a que es el único alimento para el recién nacido durante los meses iniciales de vida. Los nucleótidos constituyen parte del nitrógeno no proteico de la leche humana y dicha concentración se reduce conforme avanza el período de lactancia (Gil y cols., 1982; Janas y cols., 1982). Sin embargo, otros trabajos han analizado los nucleósidos potencialmente disponibles de la leche humana, realizando un hidrolizado previo de los ácidos nucleicos para finalmente determinar en conjunto tanto los nucleósidos libres como los liberados enzimáticamente. Estos estudios concluyen que las cantidades totales permanecen relativamente constantes durante la lactancia (Leach y cols., 1995; Tressler y cols., 2003).

La leche humana es relativamente más rica en nucleótidos que la leche de rumiantes (Sugawara y cols., 1995; Carver, 2003) y contiene una serie de nucleótidos de los que carece la leche de vaca (Gil y cols., 1981; Gil y cols., 1982), por lo que el empleo de fórmulas infantiles sustitutorias a la leche

humana conducen a un menor aporte de los mismos. Por este hecho, se introdujo la suplementación con nucleótidos, con la finalidad de que el contenido en las fórmulas infantiles, constituidas a base de leche de vaca fundamentalmente, sea similar al que recibe un lactante alimentado con leche materna (Cosgrove, 1998).

2.3. Digestión y absorción de los nucleótidos

Sólo una pequeña proporción del total de los nucleótidos presentes en la dieta aparece como moléculas libres, mientras que la mayor parte se encuentra formando ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos de las nucleoproteínas son liberados por la acción de enzimas proteolíticas del jugo gástrico. Posteriormente las ribonucleasas y desoxirribonucleasas pancreáticas originan oligonucleótidos, sobre las que actúan fosfodiesterasas tanto pancreáticas como procedentes de las glándulas de Brunner y Lieberkühn, dando mononucleótidos. Fosfatasa del jugo pancreático, fosfatasa alcalina del epitelio intestinal y nucleotidasas transforman los nucleótidos en nucleósidos. Finalmente, las bases nitrogenadas son liberadas por la acción de nucleosidasas (Quan y cols., 1990; Gil y cols., 1993).

Diversos estudios realizados con animales de experimentación sugieren, que la forma química que es captada predominantemente es la de nucleósido, produciéndose una absorción entorno al 90% de los nucleósidos y bases de la dieta, por parte de los enterocitos. Sin embargo, los nucleótidos son absorbidos en poca cantidad (Sonoda y cols., 1978; Ho y cols., 1979) (Fig. 4). Del total de los nucleósidos y bases suministrados a través de la dieta que se absorben entre el 2 y 5% son incorporados finalmente a los tejidos, destacando el intestino delgado, hígado y músculo esquelético. El resto es rápidamente degradado en los enterocitos, dando lugar a productos que son desechados tanto por la orina como por el intestino (Burrige y cols., 1976; Carver, 1999).

El paso de los nucleósidos a través de las membranas celulares se realiza a través de transportadores proteicos, tratándose bien de un transporte pasivo por difusión facilitada (ENT), a favor de un gradiente de concentración químico, o mediante un transporte activo (CNT) realizado gracias a un cotransporte de sodio a favor de un gradiente electroquímico (Cass y cols., 1998). La importancia de los transportadores es doble, por un lado permiten la internalización de los nucleósidos y por otro lado controlan la presencia extracelular de éstos limitando de este modo los efectos derivados de la activación de receptores específicos de superficie (Baldwin y cols., 1999).

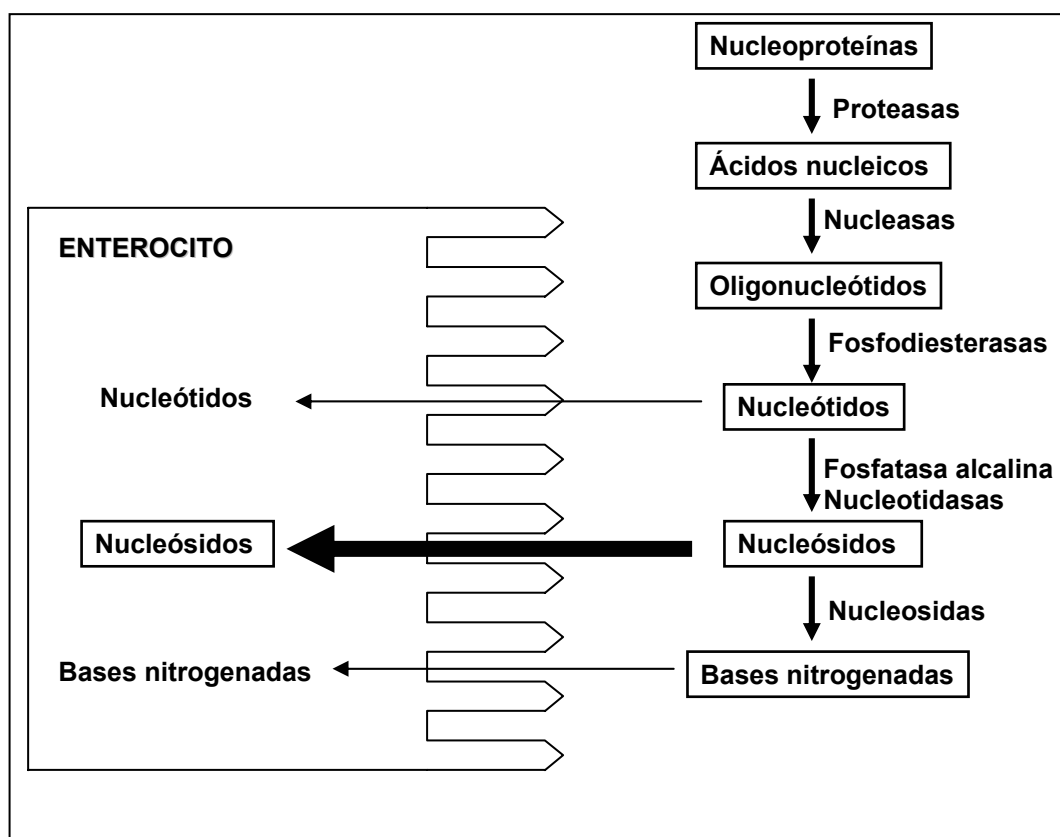


Figura 4.- Digestión y absorción de Ácidos nucleicos (Quan y cols., 1991)

Existen tres tipos de transportadores CNT: CNT1, CNT2 y CNT3. Tienen gran afinidad por su sustrato natural. CNT1 transporta predominantemente nucleósidos pirimidínicos y adenosina, CNT-2 transporta preferentemente púricos y uridina, mientras que CNT-3 transporta ambos grupos químicos (Gray y cols., 2004). La familia de ENTs está constituida por cuatro miembros,

encontrándose los dos primeros miembros mejor caracterizados: ENT1, ENT2 y ENT3, que transportan tanto nucleósidos pirimidínicos como púricos. ENT2 destaca por su gran capacidad para el transporte de bases nitrogenadas. El sustrato predominante para ENT4 es la adenosina (Baldwin y cols., 2004).

Los transportadores CNT se localizan en la membrana celular apical mientras que los ENT se localizan en la membrana basolateral. Este hecho alimenta la hipótesis de una acción coordinada de ambos tipos de transportadores para un transporte transepitelial de nucleósidos (Casado y cols., 2002).

CNT1 se localiza principalmente en el epitelio intestinal, hígado y riñón. CNT2 y CNT3 presentan una distribución más amplia. ENT1, ENT2, ENT3 y ENT4 están ampliamente distribuidos por los tejidos (Baldwin y cols., 2004; Gray y cols., 2004). En ratas, el epitelio del intestino delgado presenta la máxima expresión de entre las localizaciones analizadas tanto de CNT1 como de CNT2, mientras que aparecen niveles difícilmente detectables de CNT3. Transportadores ENT2 y ENT3 aparecen pero con baja expresión relativa y la de ENT1 es casi nula (Lu y cols., 2004).

2.4. Efectos de los nucleótidos a nivel gastrointestinal

2.4.1. Efectos sobre el desarrollo y funcionalidad gastrointestinal

Son numerosos los estudios que señalan a los nucleótidos exógenos como elementos importantes para el normal desarrollo gastrointestinal. En ensayos con ratas recién nacidas que se alimentaron con una dieta que contenía un 0,8 % en peso de nucleósidos, al compararlas con animales tratados con una dieta sin nucleósidos se observó un incremento en la cantidad total de proteína y ADN de la mucosa, mayor actividad de disacaridasas y mayor altura de las vellosidades intestinales (Uauy y cols., 1990). En ratones,

con una dieta suplementada con el 0,21 % en peso de nucleótidos, se determinó un incremento del porcentaje del peso del intestino delgado respecto a la masa corporal total y de la relación peso/unidad de longitud (Carver, 1994).

La ausencia de nucleótidos en la dieta de ratas adultas produce una reducción, en la región apical de las vellosidades intestinales, del contenido y de la actividad de enzimas marcadoras de la diferenciación enterocítica: fosfatasa alcalina, maltasa, sacarasa, lactasa y aminopeptidasa (Ortega y cols., 1995a) y de las cuatro últimas en ratas envejecidas (Ortega y cols., 1995b) . Por otro lado se reduce la síntesis de proteínas, la concentración de ADN (Lopez-Navarro y cols., 1996) y se produce un dramático descenso de la concentración intestinal de ARN, destacando la reducción de los niveles de ARNm específicos de enzimas que forman parte de las rutas de recuperación de purinas, como son la hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa y la adenina fosforribosil transferasa (Leleiko y cols., 1987). Posteriormente se corroboró la caída del primer enzima, ante la indisponibilidad de nucleótidos exógenos, tanto in vivo como in vitro (Walsh y cols., 1990).

En ratas, el ayuno produce un incremento en la expresión del transportador CNT1 específico de tejido, apareciendo un importante aumento tanto en el intestino delgado como en el corazón. Lo mismo sucede cuando se eliminan de la dieta los nucleótidos, por lo que se determina que la disponibilidad de sustrato modula la expresión del transportador (Valdes y cols., 2000). Estos hallazgos soportan la idea de que los nucleótidos de la dieta pueden ejercer un control directo sobre la expresión génica.

Bajo condiciones de nutrición parenteral total, se produce una atrofia y deterioro tanto de la estructura como de la funcionalidad de la mucosa intestinal. Animales que bajo estas condiciones reciben una mezcla de nucleótidos y nucleósidos experimentan un mejor crecimiento de la mucosa intestinal asociado a un aumento en la actividad proliferativa de las células de la cripta, e igualmente se observa un incremento en la maduración de dicha estructura (Tsujiyaka y cols., 1993), por otro lado se determina también un

mayor contenido de proteínas y ADN, junto con un incremento en la altura de las vellosidades intestinales (Iijima y cols., 1993; Tsujinaka y cols., 1999). Estos resultados muestran que el aporte de la mezcla de nucleósidos y nucleótidos podría compensar a nivel intestinal, la ausencia del aporte de nucleótidos por los alimentos y la escasa tasa de síntesis de novo.

La arteria mesentérica superior abastece la porción inferior del duodeno, el resto del intestino delgado y la mitad derecha del colon. La gran dependencia del flujo sanguíneo intestinal sobre un solo vaso implica que cambios en el flujo sanguíneo de la citada arteria pueden tener importantes efectos intestinales. Özkan y cols. caracterizaron hemodinámicamente, mediante el empleo de ultrasonidos Doppler, los cambios producidos en el flujo de sangre en la arteria mesentérica superior en recién nacidos alimentados con leche materna, con una fórmula infantil suplementada con nucleótidos o con una fórmula sin suplementar. El grupo alimentado con la fórmula suplementada con nucleótidos presentó mayor velocidad y volumen sanguíneo en el flujo postprandial que los otros dos tratamientos (Ozkan y cols., 1994). Posteriormente Carver y cols. realizaron el estudio en bebés prematuros y concluyeron igualmente que la suplementación con nucleótidos en las fórmulas infantiles produce un incremento en la velocidad del flujo de la arteria mesentérica superior (Carver y cols., 2002). Estos datos fueron corroborados con bebés alimentados con las fórmulas suplementadas a más largo plazo (Carver y cols., 2004)

2.4.2. Efectos sobre la recuperación intestinal ante situaciones fisiopatológicas.

Los nucleótidos pueden tener un importante papel en la reparación del daño intestinal. En modelos experimentales de diarrea crónica, producida por la ingesta de una dieta enriquecida por lactosa, la recuperación con nucleótidos produce una mejora en la estructura y ultraestructura del intestino respecto a los animales que no recibieron la suplementación de nucleósidos (Bueno y cols., 1994). Por otro lado, la alimentación de bebés con fórmulas infantiles

suplementadas con nucleótidos reduce la incidencia de diarrea en ambientes desfavorecidos (Brunser y cols., 1994).

2.4.3. Efectos sobre la flora intestinal

La flora intestinal es un complejo ecosistema cuya composición se ve influenciada por diversos factores como la edad del hospedador, estado de salud, dieta y adaptación de las respectivas especies de microorganismos. Una de las más importantes funciones de la flora es la de funcionar como una barrera contra la implantación de microorganismos patógenos. Los bebés son inicialmente colonizados por enterobacterias y cocos gram-positivos, los cuales constituyen un ambiente que favorece el establecimiento de especies como Bifidobacterias y otras especies como Bacteroides y Clostridium alrededor de una semana tras el nacimiento. Tanto en bebés alimentados exclusivamente con leche materna (Ventura y cols., 2004) como en otros que reciben fórmulas infantiles suplementadas con nucleótidos (Gil y cols., 1986), se ha comprobado que se favorece el crecimiento y predominio de las Bifidobacterias, lo que impide la proliferación de especies patógenas como Bacteroides y Clostridium. Se han descrito diferentes mecanismos que esclarecen la actividad antimicrobiana de las bifidobacterias, así, se sabe que producen una inhibición competitiva de la adhesión de los patógenos. También se ha comprobado la capacidad de éstas bacterias para producir bacteriocinas, que son péptidos y proteínas con actividad antimicrobiana (Servin, 2004).

2.5. Efectos hepáticos

El hígado es un órgano que presenta gran capacidad de síntesis de novo de nucleósidos, liberando además purinas y pirimidinas al torrente sanguíneo, que quedan disponibles para ser captados y utilizados por otros órganos como la mucosa intestinal. Sin embargo, es un órgano muy eficiente en la captación de nucleósidos de la sangre (Arnaud y cols., 2003).

En modelos experimentales donde se produce un 70% de hepatectomía en ratas, la administración parenteral de una mezcla de nucleósidos y nucleótidos condujo a una mejora en el balance metabólico del nitrógeno, incrementándose la síntesis y el recambio proteico (Ogoshi y cols., 1989), sin apreciarse efectos desfavorables en la sangre y orina respecto al incremento de metabolitos, procedentes de la rutas para la degradación de las purinas y pirimidinas (Ogoshi y cols., 1985). En otros modelos experimentales de daño hepático inducido por la administración de D- galactosamina, la administración de nucleótidos y nucleósidos mejora la funcionalidad y restauración del órgano (Ogoshi y cols., 1988).

La administración oral de tioacetamida en ratas conduce a un cuadro de cirrosis hepática, caracterizado por una drástica reducción en el porcentaje de células binucleadas, presencia de nódulos parenquimáticos regenerativos irregulares, aparición de septos fibrosos que dividen parcialmente los lóbulos hepáticos, amplia extensión de necrosis que progresivamente va desplazando al parénquima hepático y proliferación de los conductos biliares (Torres, 1994). La recuperación con nucleótidos parece tener un efecto muy relevante en la reconstitución citológica e histológica, caracterizada por el aumento significativo en el porcentaje de binucleación, favoreciendo además la restauración de características ultraestructurales normalizadas de los hepatocitos, la reducción del depósito de material fibroso y de los septos fibrosos lobulares, así como la mejora en la reducción en el grado esteatosis (Torres-Lopez y cols., 1996; Torres y cols., 1997; Torres y cols., 1998).

En situaciones no patológicas del hígado, los nucleótidos afectan a la concentración de ARN, de manera que la administración de una dieta sin nucleótidos produce una reducción de la concentración similar a la aparecida en condiciones de ayuno (Lopez-Navarro y cols., 1997). Por otro lado, los nucleótidos también parecen afectar a la síntesis proteica, niveles de ribosomas y polisomas (Lopez-Navarro y cols., 1996), al mantenimiento del “pool” intracelular de nucleótidos (Lopez-Navarro y cols., 1995), e influir en la

proliferación celular, diferenciación y modulación de la fisiología del hígado (Arnaud y cols., 2003).

2.6. Efectos sobre el sistema inmune

En bebés alimentados con leche materna o con fórmulas infantiles suplementadas con nucleótidos, la actividad de las células “natural Killer” y la producción de Interleucina-2 tras la estimulación de células mononucleares fue mayor que en bebés alimentados con fórmulas no suplementadas (Carver y cols., 1991). En bebés prematuros alimentados con fórmulas suplementadas con nucleótidos se observó una concentración de IgG frente a la beta-lactoglobulina que los no suplementados (Martinez-Augustin y cols., 1997). Estos resultados indican que la presencia de nucleótidos podría contribuir a la mejora de la capacidad inmunológica de los bebés (Figura5).

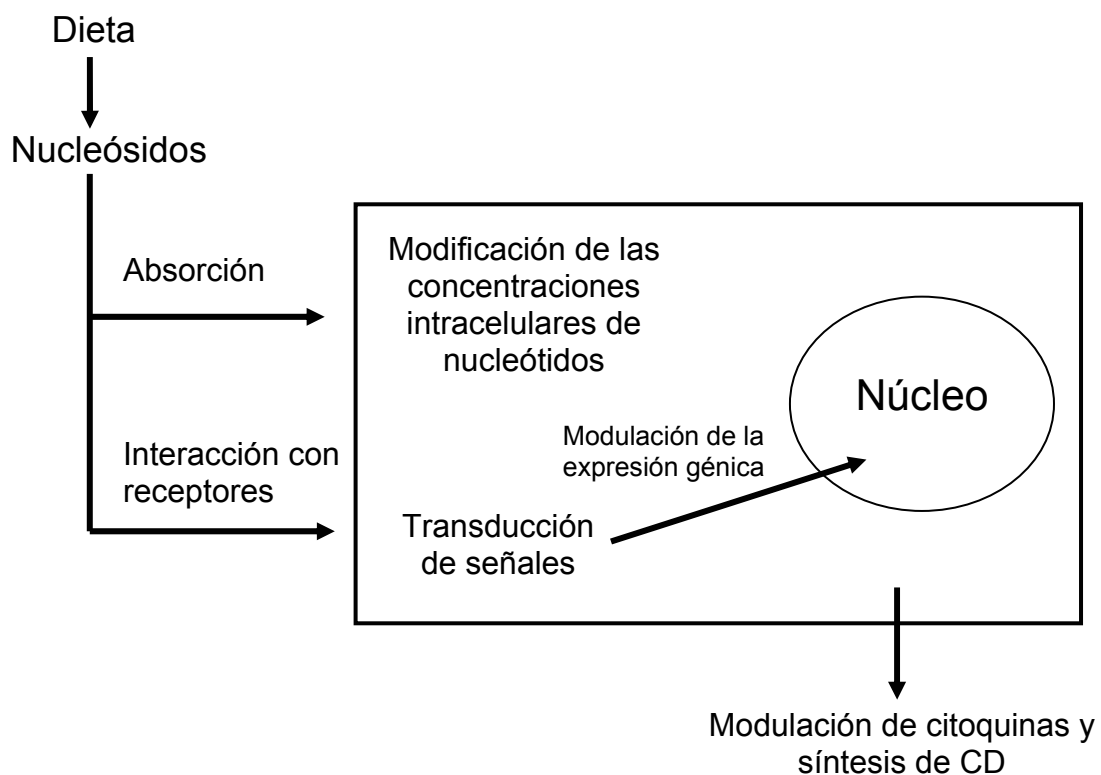


Figura 5. Mecanismo de acción, propuesto por Gil, de los nucleótidos de la dieta sobre los enterocitos y linfocitos intestinales (Gil, 2002)

2.7. Otros efectos

Los efectos de ciertas mezclas de nucleótidos y nucleósidos sobre la recuperación del miocardio tras un ensayo de inducción de hipoxia refleja como se consiguen unos niveles de contractilidad muchos más próximos a la situación control que los no recuperados con las mezclas (Iwasa y cols., 2000), preservando además el perfil nucleotídico, y atenuando las alteraciones del metabolismo de los hidratos de carbono producidos en las situaciones isquémicas (Okazaki y cols., 1997)

La administración de tioacetamida produce severas alteraciones del perfil de ácidos grasos plasmáticos (Fernandez y cols., 1996), que los nucleótidos de la dieta contribuyen a corregir (Fontana y cols., 1998).

3. CICLO CELULAR

Las células se reproducen por división dando dos células hijas, donde cada una podrá a su vez realizar otro ciclo de división. La división es un proceso que conlleva una cuidadosa regulación y coordinación con el proceso de crecimiento celular y replicación del ADN con objeto de garantizar la transmisión de la información genética a las células hijas de forma correcta. El ciclo celular se define como el proceso que transcurre entre el término de una división celular y el final de la división siguiente. La proliferación celular posibilita el crecimiento de órganos y tejidos, así como la regeneración de estructuras dañadas o que simplemente están sujetas a un cronológico recambio por nuevas células. No obstante, no todas las células de un organismo adulto presentan la misma capacidad de división celular, sino que el camino de la diferenciación y especialización celular lleva asociado una progresiva pérdida del potencial proliferativo (Cooper y cols., 2004).

En eucariotas superiores, la división de las células es un proceso coordinado con las necesidades del organismo como un todo, por lo que

defectos existentes en la regulación del ciclo celular dan lugar a la proliferación anormal de las células como ocurre en el caso de los tumores y el cáncer.

El ciclo celular eucariota respecto a la síntesis del ADN se puede dividir en cuatro fases: la mitosis donde se produce la división celular, la fase G1, comprendida entre la mitosis y la síntesis del ADN, es período muy activo metabolitamente donde la célula va creciendo de tamaño, posteriormente aparece la fase de síntesis (S) donde se produce la síntesis de ADN y ADN-polimerasa. Durante la fase G1 y S existen niveles altos de enzimas para la biosíntesis de purinas y pirimidinas. Además, en la fase S muchas de las enzimas involucradas en la interconversión de nucleótidos se encuentran muy expresadas (Carver y cols., 1995). Es una fase fácilmente identificable ya que dada las altas tasas de incorporación de timidina para la síntesis de ADN, se pueden localizar las células en dicha fase mediante el empleo del nucleósidos radioactivo. Después de la fase de síntesis prosigue la fase G2, en la que continúa el crecimiento celular y se sintetizan proteínas para la preparación de la mitosis. Para una célula tipo con un ciclo celular de 24 horas, la fase G1 se tardaría en completar en una media de 11 horas, siendo la más larga y la que tiene duraciones más variables, la fase S tendría 8 horas, la G2 4 horas y la mitosis 1 hora.

Existen algunos tipos celulares que cesan la división para entrar en una fase de reposo denominada G0, en la que permanecen metabolitamente activos pero no proliferativos. Esto es característico de células encargadas de reemplazar otras que se han perdido debido al recambio tisular, lesión o muerte celular (Cooper y cols., 2004).

En la mitosis se concatenan dos procesos: la cariocinesis o división del núcleo y la citocinesis tras lo que la célula queda dividida en dos células hijas portando cada una de ellas un paquete genético igual.

A lo largo del ciclo celular existen puntos de control denominados puntos de restricción o checkpoints a través de los cuales la célula va a ser capaz de

detectar daños en el ADN y respondiendo con el retraso en la progresión en el ciclo celular o el bloqueo definitivo (Lukas y cols., 2004). El conocimiento de estos puntos de control es muy importante ya que nos permiten conocer los mecanismos implicados en la proliferación de células normales, y del mismo modo, la comparación de las modificaciones producidas en las células tumorales proporciona información relativa a la predisposición al cáncer y al posible diseño de estrategias para su tratamiento (Dash y cols., 2004).

Los principales puntos de control en los mamíferos se sitúan en la transición de las fases G1/S, G2/M y en la fase de síntesis. De forma análoga a otros sistemas de transducción de señales, los checkpoint constan de cuatro componentes que son: sensores como ATM, Hus 1, Rad 1, 9 y 17, mediadores como MDC1y 53BP1, transductores de señales como las kinasas chk1 y 2, y moléculas efectoras como el p53 y Cdc25. Aunque algunos componentes como ATM son capaces de funcionar como sensores de daño y como transductor de señales (Sancar y cols., 2004).

4. APOPTOSIS

En los organismos pluricelulares existen dos grandes mecanismos que conducen a la muerte celular. La necrosis, es un proceso de muerte celular traumática donde se produce la liberación del contenido citoplasmáticos y nuclear en el medio intercelular, apareciendo una respuesta inflamatoria. Por el contrario la apoptosis, que fue definida inicialmente como un tipo de muerte celular diferente en base a características morfológicas (Kerr y cols., 1972), es un proceso en el que tras una sucesión de reacciones en cascada se acaba con la eliminación de la célula sin producción de respuesta inmunológica y sin interferir en el normal transcurso del tejido (Vaux, 1993).

La apoptosis, a diferencia de la necrosis, es un proceso controlado genéticamente. Existen diferentes estímulos capaces de inducir apoptosis, como falta de factores que determinen la supervivencia, defectos metabólicos,

déficit de oxígeno, daño físico o químico y estimulación de receptores de muerte celular de superficie, a partir de diferentes ligandos, como ocurre con el receptor y ligado Fas.

Las mitocondrias juegan un papel muy importante en el desencadenamiento de la apoptosis. Inicialmente, ciertos cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial conducen a la liberación de citocromo C. Este hecho produce una secuencia de acontecimientos en los que se activan unas proteasas denominadas caspasas, que llevan a cabo la degradación de diferentes componentes celulares como las ADN topoisomerasas I y II, la activación de endonucleasas que producen la fragmentación del ADN y la externalización de fosfatidilserina en la membrana citoplasmática. Todos estos efectos son los responsables de las características morfológicas típicas de las células apoptóticas. La unión del ligando con el receptor Fas produce la activación de la caspasa 8, que puede realizar dos funciones. Por un lado pueden inducir la liberación de citocromo C por parte de las mitocondrias, o bien la activación de otras caspasas que de igual modo son activadas a partir de los efectos inducidos en las mitocondrias (Ramachandran y cols., 2000).

Las proteínas Bcl-2 reciben el nombre de anti-apoptóticas debido a que bloquean la liberación de citocromo c por parte de las mitocondrias. En contraposición, otra proteína de la misma familia denominada Bax, es categorizada como pro-apoptótica debido a la inducción de la liberación de citocromo C producida por su translocación desde el citosol a la mitocondria durante la apoptosis.

Si bien la apoptosis es un mecanismo para el mantenimiento del normal funcionamiento del tracto gastrointestinal, la mala regulación del proceso es un factor común en diversas situaciones patológicas (Ramachandran y cols., 2000). Entre los factores que parecen influir la apoptosis se encuentran las poliaminas, ya que una reducción artificial conduce a la resistencia frente a la apoptosis, mediado por una enzima involucrada en el proceso apoptótico, la serin-treonín kinasa (Akt), que produce la inhibición de la caspasa-3 (Zhang y

cols., 2004). Además, el grado de diferenciación de los enterocitos los hace ser más sensibles a la apoptosis frente a determinadas agresiones externas, como puede ser la hipoxia (Hinnebusch y cols., 2002).

5. 5-FLUOROURACILO.

El 5-fluorouracilo (5-Fu) es una molécula que presenta gran actividad antineoplásica tanto a nivel de tejido mamario como gastrointestinal. Es un antimetabolito de las bases pirimidínicas que se diferencia estructuralmente del uracilo por la existencia de un átomo de flúor en posición 5. Para que la droga pueda ejercer sus efectos es necesaria una previa transformación hacia la forma de nucleótido (Pinedo y cols., 1988). Inicialmente la enzima timidina-uridina fosforilasa cataliza el paso del 5-Fu a 5-fluoro-2'-desoxiuridina. Posteriormente la enzima desoxitimidina kinasa transforma el 5-fluoro-2'-desoxiuridina a 5-fluoro-2'-desoxiuridin monofosfato (FdUMP). Alternativamente el 5-Fu puede ser transformado en fluoro-uridín monofosfato (FUMP) por diferentes vías como la realizada por las enzimas orotato o uracilo fosforribosiltransferasa. El FdUMP produce la inhibición de la enzima timidilato sintasa.

El complejo timidilato sintasa está constituido por tres enzimas que constituyen un ciclo cerrado de reacciones: timidilato sintasa, que cataliza la transformación de dUMP en dTMP, dihidrofolato reductasa, encargada de la reducción de hidrofolato hacia tetrahidrofolato, y la enzima serin-hidroximetil transferasa, que transfiere un grupo metileno procedente de la serina al tetrahidrofolato para constituir N⁵, N¹⁰- metileno-tetrahidrofolato, que es convertido en dihidrofolato por la enzima timidilato sintasa para la transformación del dUMP, cerrándose el ciclo de reacciones (Hatse y cols., 1999).

OBJETIVOS

Los objetivos planteados en el presente trabajo de investigación han sido:

- Analizar el efecto de los nucleósidos exógenos sobre la proliferación de las células epiteliales intestinales IEC-6.
- Evaluar la idoneidad de un modelo de inducción de la diferenciación en células IEC-6 basado en el grado de confluencia celular.
- Valorar la acción de los nucleósidos exógenos sobre la diferenciación de las células epiteliales IEC-6.
- Evaluar los efectos de los nucleósidos exógenos en un cuadro de agresión epitelial producido por el tratamiento con el fármaco antitumoral 5-Fluorouracilo sobre células IEC-6.
- Analizar la absorción de los nucleósidos exógenos en las células IEC-6, así como establecer la ruta intracelular de incorporación de dichos nucleósidos.

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- CONDICIONES DE CULTIVO

1.1. Línea celular

La línea celular de elección para el desarrollo de los diferentes ensayos fue la IEC-6 (Referencia ATCC, CRL 1592), obtenida a través del servicio de cultivos celulares del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, en el pase 17. Los pases utilizados en los ensayos fueron del 18 al 25.

1.2. Mantenimiento del cultivo

Los cultivos de células se realizaron en cabina de flujo laminar (Micro-V, Telstar, España) bajo condiciones de esterilidad. Los frascos de cultivo estériles Falcon (25 o 75 cm², Corning Costar) se mantuvieron en estufa a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂ y 90% de humedad.

Para el cultivo se utilizó el medio Dubelcco`s Eagle modificado (DMEM) (Gibco, USA) (13,37 gr de medio base), suplementado con 5% de suero fetal bovino inactivado (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA) en calor húmedo a 56°C durante 30 minutos. El medio fue tamponado con 27 ml de NaHCO₃ al 7,5%, y 10 ml buffer Hepes (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA) 1M pH 7,2 y suplementado con 40 mg/l de gentamicina (Antibióticos S.A), 500 mg/l de ampicilina (Antibióticos S.A), 10 ml de L-glutamina (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA) 200 mM, 0,1 IU/ml de Insulina bovina (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA) y agua bidestilada, c.s.p. hasta 1000 ml. Una vez preparado el medio de cultivo fue filtrado con filtros Millex estériles de 0,22 µm (Millipore, France) y añadido a los frascos.

Durante el cultivo celular las células tuvieron que ser resembradas en nuevos Falcon conforme se alcanzaba la confluencia. Para ello se siguió el siguiente protocolo:

- Desechar el medio de cultivo.
- Lavar dos veces con PBS (Tampón salino de fosfato, Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA), con un volumen de 0,2 ml/ cm². Se añade por el lado contrario al de las células para evitar despegarlas prematuramente. Con este paso se descartan las trazas de suero que son capaces de inhibir la acción de la tripsina.
- Añadir 0,1 ml/ cm² de tripsina-EDTA (0,25 % Tripsina, 0,02 % EDTA en PBS, Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA). Inicialmente se dispone por el lado opuesto a las células para posteriormente girar el frasco. Cubrir la superficie de células durante unos 15-30 segundos. Retirar el volumen de tripsina dejando unas gotas.
- Incubar durante 10 minutos a 37°C en estufa de CO₂.
- Añadir medio de cultivo fresco 0,1-0,2 ml/ cm² y dispersar los agregados celulares con ayuda de una pipeta pasteur.
- Centrifugar a 600 x g durante 5 minutos.
- Lavar dos veces con medio estéril completo.
- Resuspender el pellet de células en medio de cultivo estéril y tras realizar un conteo con cámara de Neubauer, diluir hasta obtener una concentración de 2 x 10⁴ células / ml.
- Sembrar en nuevos falcon.

1.3 .Método de congelación celular

Para la congelación celular, las células fueron despegadas de la superficie de los Falcons mediante el protocolo descrito anteriormente, hasta obtener un pellet celular que fue resuspendido en medio de congelación a razón de 0,5 x 10⁶ células por ml, siendo introducidas inmediatamente en criotubos y estos en el congelador a -80°C durante 24 h, para posteriormente ser almacenadas definitivamente en nitrógeno líquido.

El medio de congelación empleado estaba constituido por suero fetal bovino (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA) inactivado en calor húmedo a 56°C durante 30 min, y dimetil sulfóxido (DMSO) al 10%.

1.4. Método de descongelación celular

Los pasos que se siguieron para la descongelación de la línea celular fueron:

- Tomar el criotubo del contenedor de nitrógeno líquido.
- Introducirlo en una cubeta conteniendo agua a 37 °C.
- Una vez descongelado el criotubo enjuagar con alcohol de 70% y abrirlo en condiciones de esterilidad.
- Resuspender las células en medio de cultivo estéril a 37°C
- Lavar dos veces para eliminar los restos de DMSO.
- Resuspender el pellet de células en medio de cultivo estéril y tras realizar un contaje con cámara de Neubauer, diluir hasta obtener una concentración de 2×10^4 células / ml.
- Sembrar en frascos de cultivo.

2.- NUCLEÓSIDOS

Los medios de cultivo que se emplearon en los diferentes ensayos se caracterizaron por tener o no una suplementación con nucleósidos y por ser medios de bajo contenido en suero fetal bovino.

El medio de cultivo experimental estaba formado por medio Dubelcco's Eagle modificado (DMEM) (Gibco, USA) (13,37 gr de medio base), tamponado con 27 ml de NaHCO₃ al 7,5%, y 10 ml buffer Hepes (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA) 1M pH 7,2 y suplementado con 40 mg/l de gentamicina (Antibióticos S.A), 500 mg/l de ampicilina (Antibióticos S.A), 10 ml de L-glutamina (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA) 200 mM, 0,1 IU/ml de

Insulina bovina (Sigma, SL) y agua bidestilada, c.s.p. hasta 1000 ml. A esta composición se la denominó medio base experimental, sobre la que se adicionaron o no nucleósidos. Una vez preparado el medio de cultivo fue filtrado con filtros Millex estériles de 0,22 μm (Millipore, France) y añadido a los frascos.

La presencia en el suero fetal bovino de elementos de bajo peso molecular como nucleósidos era indeseable, ya que hubiesen enmascarado los efectos de los nucleósidos exógenos que se adicionaron a los respectivos medios de cultivo experimentales. Por ello, se utilizó suero fetal bovino dializado (Gibco, Invitrogen Corporation), obtenido mediante la diálisis de suero fetal bovino con una membrana que elimina las moléculas de menos de 10.000 unidades de masa atómica.

La utilización de suero en el cultivo celular presenta una serie de desventajas como la presencia de componentes minoritarios que pueden afectar al crecimiento celular incrementándolo o disminuyéndolo, variación entre lotes diferentes, etc. Por todo ello, para conseguir un mayor grado de estandarización en la experimentación con cultivos celulares se requiere del empleo de medios más definidos (Freshney, 2000). En este sentido, la cantidad de suero fetal dializado que se utilizó en los respectivos medios de cultivo experimentales se redujo de un 5% que contiene el medio de mantenimiento de la línea IEC-6 a un 0,5%. En su lugar se introdujo 1 $\mu\text{l/ml}$ de un suero reemplazante denominado Mito+™ (Becton Dickinson Labware). Consiste en una fórmula concentrada de hormonas, factores de crecimiento y otros factores requeridos para el mantenimiento óptimo de células en las que se emplea un reducido nivel de suero. Contiene transferrina, factor de crecimiento epidérmico, insulina, suplemento para el crecimiento celular endotelial, triyodotironina, hidrocortisona, progesterona, testosterona, estradiol, ácido selénico y fosforiletanolamina.

Los nucleósidos que se utilizaron en los medios de cultivo experimentales fueron: timidina, uridina, citidina, guanosina e inosina (Sigma

Chemical co., St. Louis, MO, USA). Se establecieron dos mezclas de nucleósidos en cuya composición variaba exclusivamente la presencia de timidina o uridina respectivamente. La elección de dichas combinaciones de nucleósidos se debió a que son los nucleósidos que generalmente aparecen en el plasma, y la segregación de la uridina y timidina se realiza con el fin de contemplar de manera asilada el comportamiento de los grupos de nucleósidos que forman parte del ADN y ARN. El nucleósido de adenina es sustituido por inosina debido a la gran cantidad de efectos hormonales que presenta el primero, a través de la interacción con receptores específicos de membrana, que en definitiva hubiesen podido enmascarar los efectos de los nucleósidos (Jimenez y cols., 2000). La composición de las mezclas fue:

Mezcla NT: timidina, citidina, guanosina e inosina.

Mezcla NU: uridina, citidina, guanosina e inosina.

La concentración empleada en los ensayos fue generalmente de 100µM final de cada nucleósido en la respectiva mezcla. Estas condiciones han sido utilizadas por otros autores, siendo consideradas como concentraciones de rango fisiológico (Arnaud y cols., 2003; Arnaud y cols., 2004; Saez-Lara y cols., 2004).

Los grupos experimentales que se utilizaron en los ensayos fueron:

- **Grupo control (C):** Medio base + 0,5% Suero fetal bovino dializado + 1 µl/ml Mito+TM.
- **Grupo NT:** Medio base + 0,5% Suero fetal bovino dializado + 1 µl/ml Mito+TM + mezcla de nucleósidos NT con 100 µM de cada nucleósido.
- **Grupo NU:** Medio base + 0,5% Suero fetal bovino dializado + 1 µl/ml Mito+TM + mezcla de nucleósidos NU con 100 µM de cada nucleósido.

En ensayos donde se necesitaron concentraciones más bajas de nucleósidos se llevó a cabo la dilución de los medios de cultivo NT y NU con los nucleósidos a 100 μ M, con medio del grupo control hasta obtener la concentración deseada.

En todos los ensayo se realizó un cambio de medio de cultivo experimental cada 12 horas con la finalidad de mantener una continuada disponibilidad de los nucleósidos por parte de las células del cultivo.

3.- CONDICIONES EXPERIMENTALES

Para la realización de los ensayos se consideraron diferentes condiciones experimentales:

Condiciones de baja densidad celular: en estos ensayos las células iec-6 fueron sembradas con una densidad de 5.000 células / cm². De esta manera se consiguió que la relación entre la superficie de cultivo y la densidad celular fuera muy alta, permitiéndonos valorar los efectos de los nucleósidos sobre la proliferación celular. Las células fueron sembradas a una densidad de 5.000 células / cm² en placas de 24 pocillos o falcons de 75 cm². Transcurridas 24 horas, para eliminar posibles restos de suero, se realizaron dos lavados con medio de mantenimiento en el que no se había adicionado suero fetal bovino. Posteriormente se puso el medio de cultivo experimental correspondiente y se llevó a la estufa de CO₂.

Condiciones de alta densidad celular: en estos ensayos las células iec-6 fueron sembradas a 100.000 células / cm². En estos casos los ensayos partieron de una situación de confluencia celular, con el fin de que se estimulara el proceso de diferenciación celular (Ametani y cols., 1996; Wood y cols., 2003). Las células fueron sembradas a una densidad de 100.000 células / cm² en placas de 24 pocillos o falcons de 80 cm². Transcurridas 24 horas, para eliminar posibles restos de suero, se realizaron dos lavados con medio base en

el que no se había adicionado suero fetal bovino. Posteriormente se puso el medio de cultivo experimental correspondiente (control, NT o NU) y se llevó a la estufa de CO₂.

Ensayos de recuperación epitelial frente al tratamiento con 5-fluorouracilo: en estos ensayos, se buscó determinar el efecto de los nucleósidos adicionados al medio sobre la evolución del cultivo celular donde se había producido una agresión quimioterápica con 5-fluorouracilo. La densidad celular utilizada fue de 5.000 células/cm². Las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos o falcons de 75 cm². Transcurridas 24 horas, se realizó un pretratamiento con 5-fluorouracilo que consistió en la incubación de las células durante 1 hora en estufa de CO₂ a 37°C con medio de cultivo de mantenimiento, conteniendo una concentración de 1mM de 5-fluorouracilo (Hirata y cols., 2003). Después se realizaron dos lavados con medio base sin suero fetal bovino, con el fin de eliminar restos de suero y de 5-fluorouracilo. Posteriormente se puso el medio de cultivo experimental correspondiente (control, NT o NU) y se llevó a la estufa de CO₂.

4. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN

4.1. Curva de crecimiento

Las curvas de crecimiento se realizaron durante 7 días en placas de 24 pocillos, de manera que cada día se tomaron muestras de todos los tratamientos experimentales y se procesaron para la determinación del número total de células, con la tinción con sulforrodamina B (SRB) mediante el siguiente protocolo (Papazisis y cols., 1997):

- Aspirar el medio de cultivo.
- Adicionar 300 µl tricloacético (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA) al 10% frío (4°C). Dejar en la nevera a 4°C durante 30 minutos.
- Lavar 3 veces con agua destilada.

- Dejar secar a temperatura ambiente durante al menos 24 horas.
- Añadir 500 μ l de SRB al 0.4% en ácido acético al 1%. Dejar 20 minutos a temperatura ambiente.
- Eliminar SRB y lavar tres veces con ácido acético al 1%.
- Dejar secar a temperatura ambiente en oscuridad.
- Solubilizar la SRB fijada a las células con 500 μ l de una solución 10mM Tris-base (pH 10.5) con agitación suave.
- Alícuotas de 100 μ l se transfirieron a placas de 96 pocillos por triplicado y se leyeron en un colorímetro Titertek multiscan a 492 nm.

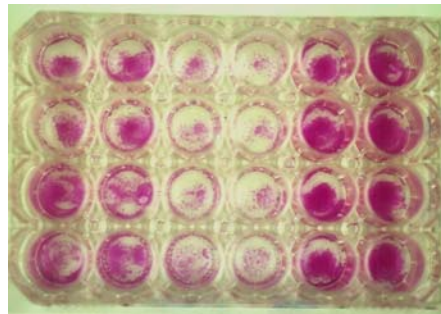


Figura 6. Imagen de una placa de 24 pocillos teñida con Sulforrodamina B. Se observa claramente los pocillos con menor densidad celular, ya que aparecen menos coloreados

Los valores de densidades ópticas obtenidas en el Titertek fueron transformados en el correspondiente valor de número de células mediante el empleo de una recta de regresión ajustada anteriormente, considerando valores conocidos de número de células y sus densidades ópticas resultantes. El programa estadístico utilizado para la realización de la recta de regresión fue el Statgraphics plus para Windows v.5.1, (Statistical Graphics Corp, 2000)

La curva de crecimiento de las células IEC-6 respecto a las concentraciones crecientes de los medios experimentales, se realizó al cabo de 7 días contados a partir de las 24 horas posteriores a la siembra, en placas de 24 pocillos y fueron procesadas del mismo modo descrito anteriormente.

4.2. Determinación del número de células mediante cámara de Neubauer

El protocolo seguido para la determinación del número total de células mediante el empleo de cámara de Neubauer fue el siguiente:

- Desechar el medio de cultivo.
- Lavar dos veces con PBS (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA), con un volumen de 0.2 ml/ cm².
- Añadir 0.1 ml/ cm² de tripsina-EDTA (0.25 % Tripsina, 0.02 % EDTA en PBS, Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA). Cubrir la superficie de células durante unos 15-30 segundos. Retirar el volumen de tripsina dejando unas gotas.
- Incubar durante 10 minutos a 37°C en estufa de CO₂.
- Añadir medio de cultivo fresco 0.1-0.2 ml/ cm² y dispersar los agregados celulares con ayuda de una pipeta pasteur.
- Centrifugar a 600 x g durante 5 minutos.
- Resuspender el pellet de células hasta un volumen conocido con medio de cultivo.
- Llenar la cámara provista en el portaobjetos de Neubauer con la suspensión celular, teniendo cuidado de no llenar en exceso ni de introducir burbujas de aire.
- Colocar el portaobjetos en el microscopio a una magnificación 100 x y realizar el conteo de las cuatro cuadrículas laterales y la central.
- Para la determinación de la viabilidad celular, diluir previamente al conteo, una muestra de suspensión celular con azul tripan 0.4%, a una relación de volumen 1:5. Las células inviables presentan una coloración azul, y las viables no. Este dato tiene que ser considerado para el cálculo del número de células por ml, ya que la adición de azul tripan es un factor de dilución de la suspensión celular original.
- Determinar el número de células/ml y el número total de células en el volumen total conocido de la suspensión celular en base a las siguientes expresiones matemáticas

$$\text{células/ml} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de células contadas}}{\text{N}^{\circ} \text{ de cuadrículas contadas}} \times 10^4 \times \text{factor de dilución}$$

$$\text{total células} = \text{células/ml} \times \text{volumen original conocido}$$

5. ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DEL CICLO CELULAR

Para el estudio de la distribución del ciclo celular en los diferentes cultivos analizados, se llevó a cabo el siguiente protocolo:

5.1. Fijación de las células

La capa de células fue levantada siguiendo el protocolo descrito para la determinación del número de células mediante cámara de Neubauer (punto 4.2 del apartado material y métodos). Para ello se sustituyó el tampón PBS en el lavado por una solución tampón. De la suspensión celular se tomó un millón de células por cada tratamiento que fueron dispuestas en tubos Facs respectivamente. Las células se lavaron dos veces por centrifugación durante 10 minutos a 400 x g. con la solución tampón y fueron fijadas después en 1 ml de etanol al 70% frío (-20°C) toda la noche a 4°C.

La solución tampón estaba constituida por: 1 gr. de glucosa en 1 litro de solución salina de fosfato (PBS) sin iones Ca^{++} ni Mg^{++} .

5.2. Tinción de las células

La tinción de las células se realizó utilizando una solución de yoduro de propidio (PI) que contaba con: 50 µg/ml de PI, 100 U/ml de RNasa en la solución tampón, pH 7.4.

Las células fueron centrifugadas a alta velocidad (3000 rpm) durante 5 minutos, lavadas 2 veces con la solución tampón, resuspendidas y teñidas con 1 ml de la solución de yoduro de propidio durante al menos media hora en oscuridad. Las muestras fueron leídas dentro de las 24 horas posteriores a la tinción con yoduro de propidio.

Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo por FACScan usando un citómetro de flujo "VANTAGE" (Becton Dickinson, San José, CA, USA) del servicio de citometría de flujo, del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, que dispone del software de análisis de ciclo celular CellFIT.

6. ENSAYO DE VIABILIDAD, NECROSIS Y APOPTOSIS.

Se analizaron los efectos de los nucleósidos, tanto en condiciones normales como ante la recuperación con 5-fluorouracilo, sobre la apoptosis, necrosis y la viabilidad celular de los cultivos. Para ello se utilizó el Kit TACSTM Annexin V-FITC (Pharmingen), que permite la detección de cambios en la superficie celular ocurridos durante la apoptosis.

La anexina V es una proteína que se enlaza a los fosfolípidos cargados negativamente. Durante la apoptosis se produce una pérdida en la asimetría de la distribución de los fosfolípidos, de manera que se exponen las cabezas de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática, que quedan unidas a moléculas de anexina V. Dado que el Kit contiene además yoduro

de propidio, se pudo distinguir finalmente no solo células apoptóticas sino también necróticas y viables.

El protocolo que se siguió fue el siguiente:

- Las células fueron levantadas siguiendo el protocolo descrito para la determinación del número de células mediante cámara de Neubauer (punto 4.2 del apartado material y métodos). De la suspensión celular se tomó medio millón de células por cada tratamiento que fueron dispuestas en tubos Facs respectivamente.
- Las células se lavaron dos veces por centrifugación durante 5 minutos a 500 x g con 500µl de PBS frío (2-8°C) cada vez.
- A continuación cada muestra fue resuspendidas en 100 µl de reactivo de incubación de anexina V que estaba constituido por 1 µl de la solución de anexina V, 10 µl de binding buffer (10x), 10 µl PI (50 µg/ml), 79 µl H₂O. Después las células fueron incubadas en oscuridad durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Finalmente se añadió 400 µl de la solución de binding buffer y se procedió a su análisis por medio del FACScan.

El binding buffer se compone por cada 100 ml: 10 ml de hepes/NaOH 1M (ph 7.4), 3 ml de NaCl 5M, 5 ml de KCl 1M, 1 ml MgCl₂ 1M, 1.8 ml de CaCl₂ 1M y 52.2 ml de agua destilada. Una vez preparado se filtra con filtros Millex estériles de 0,22 µm (Millipore, France) y se conserva de 2 a 8°C. Los reactivos se adquirieron en Sigma (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA).

Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo por FACScan usando un citómetro de flujo "VANTAGE" (Becton Dickinson, San José, CA, USA) del servicio de citometría de flujo, del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

7. ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LAS CÉLULAS

7.1. Microscopía óptica

El análisis morfológico por microscopía óptica se realizó con un microscopio invertido de contraste de fase Nikon TM Phase Contrast-2, ELWD 0.3, que posee un sistema fotográfico para la captación de imágenes.

El estudio se realizó directamente en las células cultivadas sobre el plástico de las placas de 24 pocillos y de los falcons o bien en células dispuestas en placas de 24 pocillos precubiertas por una capa de Matrigel™ (Becton Dickinson, San José, CA, USA). El protocolo utilizado para el recubrimiento de los pocillos con Matrigel™ fue:

- Descongelar el envase de Matrigel™ (10.4 mgr/ml de matriz extracelular de sarcoma Engelbreth-Holm-Swarm de ratón) mateniéndolo de 2-8°C toda la noche, junto con todo el material necesario para la manipulación del mismo, como puntas, placas de cultivo, etc.
- En la cámara de flujo laminar mezclar el contenido del envase para homogeneizar el Matrigel™, manteniendo en todo momento el Matrigel™, las placas y demás utensilios en hielo, para evitar que el Matrigel™ pierda fluidez.
- Añadir 200 µl por cada cm² de pocillo.
- Colocar las placas a 37°C durante 30 minutos.
- Sembrar las células sobre la capa de Matrigel™.

7.2. Microscopía electrónica

7.2.1. Fijación de las células

Los cultivos analizados mediante microscopía electrónica de transmisión fueron tratados de la siguiente forma:

- Lavado de la monocapa de células con PBS frío, tres veces durante 5 minutos cada vez a 4°C.
- Prefijación con glutaraldehído al 2.5 % en tampón cacodilato (0.1 M, pH7.4), 60 minutos a 4°C.
- Lavado con tampón cacodilato (0.1 M, pH7.4), tres veces durante 10 minutos cada vez a 4°C.
- Fijación con tetróxido de osmio (OsO₄, Merk) al 1% en tampón cacodilato (0.1 M, pH7.4), 60 minutos a 4°C.
- Lavado con tampón cacodilato (0.1 M, pH7.4), tres veces durante 5 minutos cada vez a 4°C.
- Deshidratación. Se aplican a las muestras alcoholes crecientes:
 - Etanol 30%, 15 minutos
 - Etanol 50%, 15 minutos
 - Etanol 70% + acetato de uranilo a saturación, 15 minutos
 - Etanol 90%, 15 minutos
 - Etanol 100%, 3 veces 15 minutos cada vez.

Tampón cacodilato 0.1M, pH 7.4. Para 100 ml: Cacodilato 2.14 gr, Cl₂Ca (cloruro calcico) 0.05 gr y sacarosa 1.8 gr. Llevar los pesos hasta 100 de agua destilada y ajustar el pH a 7.4. (Merck, Darmstadt, Germany).

7.2.2. Inclusión de las muestras

Para la inclusión de las muestras se utilizó resina EMBED 812 (Electron Microscopy Science, Hatfield, USA) que proporciona una excelente preservación de las muestras y una gran calidad en la realización de los cortes ultrafinos. Durante varios pasos la resina se aplicó mezclada con etanol en concentraciones crecientes de EMBED, hasta que finalmente se pasaron las muestras a resina pura.

- EMBED : etanol, (1:2), 60 minutos a temperatura ambiente.
- EMBED : etanol, (1:1), 60 minutos a temperatura ambiente.

- EMBED : etanol, (2:1), 60 minutos a temperatura ambiente.
- EMBED puro, toda la noche a 4°C.

Las muestras se transfirieron a moldes en los que se vertió resina EMBED pura. Después se pusieron los moldes en una estufa a 60°C para que se produjese la polimerización de la resina. Por último, las cápsulas de resina polimerizada que contenían las muestras fueron talladas y sometidas a cortes ultrafinos de 60-70 nm de espesor en un ultramicrotomo Ultracut S (Reichert-Jun), utilizando cuchillas de vidrio. Los cortes fueron recogidos en rejillas de cobre de 200 mallas (Electron Microscopy Science, Hatfield, USA).

Para la preparación de la resina se utilizó el Kit EMBED 812 (Electron Microscopy Science, Hatfield, USA) cuya composición, proporciones y protocolo de preparación es:

Mezcla A:

- EMBED 812: 20ml
- DDSA: 31ml

Mezcla B:

- EMBED 812: 20ml
- NMA: 17ml

Se preparan las mezclas A y B por separado. Posteriormente se mezclan y se adiciona 1.3-1.7 ml de DMP-30. DDSA: anhídrido 2-dodecenil succínico; NMA: Anhídrido metil nadic; DMP-30: 2,4,6-tris (dimetil aminometil) fenol.

7.2.3. Método de contraste

El contraste de los cortes se realizó con citrato de plomo y acetato de uranilo (Renau y cols., 1998).

Composición y preparación de las disoluciones:

- Acetato de uranilo: Disolución acuosa de acetato de uranilo al 2%

- Citrato de plomo. Se prepara de la siguiente forma:
 - Citrato sódico: 3.52 gr.
 - Disolver en agua bidestilada 60 ml (recién hervida y enfriada tapada, a temperatura ambiente)

Añadir:

- Nitrato de plomo: 2.66 gr.
- Agitar la suspensión durante 1 minuto y dejar reposar durante 30 minutos con agitaciones cada 5 minutos para conseguir una completa suspensión del nitrato de plomo.

Añadir:

- Hidróxido sódico 1N: 16 ml
- Agua bidestilada: hasta 100 ml.

Las disoluciones se filtran antes de usar a través de un filtro Millipore de 0.22 μm (Millipore, Francia). Ajustar el pH de la solución de acetato de uranilo entre 4 y 5 con NaOH.

Contraste con acetato de uranilo:

- Colocar un fondo de parafilm en una placa de petri pequeña (5cm).
- Colocar tantas gotas de acetato de uranilo como rejillas haya que contrastar.
- Sumergir, o hacer flotar las rejillas (con los cortes hacia abajo) sobre las gotas durante 15 a 30 minutos.
- Lavar con agua destilada, dos veces, y secar con papel de filtro.

Contraste con citrato de plomo:

- Colocar en una placa de petri pequeña (5cm) papel de filtro, y empapararlo con NaOH (Hidróxido sódico), 1N.
- Colocar un trozo de parafilm algo menor que el papel de filtro anterior y ponerlo encima.
- Poner varias pastillas de NaOH a un lado de la placa para eliminar el CO₂ ambiental.
- Con una pipeta pasteur limpia tomar un poco de la disolución de citrato de plomo y colocar unas gotas sobre el parafilm. Cerrar la placa durante 10 minutos.
- Abrir la placa y sumergir la rejilla en la gota durante 1-5 minutos.
- Lavar la rejilla, por inmersión y con agitación, en NaOH, 0.02N unos segundos, y luego dos veces en agua destilada.
- Secar al aire.

Finalmente las rejillas fueron observadas en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM902 perteneciente al servicio de microscopía electrónica del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

8. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA PARA CITOMETRÍA DE FLUJO

En varios ensayos se llevó a cabo el estudio con citometría de flujo de la expresión de dos marcadores característicos de la diferenciación enterocítica.

Los marcadores de interés y los anticuerpos utilizados fueron:

Anticuerpo primario.

Fosfatasa alcalina: Anticuerpo policlonal IgG de cabra frente a la fosfatasa alcalina placentar humana (Santa Cruz Biotechnology, California, USA, sc-15065). El anticuerpo está recomendado por la casa comercial para su uso en la detección de fosfatasa alcalina intestinal de rata tanto por inmunofluorescencia como por Western Blotting. La dilución empleada fue de 1:50.

Villina: Anticuerpo policlonal IgG de cabra frente a la villina humana (Santa Cruz Biotechnology, California, USA, sc-7672). El anticuerpo está recomendado por la casa comercial para su uso en la detección de villina de rata tanto por inmunofluorescencia como por Western Blotting. La dilución empleada fue de 1:50.

Anticuerpo secundario.

Para ambos anticuerpos primarios se empleó un anticuerpo IgG de burro conjugado con fluoresceína frente a IgG de cabra (Santa Cruz Biotechnology, California, USA, sc-2024). Dilución empleada: 1:100.

Para la inmunofluorescencia, las células fueron recolectadas evitando la utilización de tripsina, que hubiera podido producir la proteólisis de marcadores moleculares de interés. En su lugar se utilizó una solución de PBS-EDTA (0.02%). Las células fueron despegadas de los frascos de cultivo utilizando una solución de PBS-EDTA (0.02%), centrifugadas a 600 x g a 4°C y lavadas dos veces con PBS frío. Tras recoger las células por centrifugación a 600 x g durante 5 minutos fueron resuspendidas en PBS.

Las células se contaron en la cámara de Neubauer y se tomó 1×10^6 células de cada tratamiento experimental y anticuerpo y se dispusieron en Facs. Posteriormente se centrifugó y se decantó el sobrenadante. Para el estudio de la villina se permeabilizó con metanol frío (-20°C) en hielo durante

10 minutos para facilitar la apertura de los poros. En el caso de la fosfatasa alcalina, al ser una proteína de membrana no fue necesario dicho paso.

Las células se lavaron una vez con PBS frío, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se le añadió al botón celular 20 µl del anticuerpo primario correspondiente. Se agitó y se incubó 30 minutos en oscuridad a 4°C. Pasado este tiempo, se lavó una vez con PBS frío, se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se le añadió al botón celular 100 µl de albúmina fetal bovina (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA) al 3% y se dejó incubar de 30 a 45 minutos para evitar uniones inespecíficas. Se volvió a lavar tras este tiempo con PBS frío, se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se le añadió al botón celular 20 µl de antiinmunoglobulina conjugada con fluoresceína. Se incubó durante 30 minutos a 4°C, se lavaron dos veces con PBS frío, se decantó el sobrenadante y se fijaron las células con etanol al 70%.

Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo por FACScan usando un citómetro de flujo "VANTAGE" (Becton Dickinson, San José, CA, USA) del servicio de citometría de flujo, del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

9. PROCESAMIENTO DE LOS CULTIVOS PARA ELECTROFORESIS EN SDS-PAGE Y WESTERN-BLOT.

9.1. Fraccionamiento celular

Las células se despegaron de los frascos de cultivo con PBS-EDTA (0.02%) y se recogieron tras dos lavados con PBS, por centrifugación a 1500 rpm durante 5 min. El pellet celular fue resuspendido en buffer (62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10% glicerol, 2% SDS, 5% 2-mercaptoetanol, 0.5% azul de bromofenol y 100 mM ditiotreitól), homogeneizado, calentado hasta ebullición y centrifugado a 14000 rpm durante 10 min. El sobrenadante, con las proteínas

totales, fue recogido aislándose una muestra de 100 µl para la determinación de la concentración proteica.

9.2. Cuantificación proteica

La concentración proteica total de los cultivos fue determinada a partir de las alícuotas de 100 µl aisladas a tal efecto, utilizando el método colorimétrico descrito por Lowry (Lowry y cols., 1951).

9.3. SDS-PAGE

Las proteínas fueron disueltas en tampón de muestra Laemmli (Laemmli, 1970) obteniendo una concentración final de 1 µg/µl y sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS), por la técnica de geles discontinuos descrita por Laemmli (Laemmli, 1970) adaptada a microgeles (53 x 80 x 0.75 mm) y en un equipo de electroforesis vertical Mini-Protean II Slab Cell (Biorad) (Leiva y cols., 1990). El gel inferior o de separación se realizó a una concentración final de poliacrilamida del 10%.

Inmediatamente antes de ser colocadas en el gel, las muestras se calentaron a 95°C durante 5 min, para facilitar la acción del SDS, y se centrifugaron a 14000 rpm durante 1 min. Las muestras se introdujeron en el gel utilizando una jeringa Hamilton (15 µl por pocillo), reservándose un pocillo para el patrón de pesos moleculares del laboratorio Bio-Rad (control 98237). Una vez cargadas, se procedió al corrido de los geles a 60 V durante 3 h.

- Tampón de muestra Laemmli: 7.6×10^{-3} mM de Tris, 2% de SDS, 10% de glicerol, 5.5% de 2-mercaptoetanol y 0.02% de azul de bromofenol.
- Gel inferior al 10%: 3.1 ml acrilamida (30%), 90 µl SDS (10%), 2.7 ml agua, 2.3 ml tampón del gel inferior (18,5 gr Tris, en 80 ml de agua pH 8

después se completa hasta 100 ml con agua), 50 μ l persulfato amónico (APS) y 10 μ l N,N,N',N'tetrametil etilendiamina (TEMED).

- Gel superior al 10%: 0.4 ml acrilamida (30%), 40 μ l SDS (10%), 2.56 ml agua, 1 ml de tampón del gel superior (6 gr Tris, en 80 ml de agua pH 6.8 después se completa hasta 100 ml con agua), 25 μ l AMPS y 5 μ l TEMED.
- Patrón de pesos moleculares: fosforilasa B (120 kD), albúmina de suero bovino (97 kD), ovoalbúmina (55.4 kD), anhidrasa carbónica (36.1 kD), inhibidor de tripsina (28.9 kD) y lisozima (20.9 kD), de los laboratorios BIO-RAD.
- Tampón de electroforesis: 6 g de Tris 0.25 M, 28.8 g de glicina 0.192 M y 1 g de SDS al 0.1%, se completa con agua hasta 1 litro y se ajusta el pH a 8.3.

9.4. Western-blot

Para la identificación de las bandas proteicas en geles de poliacrilamida se llevó a cabo el western-blot o inmunobloting. Se realizó por modificación de la técnica descrita por Towbin y Leiva (Blake y cols., 1984; Leiva y cols., 1990). Después de la electroforesis, los geles fueron equilibrados en tampón de transferencia durante 15 min. Se cortó el papel whatman (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA) y una membrana de nitrocelulosa (poro 0.45 μ m) (Millipore, Fr), siguiendo las dimensiones del gel y se equilibraron incubándolas durante 15 min en tampón de transferencia. A continuación, se procedió a la elaboración del sándwich de transferencia, colocando seriadamente y del polo negativo al positivo en el Trans-Blot de Bio-Rad los siguientes componentes: papel whatman, gel, membrana de nitrocelulosa, y papel whatman. La transferencia se realizó a 20 V durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Tampón de transferencia: 1.455 g de Tris 25 mM, 0.732 g de glicina 192 mM y 50 ml de metanol al 20%, 937 µl SDS al 10%, se ajusta el pH a 9.2 y se completa con agua hasta 250 ml.

9.5. Inmunodetección de proteínas

Tras la transferencia, la membrana de nitrocelulosa, fue sometida al bloqueo de los sitios de unión inespecíficos de la membrana mediante una solución de bloqueo preparada con leche desnatada al 5% en TBS durante 2h a temperatura ambiente. Una vez bloqueada la membrana se sometió a tres lavados de 5 min con TBS-Tween-20 (10x). Seguidamente se realizó la incubación con el primer anticuerpo en TBS-Tween con leche al 1.5% durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente la membrana fue sometida a 3 lavados de 10 min con la solución TBS-Tween. Inmediatamente después, se realizó la incubación con el segundo anticuerpo en TBS-Tween con leche al 1.5%. Tras realizar tres lavados con TBS-Tween, procedimos al revelado con una solución de compuesta por dos reactivos de los laboratorios Amersham Biosciences específica para Western Blot: "SL.Western blotting anlysis System".

Una vez reveladas las membranas se ponen en contacto con películas radiográficas (AGFA) para la impresión de las bandas de proteínas que han sido detectadas por los anticuerpos.

Los marcadores de interés y los anticuerpos utilizados fueron:

Anticuerpo primario.

Fosfatasa alcalina: Anticuerpo policlonal IgG de cabra frente a la fosfatasa alcalina placentar humana (Santa Cruz Biotechnology, California, USA, sc-15065). El anticuerpo está recomendado por la casa comercial para su uso en la detección de fosfatasa alcalina intestinal de rata tanto por inmunofluorescencia como por Western Blotting. La dilución empleada fue de 1:500.

Villina: Anticuerpo policlonal IgG de cabra frente a la villina humana (Santa Cruz Biotechnology, California, USA, sc-7672). El anticuerpo está recomendado por la casa comercial para su uso en la detección de villina de rata tanto por inmunofluorescencia como por Western Blotting. La dilución empleada fue de 1:500.

Anticuerpo secundario.

Para ambos anticuerpo primarios se empleó un anticuerpo IgG de burro conjugado con peroxidasa de rábano picante (Santa Cruz Biotechnology, California, USA, sc-2020). La dilución empleada fue de 1:2000.

9.6. Cuantificación de las bandas de proteína

Las bandas proteicas de las placas radiográficas fueron cuantificadas utilizando un software para la densitometría de imagen (BIO-PROFIL Bio 1D V97.03, Vilber-Lourmat (1.997).

10. ENSAYOS CON TRITIO

10.1. Nucleósidos tritiados y condiciones de cultivo

Para el estudio de la incorporación intracelular y la posible compartimentación de los nucleósidos exógenos se utilizaron nucleósidos marcados radiactivamente con tritio. Se optó por utilizar un candidato del grupo químico de las purinas, guanosina, y otro de las pirimidinas, uridina, con el fin de establecer posibles diferencias entre dichos grupos.

Tanto la guanosina como la uridina tritiada comercial (Moravek Biochemicals, Ins, California, USA) presentaban una concentración radiactiva de 1 mCi/ml (microcuries) y una actividad específica de 15 y 16.2 Ci/mmol

respectivamente. La concentración radiactiva utilizada en los medios de cultivo fue de 200 $\mu\text{Ci/ml}$, que fue determinada como la concentración con la que se obtienen mejores micrografías electrónicas, por diferentes pruebas que realizamos con anterioridad a los ensayos incluidos en la tesis doctoral.

La composición de los medios de cultivo con nucleósidos tritiados fue:

- **Medio NT-Tritio (NTT):** Medio base + 0,5% Suero fetal bovino dializado + 1 $\mu\text{l/ml}$ Mito+TM + Nucleósidos: Timidina, Citidina e Inosina a una concentración de 100 μM cada uno + Guanosina tritiada a una concentración radiactiva de 200 $\mu\text{Ci/ml}$ y completado hasta 100 μM con guanosina no tritiada.
- **Medio NU-Tritio (NUT):** Medio base + 0,5% Suero fetal bovino dializado + 1 $\mu\text{l/ml}$ Mito+TM + Nucleósidos: Guanosina, Citidina e Inosina a una concentración de 100 μM cada uno + Uridina tritiada a una concentración radiactiva de 200 $\mu\text{Ci/ml}$ y completado hasta 100 μM con guanosina no tritiada.
- **Medio sin tritio (ST):** Medio base + 0,5% Suero fetal bovino dializado + 1 $\mu\text{l/ml}$ Mito+TM

El cultivo se realizó en Transwell (Corning) que son unas estructuras que se adoptan a los pocillos de una placa de cultivo y permiten establecer dos compartimentos separados por una membrana permeable, sobre la que crecen las células (figura7). El modelo de Transwell empleado tiene una superficie de crecimiento de 0.3 cm^2 , 3 μm de diámetro de poro, con membrana de politetrafluoroetileno (PTFE) de 6.5 mm de diámetro recubierta de colágeno I y III de placenta bovina. Esta configuración promueve la adhesión y expansión celular.

Las células fueron sembradas a una densidad de 100.000 células/ cm^2 y tras 24 horas fueron lavadas dos veces con medio base sin suero.

Posteriormente se aplicaron los medios tritiados respectivamente en el compartimiento superior y el medio sin tritio en el inferior. Así se incubaron las células durante 30 minutos, 1, 2, 3 y 4 horas en la estufa de CO₂ a 37°C.

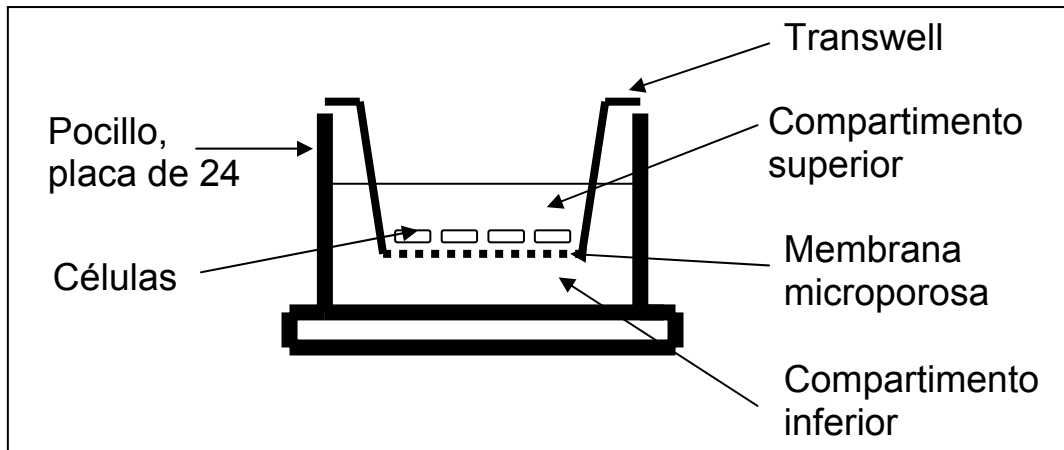


Figura 7. Esquema de un Transwell donde se aprecia la segregación de un compartimento superior y otro inferior separado por una membrana permeable.

10.2. Determinación de la incorporación intracelular por contador de centelleo líquido.

Una vez realizada la incubación de las células se retiró el medio de cultivo y se tomaron muestras de 1µl que fueron llevadas a 3ml con medio de soporte para contador de centelleo. Posteriormente se determinó la cantidad de radioactividad total en cada muestra con un contador de centelleo líquido Beckman, modelo LS6000 del servicio de análisis de radioisótopos del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. Los resultados fueron expresados como una proporción respecto a la cantidad de radioactividad inicial.

10.3. Autorradiografía para microscopía electrónica

La autorradiografía es una técnica que nos permite localizar sustancias radioactivas en las estructuras y analizar el significado su presencia. Nace de la interacción de tres campos de la ciencia como es la física, en lo que concierne a la radioactividad, la histoquímica por el tratamiento que se realiza sobre tejidos y células, y la fotoquímica por el empleo de emulsiones fotográficas utilizadas en el procesamiento de las muestras (Nagata, 1998).

Se puede realizar autorradiografía tanto para microscopía óptica como electrónica, en nuestro caso se realizó un estudio autorradiográfico para microscopía electrónica de transmisión, de manera que tras poner en contacto las células con nucleósidos tritiados se procedió a su procesado e inclusión, para finalmente cubrir las secciones con una emulsión fotográfica durante cierto período de tiempo, en el que las moléculas radioactivas van constituyendo la imagen latente. Finalmente se realizó el revelado de las emulsiones que permitió manifestar la localización de los nucleósidos por la presencia de granos de plata.

Los isótopos radioactivos emiten tres tipos de radiaciones: alfa, beta y gamma. La radiación beta (electrones) es la de interés para la autorradiografía para microscopía electrónica. En nuestros estudios se utilizó el tritio como isótopo radioactivo, debido a que se ajusta mejor a la técnica por poseer menor energía en la radiación que emite. Esto permite mejorar tanto la resolución como incrementar la probabilidad de que la radiación sea recogida por la emulsión fotográfica. Además, el tritio tiene una vida media alta (12.26 años), lo que permite mantener en incubación los cortes con la emulsión fotográfica durante largos períodos de tiempo, garantizando la permanente incidencia de partículas beta.

La emulsión fotográfica usada para la autorradiografía consiste en una matriz gelatinosa que contiene granos de bromuro de plata (Figura 8). Una adecuada emulsión tiene que garantizar que los granos de bromuro de plata

tengan una distribución homogénea y compacta sobre los cortes de células. La emulsión de elección para nuestro trabajo fue la emulsión nuclear Ilford L4 (Ilford Imaging, UK), cuyos granos de bromuro de plata tienen un diámetro de $0.11\mu\text{m}$.

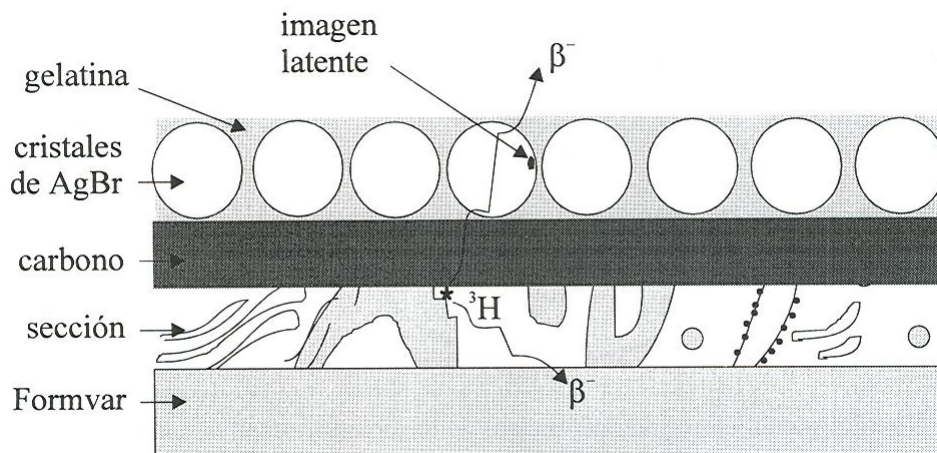


Figura 8. Esquema que muestra la composición de la emulsión fotográfica empleada en la autorradiografía y la disposición de las diferentes capas que se superponen sobre la rejilla. Las partículas β emitidas por los nucleósidos chocan en su trayectoria con cristales de bromuro de plata formando la imagen latente que tras el revelado muestra los granos de plata (Renau y cols., 1998).

La formación de la imagen latente se produce cuando las partículas beta procedentes del tritio chocan con los granos de plata y éstos se reducen. Tras el revelado se ponen de manifiesto los puntos de interacción. (Renau y cols., 1998). El tipo de revelador que se emplee dará lugar a la aparición de diferentes marcas en las células. El revelador D19 forma unos cordones de granos de plata enrollados al azar, mientras que una mezcla reveladora constituida por Fenidona y Ácido Ascórbico da lugar a unos granos esféricos de plata (Figura 9).

Dada nuestra intención de estudiar la localización diferencial de las marcas en las células, nos decantamos por la utilización del revelador de

fenidona-ácido ascórbico, que con un marcaje más definido, permite correlacionar más fácilmente las marcas con los orgánulos y compartimentos celulares subyacentes.

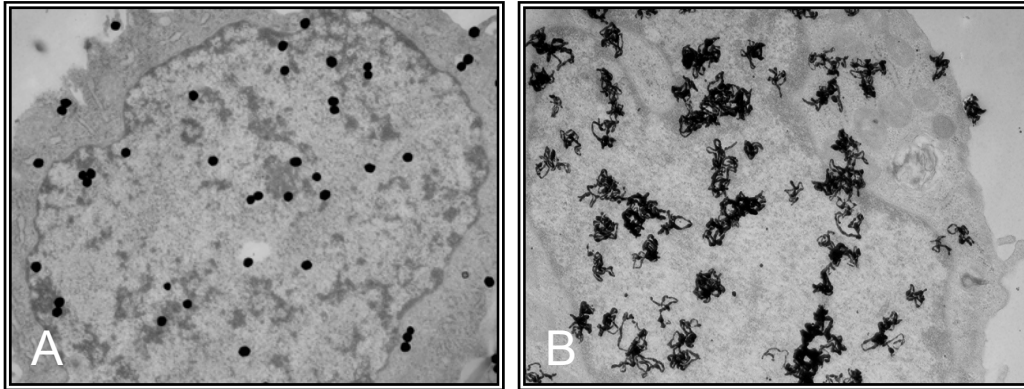


Figura 9. Células IEC-6 en cultivo tratadas con nucleósidos trititados: A, revelado con una mezcla de Fenidona-ácido ascórbico; B, revelado con Kodak D19;

El protocolo utilizado para la preparación de las muestras para la autorradiografía a microscopía electrónica fue (Renau y cols., 1998):

Las muestras de los cultivos fueron procesadas siguiendo el protocolo descrito en el punto 7.2. del apartado de material y métodos. Las secciones de entre 90 y 120 nm de espesor fueron recogidas en rejillas de cobre recubiertas por una película de Formvar (Electron Microscopy Science, Hatfield, USA). Las rejillas fueron contrastadas con acetato de uranilo en solución acuosa al 5%, 15 minutos, y lavadas con agua dos veces. Posteriormente se contrastaron de nuevo con citrato de plomo durante un minuto, se lavaron y se dejaron secar. Para ambos contrastes se utilizó el protocolo descrito en el punto 7.2. del apartado de material y métodos. A continuación las rejillas fueron recubiertas con una película de carbono de 5 nm de espesor.

Para el recubrimiento de las secciones con la emulsión fotográfica se utilizó la técnica del “loop”. Las rejillas fueron fijadas sobre la base menor de

un tapón de corcho mediante cinta adhesiva de doble cara, que contaba con un agujero central ligeramente inferior al de la rejilla (Figura 10).

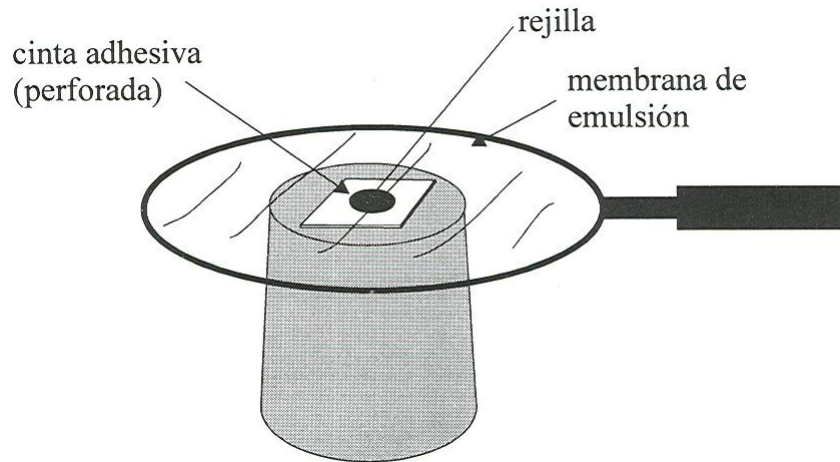


Figura 10. El esquema representa la situación de la rejilla fijada a la cinta adhesiva sobre el tapón de corcho. Haciendo pasar el asa con la emulsión se dispone una monocapa de emulsión nuclear sobre la rejilla (Renau y cols., 1998).

La manipulación de la emulsión Ilford L4 se realizó en una habitación oscura dotada de una lámpara de seguridad. Se añadió 10 gr de emulsión sobre 20 ml de agua con 0.4 ml de MannoXol OTTM (Polysciences, Inc). Se mantuvo en un baño a 45 °C durante 20 minutos, removiendo suavemente cada 5 minutos con una varilla de vidrio, evitando la formación de burbujas. Después se colocó el recipiente en un baño con hielo durante 3 minutos, se sacó, secó y se dejó a temperatura ambiente para que gelificara, agitando suavemente unos 10 segundos cada minuto.

Finalmente se procedió a la colocación de la emulsión, para ello se inclinó el recipiente 45°, se sumergió horizontalmente un asa de hilo de platino (calibre 0.5 mm y 4 cm de diámetro), se giró 90°, y se extrajo. Después manteniendo el plano del asa en posición vertical, se esperó a que gelificara (entre 30 y 60 segundos). El depósito de la membrana sobre la rejilla se realizó

cogiendo el tapón de corcho con los dedos y haciéndolo pasar a través del asa portadora de la membrana.

Una vez recubiertas las rejillas, se insertaron los tapones de corcho en trozos de PVC de unos 5 cm de longitud y 1 cm de diámetro, provistos de un agujero lateral (Figura 11). Los trozos de PVC fueron colocados en cajas negras de plástico, conteniendo en su interior saquitos de silicagel, para mantener un ambiente seco en el interior. Las cajas fueron selladas con cinta adhesiva, etiquetadas, envueltas en plástico negro y llevadas a 4°C durante 80 días, que fue el tiempo considerado en pruebas previas, como más adecuado para la obtención de buenas micrografías.

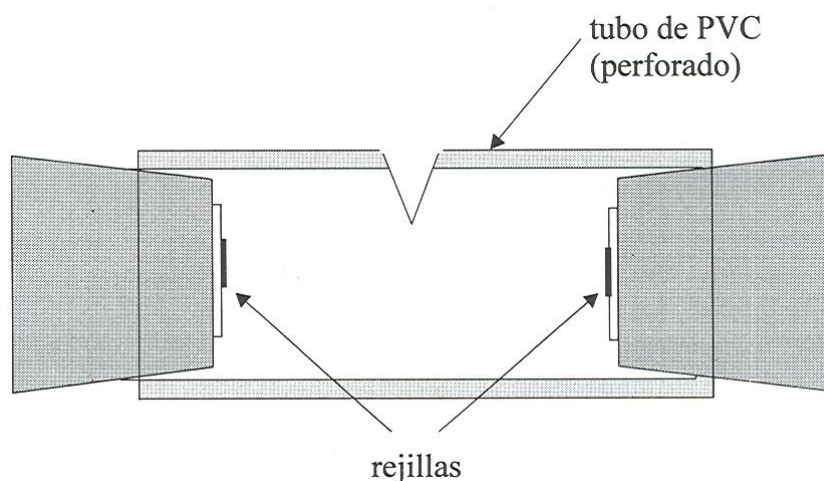


Figura 11. El esquema representa la disposición de los tapones de corcho y las rejillas en el trozo de PVC. (Renau y cols., 1998)

Transcurrido los 80 días se procedió al revelado de las rejillas. Para ello bajo luz de seguridad, se separaron las rejillas de la cinta adhesiva del tapón, y se hicieron flotar sobre gotas de los reactivos que se detallan a continuación:

- Incubación de las rejillas con fijador fenidona-ácido ascórbico durante 2 minutos.
- Lavado agua destilada
- Fijación con tiosulfato sódico al 30% durante 5 minutos (Sigma, SL)

- Varios lavados con agua destilada.

El revelador se preparó fresco para cada uso, disolviendo en 75 ml de agua:

- Ácido ascórbico 1.50 gr
- Phenidone (fenidona) 0.25 gr
- Bromuro potásico 0.60 gr
- Carbonato potásico 1.30 gr
- Tiocianato potásico 6.00 gr

Finalmente se diluyó hasta 100 ml y se filtró antes de usar. Todos los productos fueron adquiridos en Sigma (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA) y la fenidona fue de calidad fotográfica.

Una vez reveladas, las rejillas fueron estudiadas en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM902 perteneciente al servicio de microscopía electrónica del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. Los negativos de las micrografías obtenidas fueron escaneados manteniendo los mismos parámetros y analizadas con el software Image J (1.33 u, National Institute of Health, USA) utilizando los plugins: “cell counter” y “area calculador”.

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LOS DATOS.

El análisis de los datos de los diferentes ensayos fue realizado utilizando el programa estadístico Statgraphics plus para Windows v.5.1 (Statistical Graphics Corp, 2000). Los análisis realizados fueron regresión simple, Anova de una y dos vías, y el contraste múltiple de rango, por el procedimiento de menores diferencias significativas de Fisher (LSD) para discriminar las diferencias significativas entre las medias de parejas de grupos experimentales.

Las diferencias estadísticamente significativas se consideraron con valores de $p < 0.05$. La representación gráfica de los datos obtenidos se realizó mediante el empleo del software Microsoft Excel 2002 (Microsoft corporation).

RESULTADOS

1.- ENSAYOS A BAJA DENSIDAD CELULAR

1.1. Ensayos de proliferación

Para analizar las modificaciones provocadas por la presencia de las mezclas de nucleósidos en los medios de cultivo sobre la tasa de proliferación de las células IEC-6, se realizaron estudios utilizando dos métodos destinados al recuento del número de células: contaje por técnicas colorimétricas con tinción de sulforrodamina B y contaje con hemocitómetro de Neubauer.

1.1.1. Curva de crecimiento

Células IEC-6 fueron sembradas en placas de 24 pocillos en condiciones de baja densidad celular, e incubadas con medios de cultivos experimentales sin nucleósidos (control) o con alguna de las dos mezclas NT o NU. Cada día se tomaron muestras que fueron procesadas para el contaje con tinción de sulforrodamina B, hasta un total de 7 días (Figura 12).

Inicialmente se observó que las células crecían al mismo ritmo, independientemente del tipo de tratamiento de cultivo. En el tercer día contaban con 75.691, 79.054 y 72.328 células los grupos control, NT y NU respectivamente. Sin embargo, a partir del tercer día se produjo un cambio en el comportamiento del grupo NT, que pasó a ser el grupo con mayor tasa proliferativa, apareciendo diferencias significativas con respecto a los otros dos grupos que se mantuvieron durante el resto del período de ensayo. Posteriormente, a partir del cuarto día, el grupo NU comenzó una tendencia desaceleradora con respecto al grupo control, que ya en el día 6 mostró diferencias significativas que se mantuvieron hasta el final del ensayo. El último día de valoración contaban ya con 213.291, 323.961 y 159.161 células respectivamente.

Estos resultados muestran que durante el período evaluado, los diferentes medios de cultivo conducen a diferentes resultados en cuanto a la

proliferación de las células IEC-6, produciendo la mezcla NT un efecto inductor de la proliferación y la mezcla NU el efecto contrario.

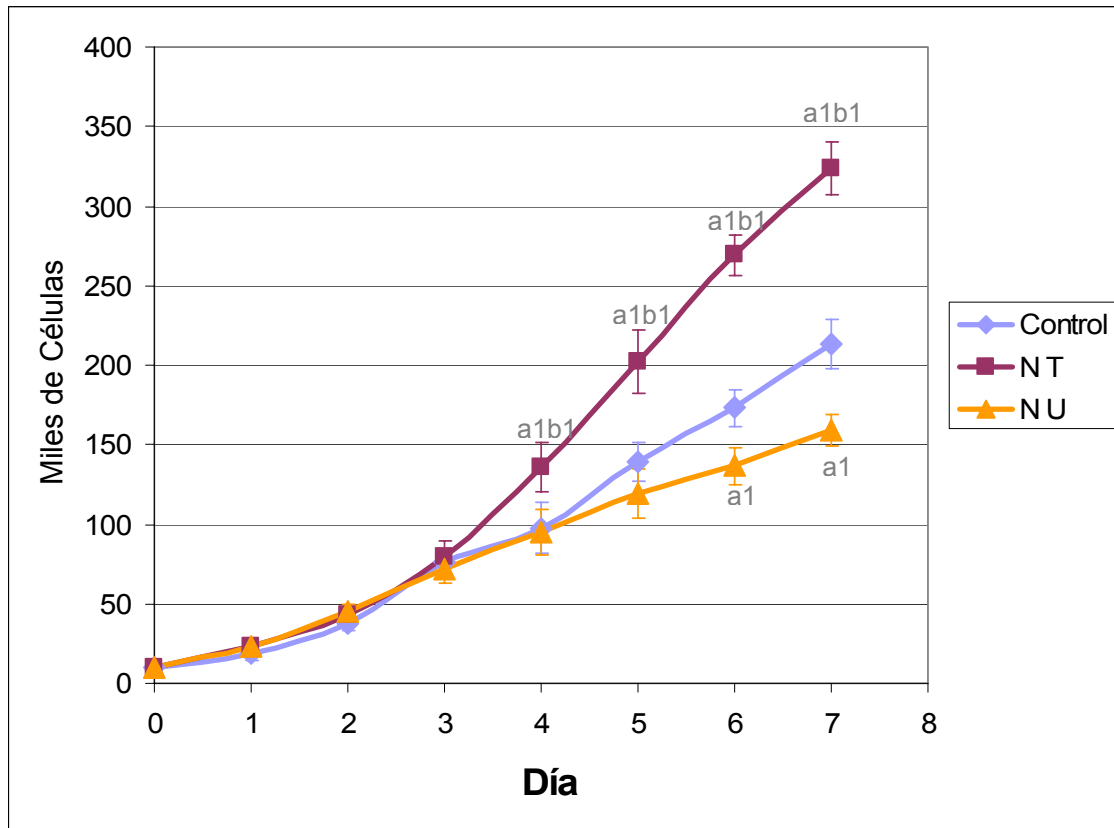


Figura 12. Efecto de las mezclas NT y NU sobre la proliferación de las células IEC-6. Las células fueron incubadas con medio control, NT (100 μ M, de cada nucleósido) o NU (100 μ M, de cada nucleósido). Para cada día considerado, se representa el número de células como la media de cuatro determinaciones, junto con las barras de desviación estándar. a: significación frente al grupo control; b: significación entre los grupos NT y NU; 1:p<0.01.

El estudio de la pendiente en el crecimiento de las células, es una medida de la aceleración de dicho crecimiento (Figura 13). Durante los tres primeros días no se produjo ninguna diferencia drástica, hasta que en el cuarto valor de pendiente se apreció un fuerte impulso del grupo NT con un valor de 56.870 respecto al control, 22.014 y al grupo NU 22.931. Este predominio se mantuvo creciente hasta el tramo 6^o, para que en el tramo 7^o experimentara una leve desaceleración, pasando de 66.958 a 54.424. En los días 5, 6 y 7 el

grupo NU mantuvo unos niveles de pendiente sensiblemente inferiores al grupo control, resultando finalmente en las diferencias en cuanto al número total de células se ha descrito anteriormente.

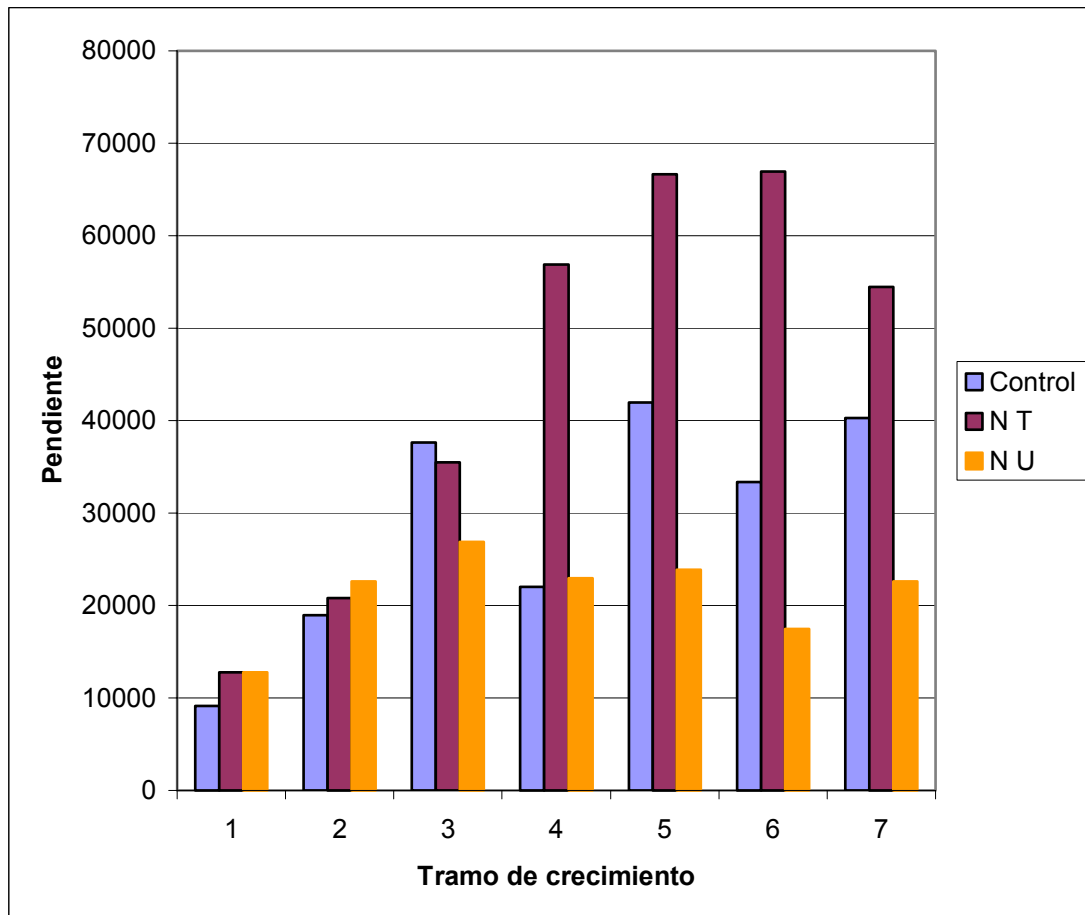


Figura 13. Representación gráfica de los valores de pendiente de cada tramo de crecimiento, calculado como el incremento del número de células respecto al incremento de tiempo.

1.1.2. Determinación del número de células y de la viabilidad celular mediante cámara de Neubauer.

Se sembraron células IEC-6 en condiciones de baja densidad celular en Falcons de 75 cm². Fueron tratadas con medio control, NT (100µM) y NU (100µM) respectivamente, realizándose un cambio de medio de cultivo cada

12 horas. Al séptimo día se levantó la monocapa de células y se determinó tanto el número de células totales (Figura 14) como la viabilidad celular con azul tripan (Figura 15).

Así, el número de células contadas al cabo de los días fue de 7.862.500, 11.467.500 y 5.052.500 para el grupo control, NT y NU respectivamente. Estos resultados confirmaron las diferencias encontradas en la curva de crecimiento realizada con la tinción de sulforrodamina B. De esta manera el grupo NT experimentó una mayor proliferación respecto al grupo control y el grupo NU ($p < 0.01$). Por el contrario el grupo NU redujo su nivel de crecimiento de forma considerable respecto a los otros dos grupos ($p < 0.01$).

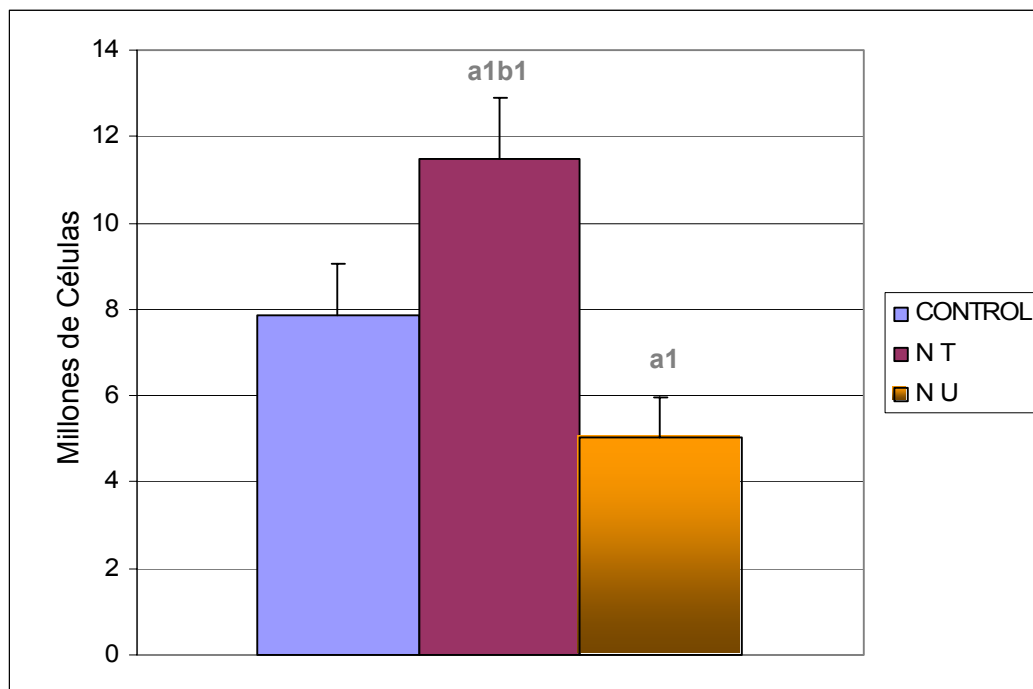


Figura 14. Número total de células tras 7 días de tratamiento con medio control, NT (100 μ M, de cada nucleósido) o NU (100 μ M, de cada nucleósido). Cada histograma representa la media de tres determinaciones, a una escala de 10^6 células. La barra vertical refleja los valores de desviación estandar. a: significación frente al grupo control; b: significación entre los grupos NT y NU; $1;p < 0.01$.

La viabilidad celular, estimada con la tinción con el colorante vital azul tripan, no arrojó ninguna diferencia entre los tres grupos. Los valores de viabilidad fueron 91'50, 89'50 y 87'25 % para el control, NT y NU respectivamente (Figura D).

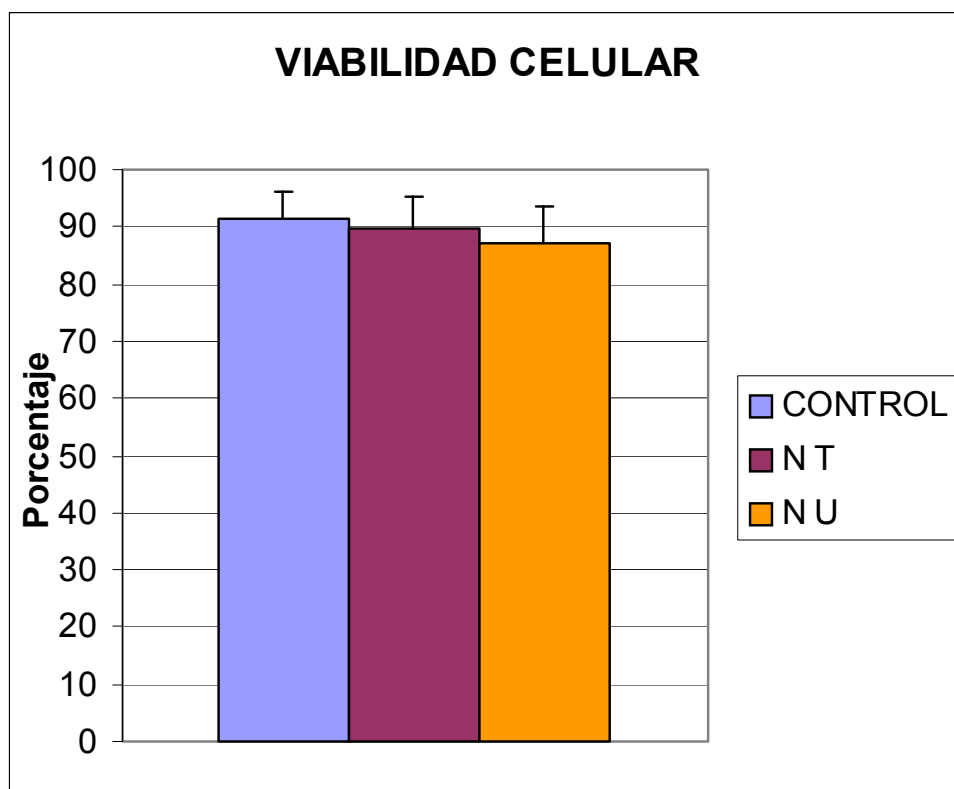


Figura 15. Efecto de los nucleósidos sobre la viabilidad celular. Las células fueron incubadas con los medios control, NT (100 μ M, de cada nucleósido) o NU (100 μ M, de cada nucleósido) durante 7 días y la viabilidad fue determinada a través del conteo directo de las células coloreadas en un hemocitómetro de Neubauer. Se representa en cada histograma la media de tres determinaciones, y la barra vertical refleja la desviación estándar.

1.1.3. Efecto de la concentración de los medios de cultivo experimentales sobre la proliferación

Para analizar el efecto de las concentraciones crecientes de los medios con nucleósidos, se realizó un estudio comparativo durante 7 días en el que

las células IEC-6 fueron sembradas en placas de 24 pocillos en condiciones de baja densidad celular, y cultivadas con el medio control, NT o NU a concentraciones de 10, 25, 50 y 100 μM respectivamente, realizándose un cambio de medio de cultivo cada 12 horas. Transcurridos los 7 días las placas fueron procesadas para la determinación del número de células mediante la tinción con sulforrodamina B (Figura 16).

El número de células en ausencia de nucleósidos fue de 215.419 (control). Los medios con 10 μM no experimentaron diferencias significativas y fueron para el grupo NT 233.764, y para el NU 201.966. A 25 μM el grupo NT con 260.976 células experimentó un crecimiento superior al de los otros dos grupos ($p < 0.01$), mientras que el grupo NU con 192.793 células no presentó diferencias significativas respecto al grupo control. Con la concentración de 50 μM no se produjo ninguna modificación de lo descrito a 25 μM . Tanto los valores de NT, como los de NU en el intervalo 25 μM - 50 μM no presentaron diferencias significativas, por lo que el efecto sobre la proliferación era el mismo aún duplicando la concentración de nucleósidos. A 75 μM el grupo NU sufre un decrecimiento respecto al grupo control, apareciendo ya diferencias significativas entre ambos, y conservando las diferencias con el grupo NT. El grupo NT, a la citada concentración acelera su tasa de proliferación, que por un lado continúa siendo el grupo con mayor proliferación y por otro lado se diferencia estadísticamente de los valores aparecidos tanto a 25 como a 50 μM . Finalmente a 100 micromolar, el grupo NT con 331.299 células, mantiene las diferencias respecto al grupo control con las 215.419 y al grupo NU con 155.186. Sin embargo, no se apreciaron diferencias entre los valores de número de células en el grupo NT, con el incremento de la concentración de nucleósidos de 75 a 100 μM . El análisis estadístico de los resultados obtenidos con el grupo NU en las diferentes concentraciones señala que existen dos grupos homogéneos de valores, los de 10, 25 y 50 μM por un lado, y los de 75 y 100 μM por otro, siendo ambos grupos significativamente diferentes entre sí.

Estos resultados ponen de manifiesto las diferencias que ejercen las dos mezclas de nucleósidos y las respectivas concentraciones sobre la

proliferación. El tratamiento de las células con medio NT desde la concentración de 25 μM supone un incremento de la capacidad proliferativa del cultivo, que se ve nuevamente impulsada a partir de 75 μM . Por el contrario, el tratamiento con medio NU conlleva una reducción de la proliferación, notándose su efecto a concentraciones más elevadas, ya que hasta 75 μM no aparecen diferencias significativas respecto al grupo control.

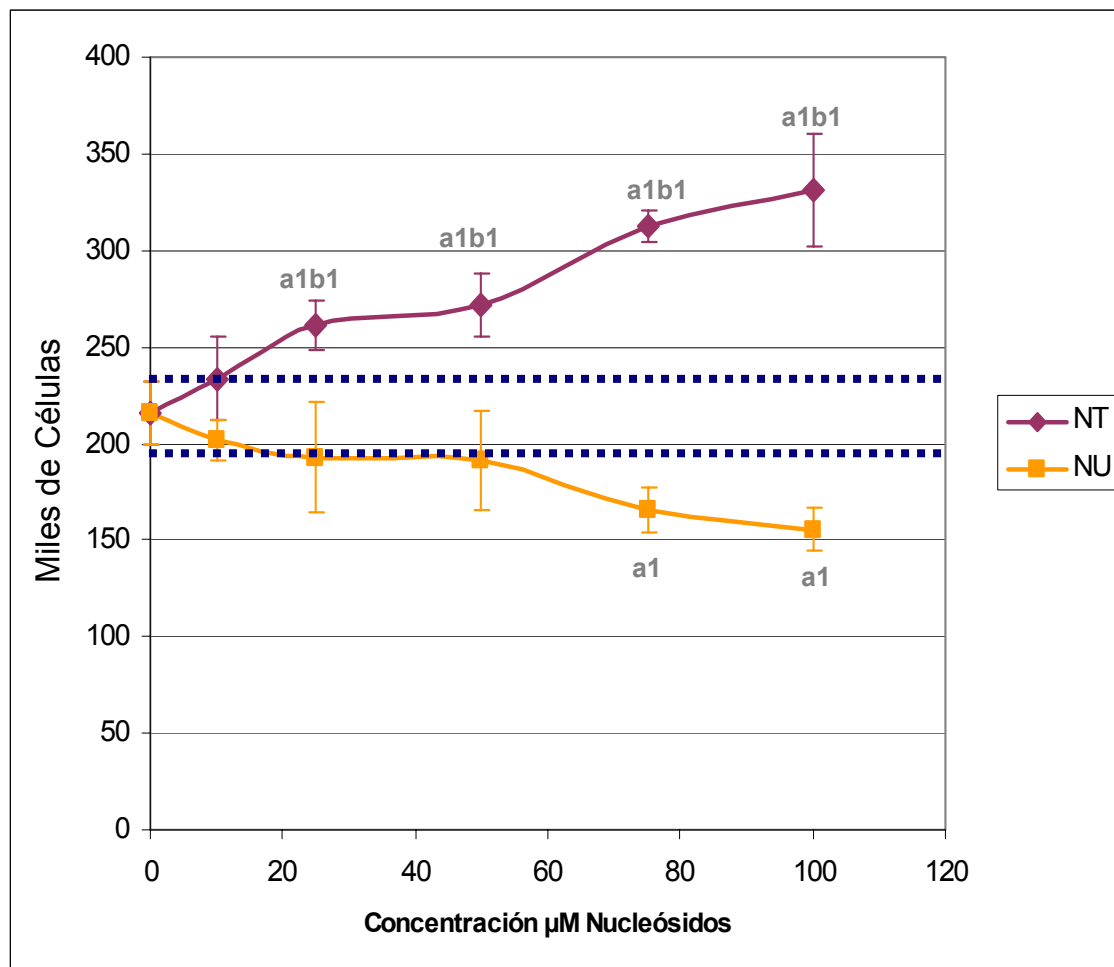
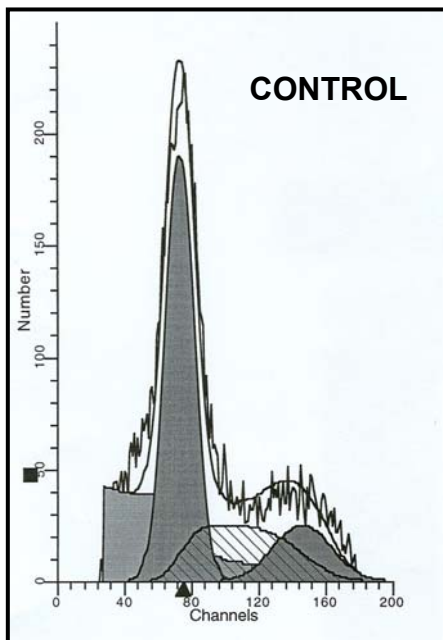


Figura 16. Efecto de las concentraciones crecientes de las mezclas NT y NU sobre la proliferación de las células IEC-6. Los resultados dispuestos en la gráfica representan la media de cuatro determinaciones y la barra vertical la desviación estandar. Las líneas discontinuas horizontales representan una proyección horizontal de los límites establecidos por la desviación estandar del grupo control, situado en el valor de 0 μM de nucleósidos. a: significación frente al grupo control; b: significación entre los grupos NT y NU; 1:p<0.01.

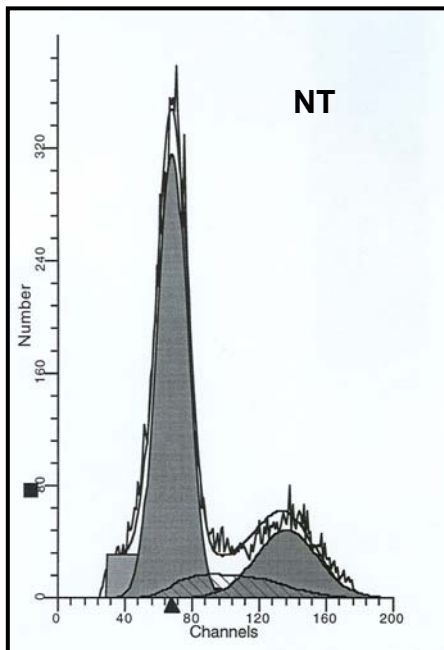
1.2. Análisis de la distribución del ciclo celular

Para analizar las posibles modificaciones provocadas por la presencia de nucleósidos en los medios de cultivo sobre el ciclo celular, se realizó un estudio con las células IEC-6 que fueron sembradas en condiciones de baja densidad celular, y durante 7 días fueron tratadas con los medios experimentales, control, NT (100 μ M, de cada nucleósido) o NU (100 μ M, de cada nucleósido), realizándose un cambio de medio cada 12 horas.

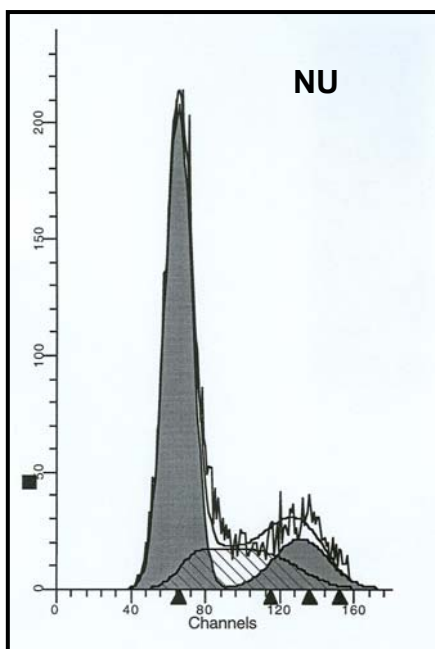
El análisis por citometría de flujo mostró para el grupo control un 60'73% de células en las fases G0-G1, un 15'55% en las fases G2-M y un 23'73% en la fase de síntesis. El tratamiento con NT resultó con un 69'38% de células en fase G0-G1, un 21'56% en fase G2-M y un 9'06% en la fase de síntesis. El grupo NU tuvo un 66'69% de células en fase G0-G1, un 13'22% en fase G2-M y un 20'10% en la fase de síntesis (Figuras 17).



GO/G1: 60,73 \pm 3,68 %
G2/M: 15,55 \pm 2,70 %
SÍNTESIS: 23,73 \pm 2,20 %



GO/G1: $69,38 \pm 2,07$ %
G2/M: $21,56 \pm 1,41$ %
SÍNTESIS: $9,06 \pm 1,52$ %



GO/G1: $66,69 \pm 1,99$ %
G2/M: $13,22 \pm 2,48$ %
SÍNTESIS: $20,10 \pm 1,34$ %

Figura 17. Análisis mediante FACScan del efecto de los nucleósidos exógenos sobre el ciclo celular. Se representa para el grupo control, NT y NU respectivamente una gráfica a la izquierda que refleja el número de células que aparecen en cada fase del ciclo celular, y a la derecha los valores medios de tres determinaciones junto con la desviación estándar.

Las principales diferencias aparecidas en los ensayos fueron el incremento del porcentaje de células tratadas con nucleósidos en las fases G0-G1 y la reducción en la fase de síntesis. Además, el grupo tratado con la mezcla NT experimentó un destacado incremento en el porcentaje de células localizadas en las fases G2-M, respecto a los otros dos grupos experimentales (Figura 17).

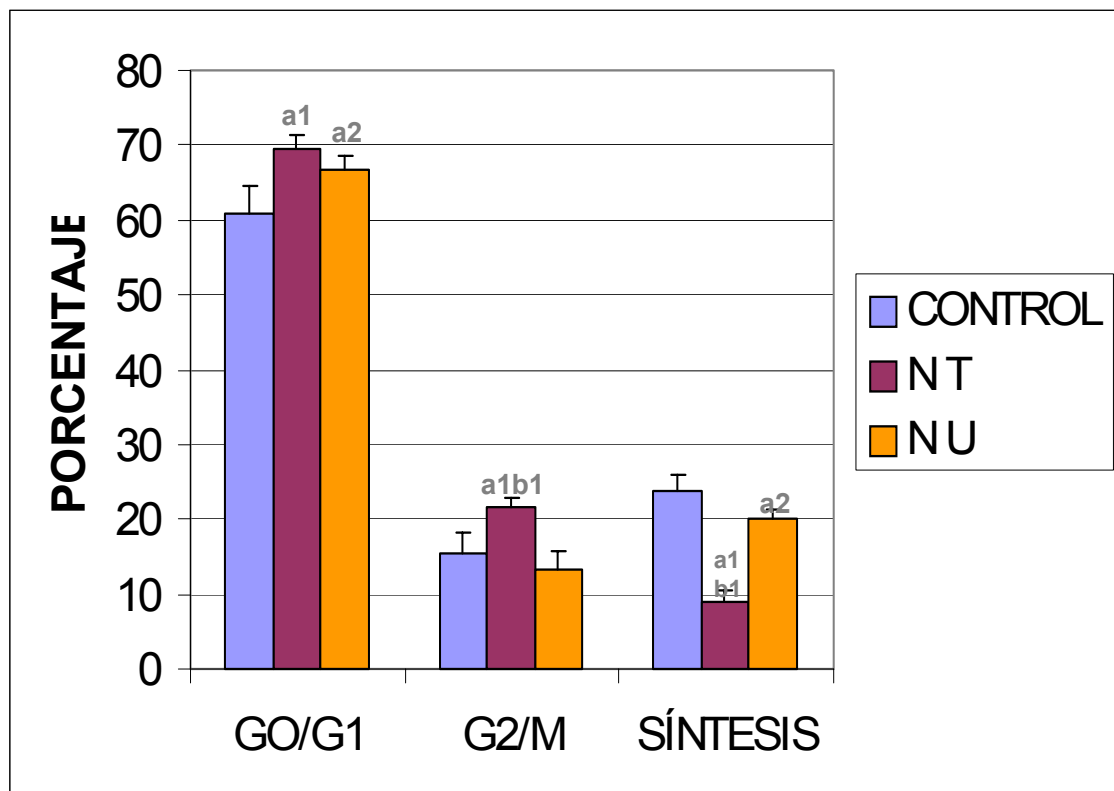


Figura 17. Análisis mediante FACScan del efecto de los nucleósidos exógenos sobre el ciclo celular. Cada histograma representa la media de tres determinaciones y la barra vertical la desviación estándar. a: significación frente al grupo control; b: significación entre los grupos NT y NU; 1:p<0.01; 2:p<0.05

1.3. Ensayo de viabilidad, necrosis y apoptosis

Mediante el citómetro de flujo, utilizando Anexina V conjugada con fluoresceína (FITC) junto con yoduro de propidio, se estudió el efecto de los

nucleósidos sobre los porcentajes tanto de células viables como de apoptóticas y necróticas. Las células fueron sembradas en condiciones de baja densidad celular y fueron incubadas con los respectivos medios de cultivo experimentales durante 7 días realizando cambios de medio cada 12 horas. Transcurrido dicho tiempo fueron procesadas y estudiadas por citometría.

Los valores que aparecieron en el grupo control fueron un 93'34% de células viables, un 4'52% de necrosis y un 2'15% de apoptosis. Para el grupo NT fueron 94'56%, 4'17% y 1'27% respectivamente, y para el grupo NU, 93'29%, 4'76% y 1'95% respectivamente (Figura 18 y 19). El análisis estadístico de los datos no mostró diferencias significativas entre ninguno de los pares de valores.

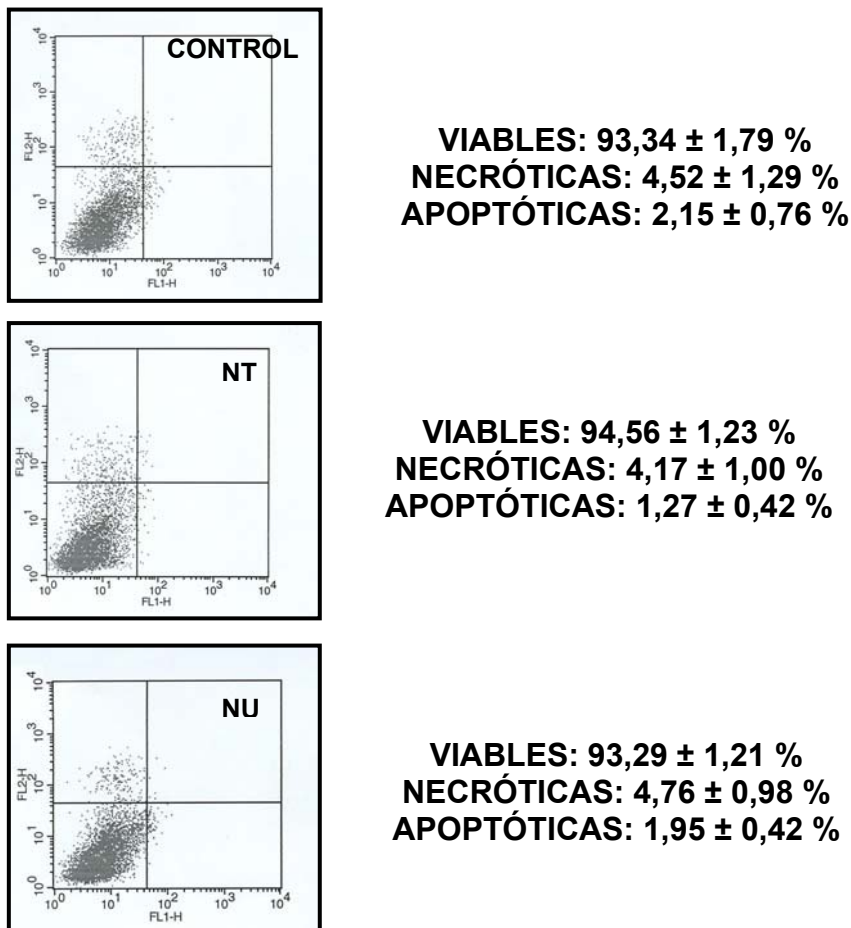


Figura 18. Análisis mediante FACSscan del efecto de los nucleósidos exógenos sobre la viabilidad celular, necrosis y apoptosis. Se representa para el grupo control, NT y NU respectivamente una gráfica a la izquierda que refleja la posición de cada célula evaluada

respecto a los cuadrantes que representan la viabilidad, necrosis y apoptosis, y a la derecha los valores medios de tres determinaciones junto con la desviación estándar.

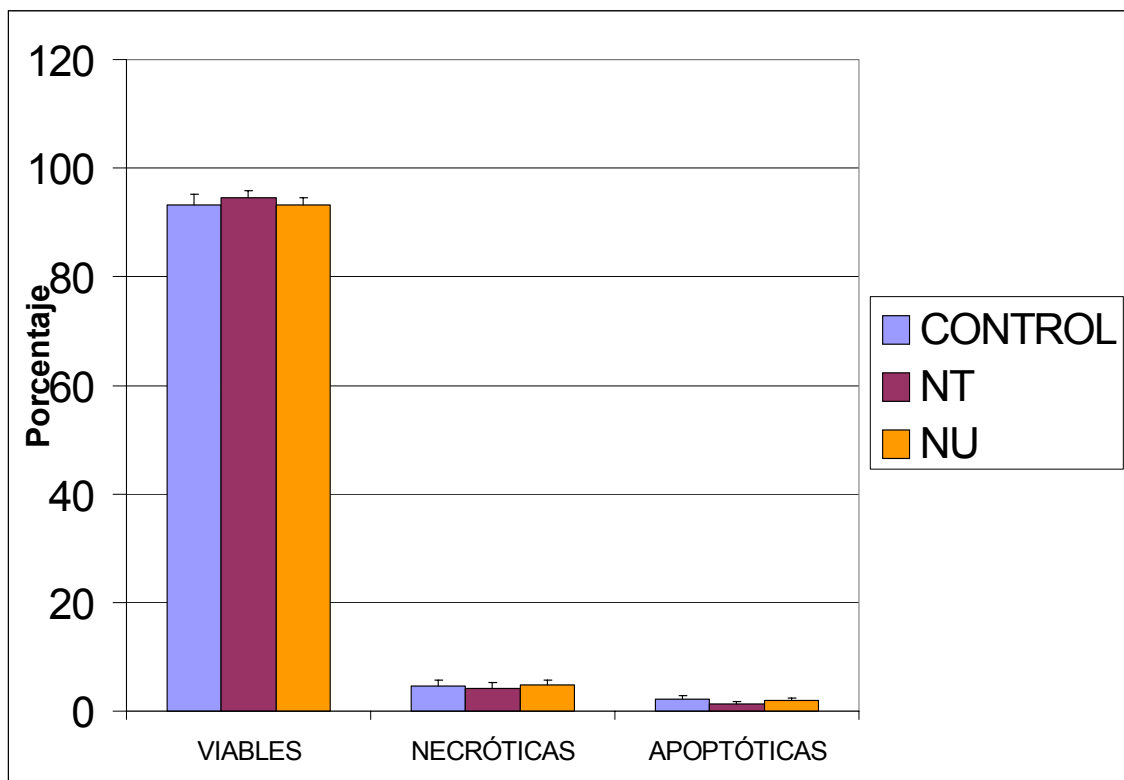


Figura 19. Análisis del efecto de los nucleósidos exógenos sobre la viabilidad celular, necrosis y apoptosis de células IEC-6 tratadas durante 7 días con medio control, NT y NU respectivamente. Cada histograma representa la media de tres determinaciones y la barra vertical la desviación estándar.

1.4. Estudio morfológico de las células

Para evaluar posibles diferencias entre los tres grupos experimentales se realizaron estudios a nivel de microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión.

1.4.1. Microscopía óptica

Células IEC-6 fueron sembradas en condiciones de baja densidad celular y tratadas con los medio de cultivo control, NT y NU respectivamente

durante 7 días, con cambios de medio de cultivo cada 12 horas. Transcurrido dicho tiempo se llevó a cabo el estudio de los caracteres morfológicos de las células mediante visualización directa con un microscopio invertido de contraste de fases.

La monocapa presentaba un aspecto homogéneo, constituida por colonias de células poligonales con bordes angulados, fuertemente cohesionadas (Figura 20). La única diferencia encontrada respecto a los diferentes grupos experimentales radicaba en el grado de confluencia celular, sin apreciarse cambios morfológicos en las células de los diferentes tratamientos.

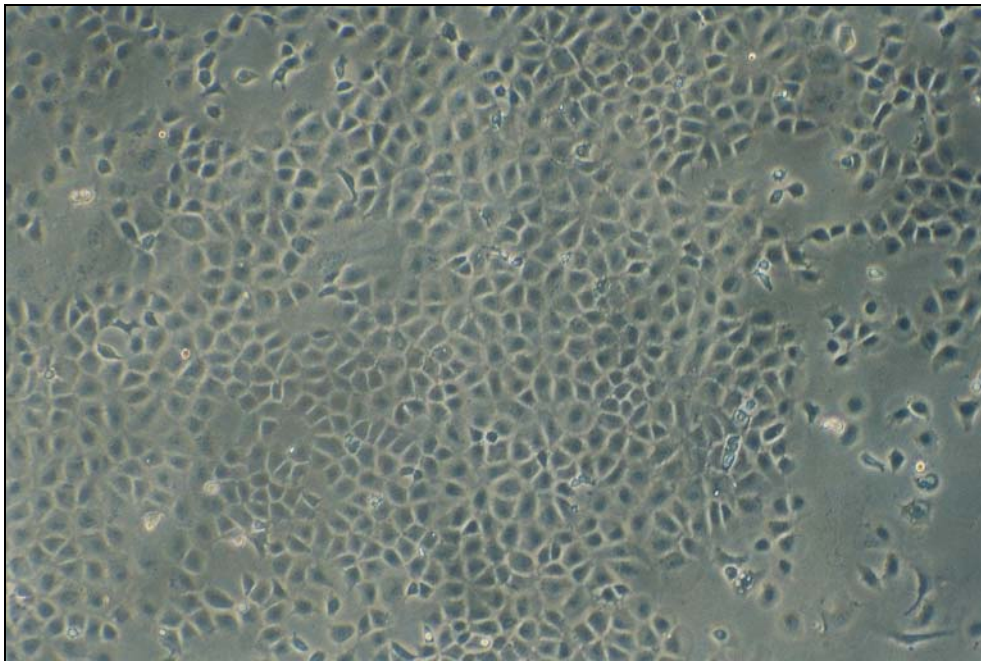


Figura 20. Micrografía a microscopía óptica de células IEC-6 tratadas con el medio experimental NT en el día 7 de cultivo. Obsérvese que el espacio libre para el crecimiento es escaso. Magnificación 100 X.

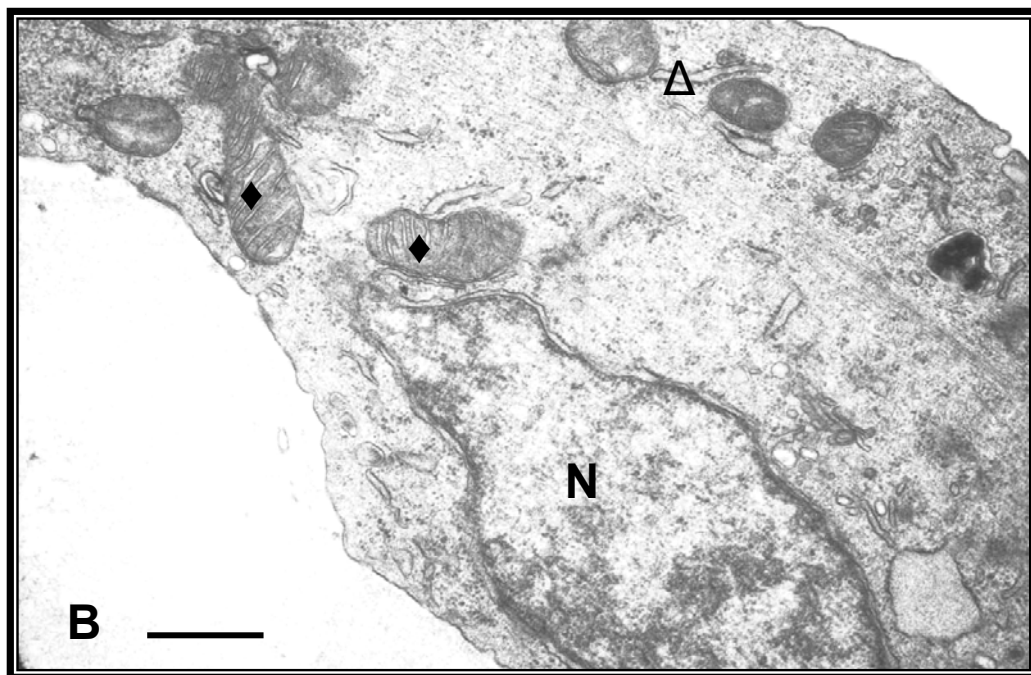
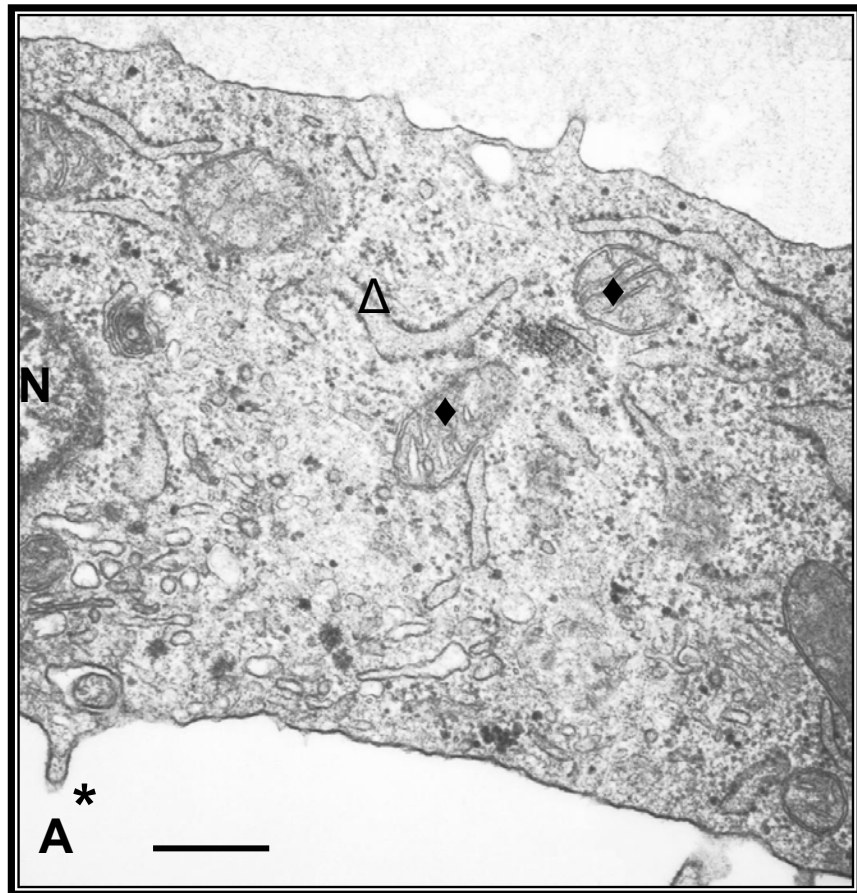
En el séptimo día de cultivo, el grupo NT presentaba mayor número de células comparándolo con los otros dos grupos, existiendo en dicho momento muy poco espacio libre para la continuación del crecimiento. Este hecho

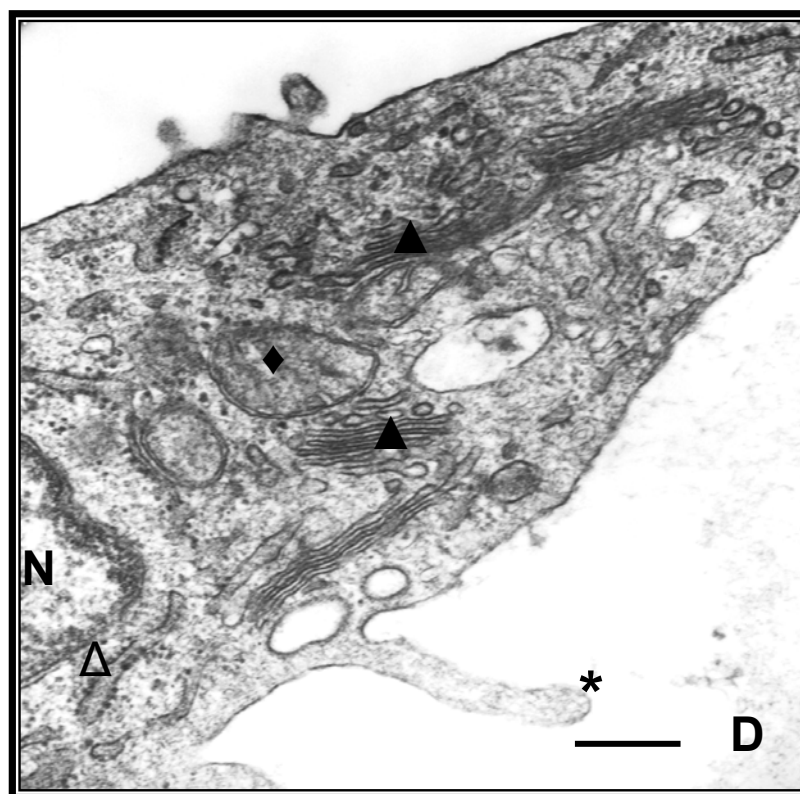
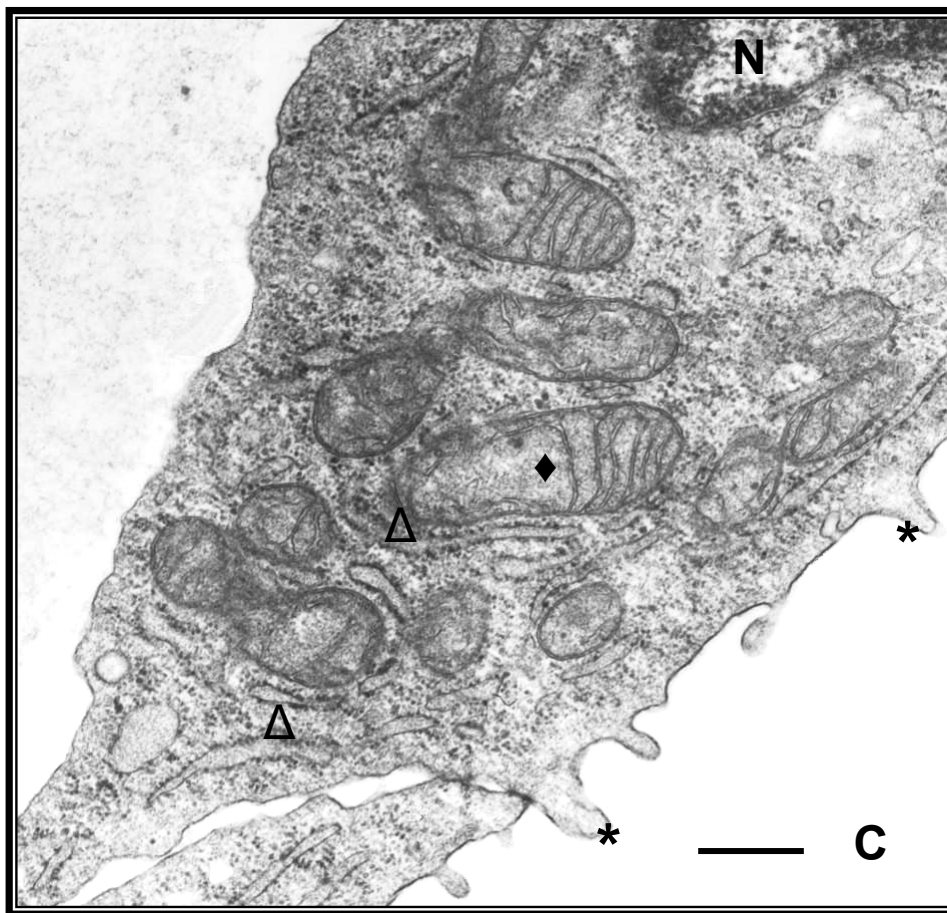
determinó la elección del día 7 como el último para el estudio de la acción de los nucleósidos en condiciones de baja densidad celular, ya que una vez alcanzada la confluencia, no sería posible establecer diferencias en las tasas proliferativas entre los grupos.

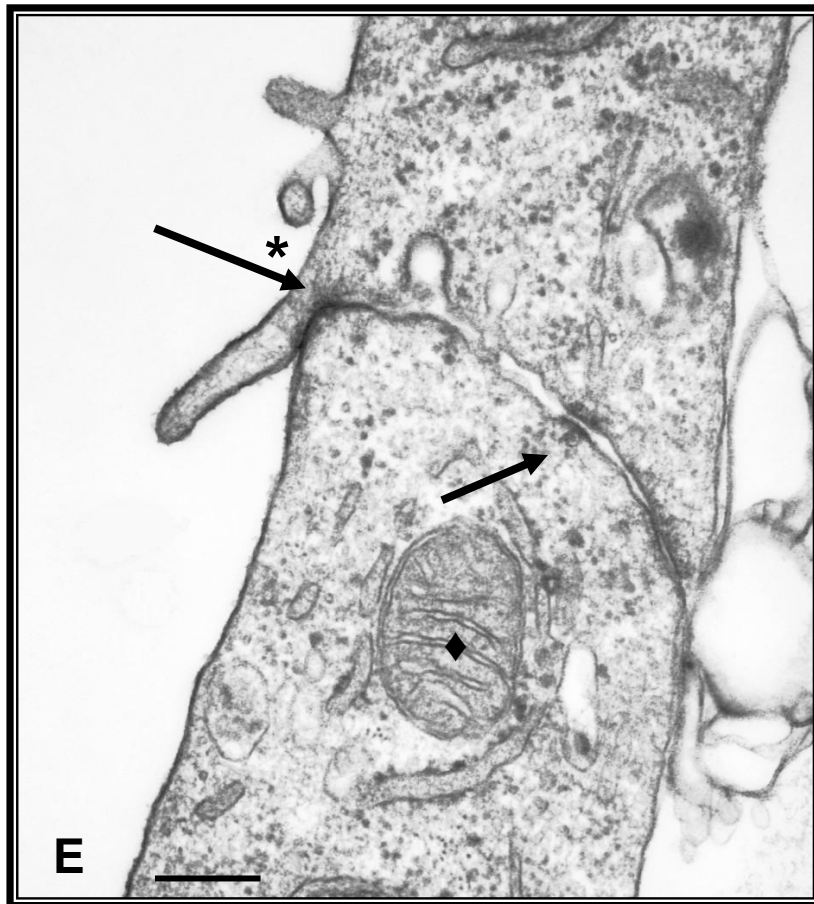
1.4.2. Microscopía electrónica de transmisión

Células IEC-6 fueron sembradas en placas de 24 pocillos en condiciones de baja densidad celular y tratadas con los medio de cultivo control, NT y NU respectivamente durante 7 días, realizando cambios de medio de cultivo cada 12 horas. Transcurrido dicho tiempo se llevó a cabo el estudio de la ultraestructura de las células por microscopía electrónica de transmisión.

Las células IEC-6 son aplanadas y muestran orgánulos típicos como retículo endoplasmático rugoso, mitocondrias con crestas bien definidas, aparato de golgi, microvellosidades, ribosomas libres y asociados al retículo, complejos de unión intercelular, etc (Quaroni y cols., 1979). En los cultivos experimentales se pudieron observar dichas características, aunque se pusieron de manifiesto algunas diferencias entre los grupos (Figura 21). Las células tratadas con nucleósidos presentaron mayor abundancia en orgánulos como mitocondrias y aparato de golgi. Además fue característica la segregación de ambos tipos de orgánulos, ocupando localizaciones diferenciadas dentro de la célula (Figura 21 C, D y G). Por otro lado, los grupos tratados con nucleósidos presentaron con mayor frecuencia microvellosidades, además de ser de mayor tamaño que las encontradas en el grupo control (Figura 21 D, E y F). Por último, en las monocapas de células tratadas con los medios NT y NU aparecieron uniones intercelulares bien definidas, con mayor regularidad que en el grupo control. Estos hallazgos hacen presumir que la administración de nucleósidos conduce a una reorganización intracelular y a la adquisición de estructuras características de las células epiteliales intestinales diferenciadas.







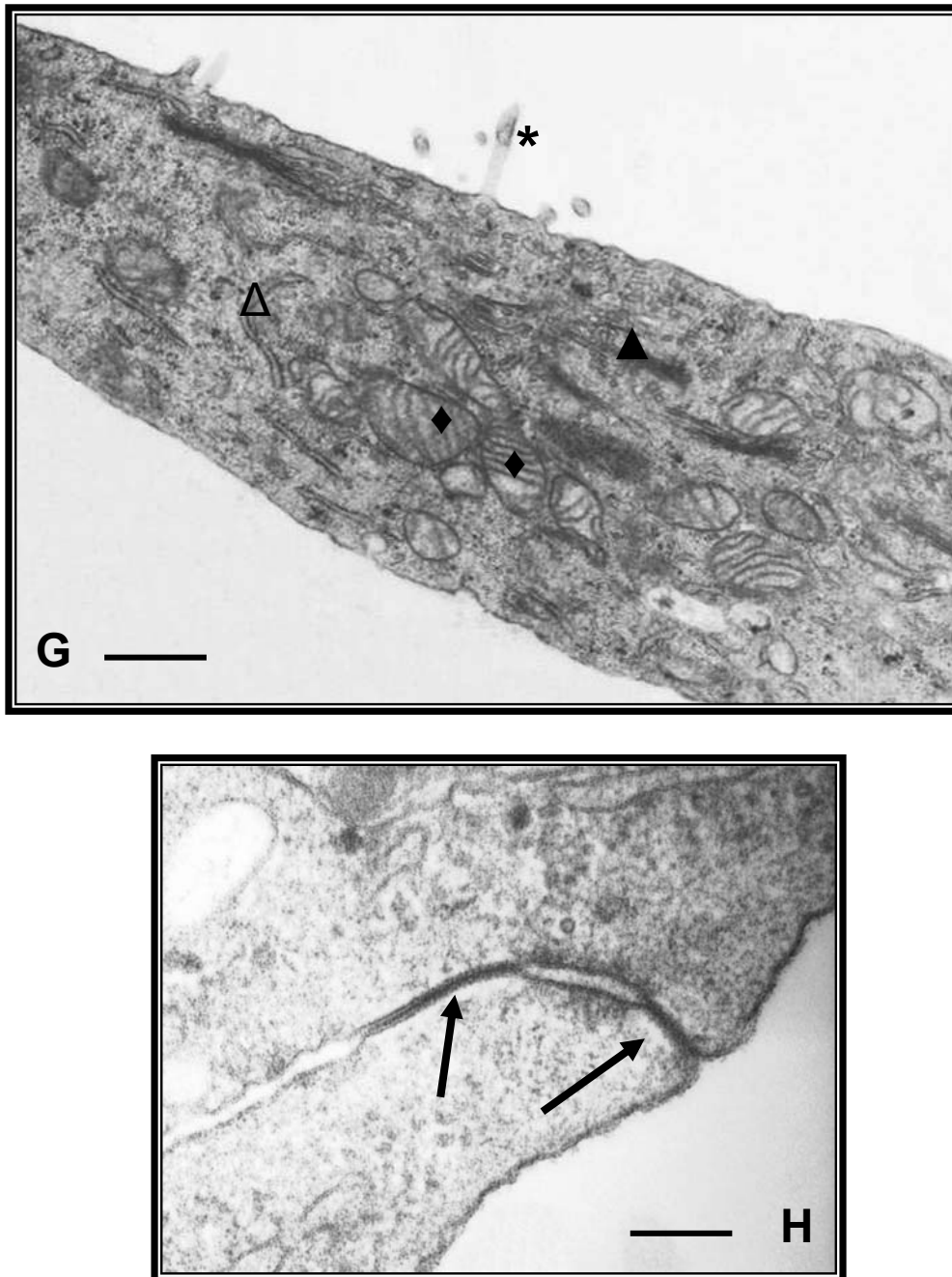


Figura 21. Micrografías electrónicas de transmisión de células IEC-6 tratadas con medio control (A y B), NT (C, D, E y F) o NU (G y H) durante 7 días. Δ : retículo endoplasmático rugoso, \blacktriangle : aparato de Golgi; \blacklozenge : mitocondrias; $*$: microvellosidades; N: núcleo celular; flecha: uniones intercelulares.

1.5. Estudio de marcadores de diferenciación celular por Inmunofluorescencia indirecta en citometría de flujo.

Para conocer el grado relativo de diferenciación adquirido por las células IEC-6 en los diferentes tratamientos, se realizaron estudios para la detección de la expresión de dos marcadores de diferenciación enterocítico: villina, que es un marcador estructural, y fosfatasa alcalina, que es un marcador funcional. De este modo, células IEC-6 fueron sembradas en placas de 75 cm² en condiciones de baja densidad celular, y tratadas con los medios control, NT y NU respectivamente durante 7 días, realizando cambios de medio cada 12 horas. Transcurrido dicho tiempo las células fueron despegadas de los frascos y procesadas para el análisis citométrico con anticuerpos específicos.

Respecto a la villina se encontró una expresión muy baja en todos los casos que no llegaba ni al 1%. Sin embargo, se observó mayor expresión en el grupo NT y NU respecto al grupo control ($p < 0.05$). El grupo control tuvo un 0.22% de expresión, mientras que el grupo NT y NU obtuvieron 0.49% y 0.46% respectivamente (Figura 22 A).

En el caso de la fosfatasa alcalina también se apreció una expresión muy baja en los diferentes cultivos, aunque se encontró un patrón inverso de expresión del marcador respecto a lo sucedido con la villina. El grupo control en este caso presentó mayor expresión de la proteína con un 1.80% que el grupo NT y NU con un 0.61% y 0.58% respectivamente ($p < 0.01$) (Figura 22 B).

Los resultados de ambos marcadores nos indican por un lado que los grupos tratados con las diferentes mezclas de nucleósidos presentan el mismo comportamiento, en cuanto a lo que la expresión de los marcadores analizados se refiere. Por otro lado nos dan una información contradictoria ya que en el caso de la villina la expresión del control es inferior al de los grupos tratados con nucleósidos, pero en el caso de la fosfatasa alcalina es al revés. Por todo ello, la decisión de la adquisición de un mayor o menor grado de diferenciación

de un tratamiento u otro tendrá que ser considerado complementando esta información con otros resultados procedentes de otras técnicas.

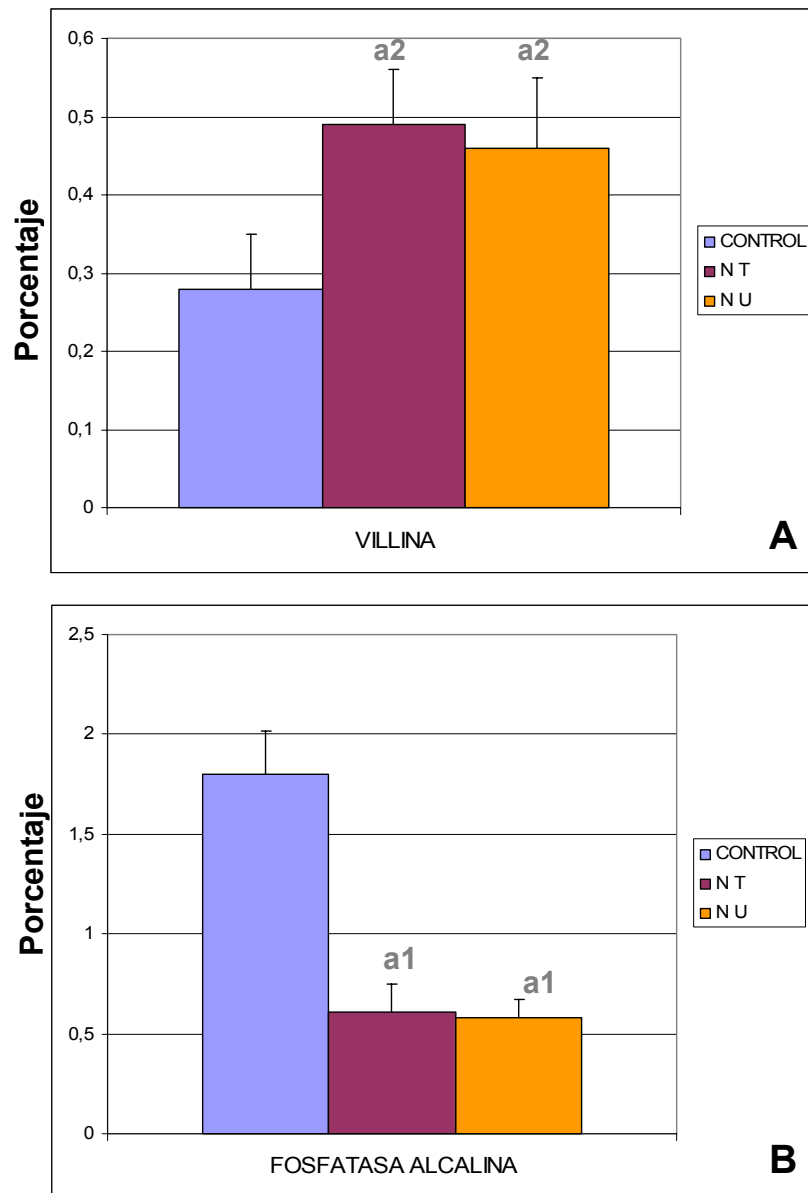


Figura 22. Análisis mediante FACScan de las modificaciones en la expresión de marcadores de diferenciación enterocítica en células IEC-6. A, villina. B, fosfatasa alcalina. Las gráficas enfrentan el tipo de tratamiento, control, NT y NU respecto al porcentaje de células que expresan el marcador correspondiente. Cada histograma representa la media de tres determinaciones, y la barra vertical la desviación estándar. a: significación frente al grupo control; 1: $p < 0.01$; 2: $p < 0.05$.

1.6. Contenido proteico total de los cultivos

Para analizar las variaciones en las cantidades totales de proteína en los cultivos tratados bien con medio control, NT o NU, se realizaron ensayos para los que se cultivaron células IEC-6 en condiciones de baja densidad celular en falcons de 75 cm², y tras 7 días de cultivo se despegaron las monocapas de células y se procedió a contabilizar las cantidades de proteína total por el método de Lowry (Lowry y cols., 1951).

Los resultados mostraron que el grupo NT ofreció un 166% respecto a la cantidad total del control, mientras que el grupo NU mostró un 65%. Estos resultados indican que las cantidades de proteína total difieren de forma radical entre los tres grupos (Figura 23).

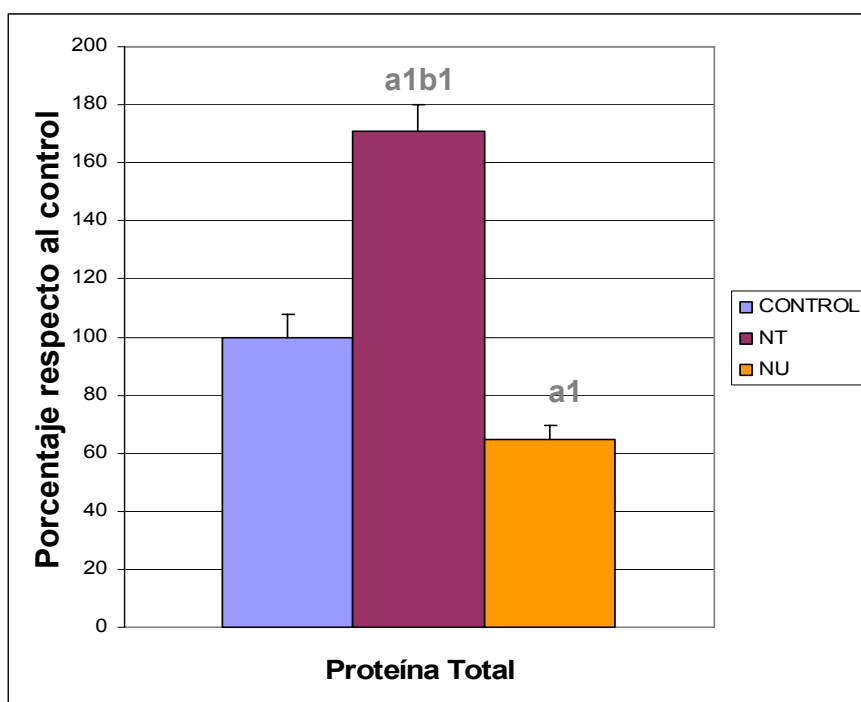


Figura 23. Producción de proteína total en células IEC-6 cultivadas durante 7 días en condiciones de baja densidad celular, y tratadas con medio de cultivo control, NT y NU respectivamente. Cada histograma representa la media de tres determinaciones y la barra vertical la desviación estándar. a: significación frente al grupo control; b: significación entre los grupos NT y NU; 1:p<0.01.

2 ENSAYOS A ALTA DENSIDAD CELULAR

El cultivo de las células IEC-6 en confluencia produce la activación del proceso de diferenciación celular (Ametani y cols., 1996; Wood y cols., 2003). Para conocer el efecto de los nucleósidos exógenos sobre dicho proceso, se realizaron varios ensayos utilizando unas condiciones iniciales diferentes a las empleadas en los ensayos precedentes. Para estos estudios las células fueron sembradas a una densidad de 100.000 células / cm², partiendo de esta manera de una situación de confluencia celular.

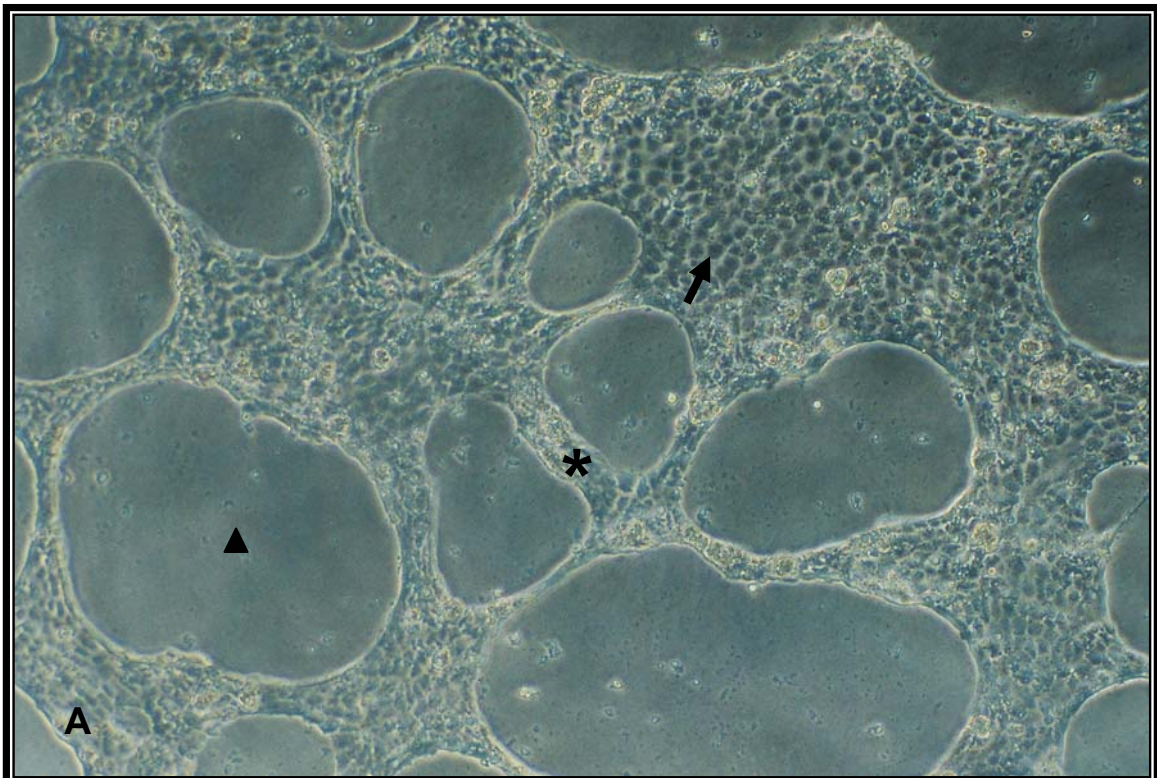
2.1 Estudio morfológico de las células a microscopía óptica

Las posibles variaciones morfológicas de las células IEC-6 cultivadas en condiciones de alta densidad celular, y tratadas con medios de cultivo control, NT y NU respectivamente, fueron estudiadas al quinto día de cultivo contando a partir de las 24 horas posteriores a la siembra. Dicho estudio se llevó a cabo mediante la observación directa de las células bajo un microscopio invertido de contraste de fase. Como control positivo de la organización tisular diferenciada se utilizó un cultivo de células IEC-6 crecidas sobre una capa de Matrigel. Este material está considerado como un soporte adecuado para la inducción de la diferenciación de células IEC-6. Para ello, se sembraron células IEC-6 en placas de 24 pocillos sobre una capa de Matrigel a una densidad de 100.000 células / cm². Transcurridas 24 horas desde la siembra se procedió a estudiar la morfología del cultivo bajo un microscopio de contraste de fase.

El control positivo presentó un aspecto muy característico, constituido por la organización de las células delimitando unos espacios vacíos de células con forma circular u ovoide. Así mismo se encontraron dos formas en la asociación de las células. Por un lado existen zonas donde se puede delimitar claramente los bordes celulares, mientras que en otras zonas las células se encuentran formando agregados, siendo imposible la determinación de los límites. Esta última forma aparece especialmente constituyendo los bordes de los espacios vacíos de células (Figura 24 A).

El cultivo tratado con medio control se caracterizó por poseer un aspecto heterogéneo, donde se pudo distinguir los dos tipos de asociación de las células observado en el control positivo. Por un lado se encontraron regiones del cultivo donde se pudo distinguir los bordes celulares, intercalados con zonas difusas sin límites apreciables (Figura 24 B).

Los dos grupos tratados con nucleósidos, presentaron una apariencia similar. Del mismo modo que el anterior, se encontraron las dos formas de asociación, pero la característica diferenciadora más llamativa fue la detección de estructuras esféricas u ovoides generalmente, similares a las encontradas en el control positivo. Estas estructuras, estaban delimitadas periféricamente por el tipo de agregación celular sin límites distinguibles. Además, se apreció una menor cantidad de agregados celulares en los que se puede distinguir los bordes celulares, en comparación con el grupo control. Los espacios vacíos de células aparecían a lo largo del cultivo de forma regular, y como estructuras independientes o como asociaciones de dos o mas espacios, y los bordes libres se encontraban engrosados verticalmente de manera que se tenían que enfocar en un plano diferente al resto del cultivo (Figura 24 C y D).



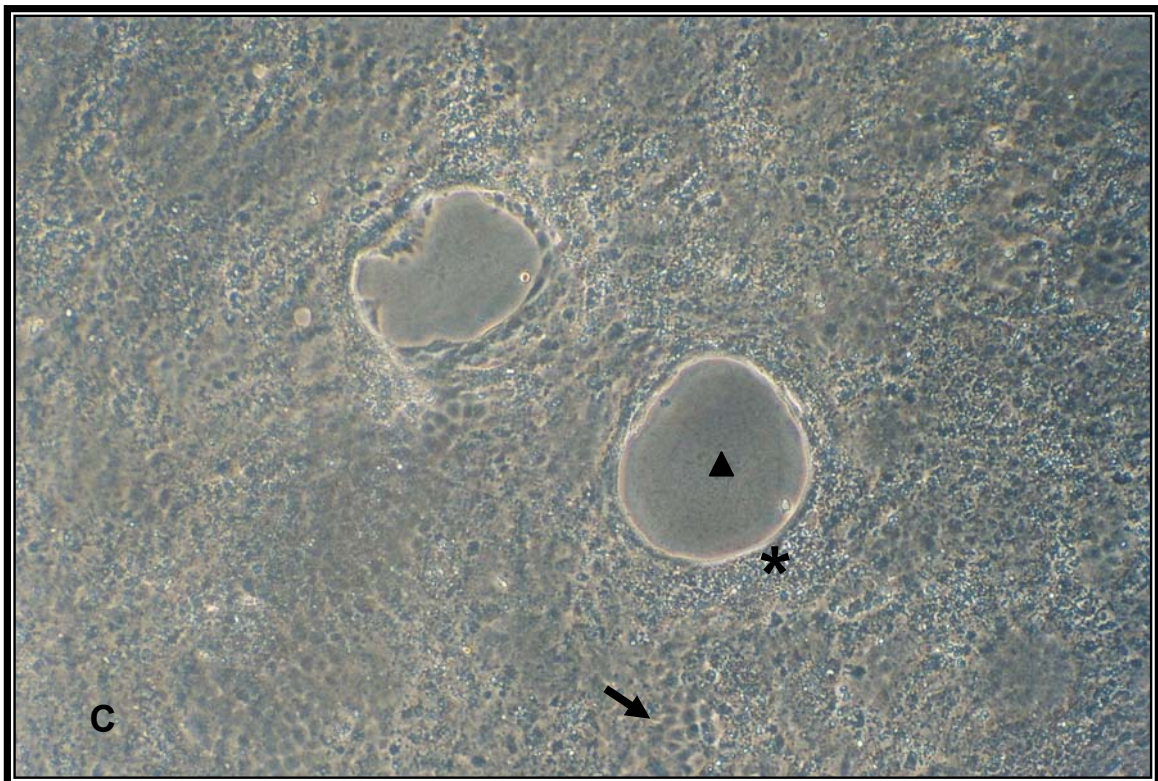
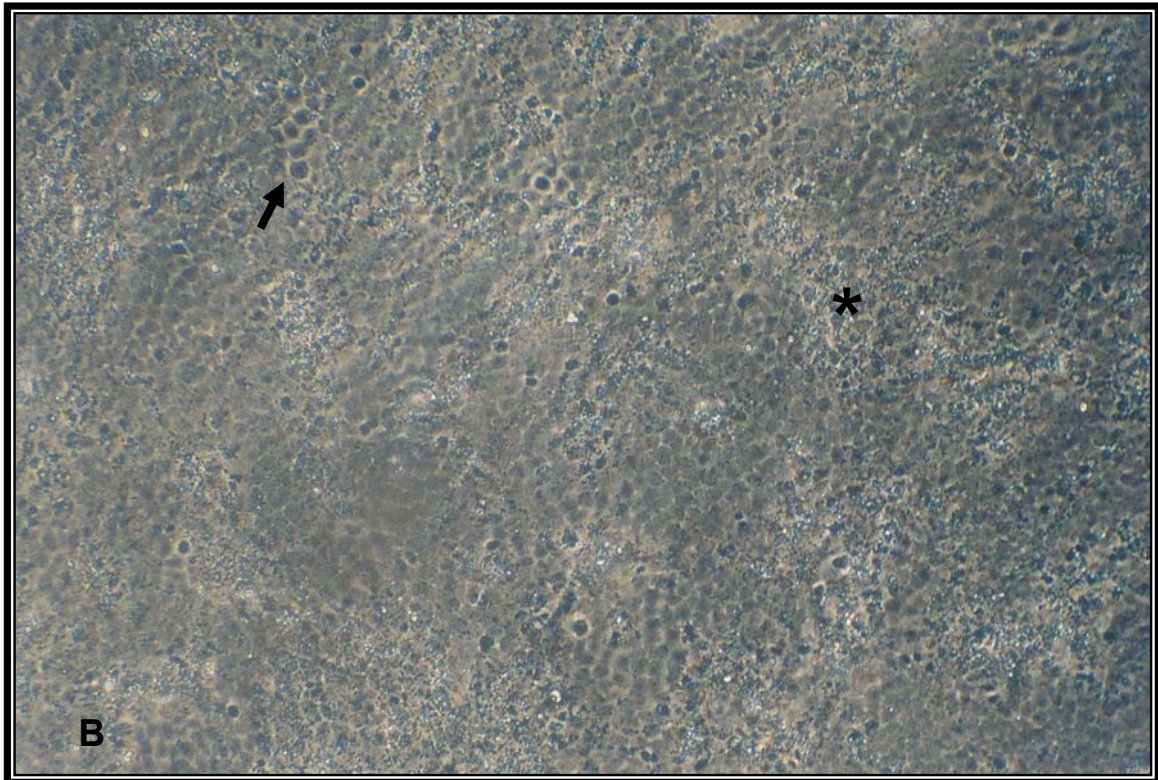




Figura 24. Estudio mediante microscopía óptica de las células IEC-6 en condiciones de alta densidad celular. A, control positivo constituido por células crecidas sobre Matrigel durante 24 horas. B, células tratadas con medio experimental control a los 5 días de cultivo. C, células tratadas con el medio NT a los 5 días de cultivo. D, células tratadas con el medio NU a los cinco días de cultivo. El triángulo representa la localización de espacios vacíos de células. La flecha indica zonas del cultivo donde se pueden distinguir los bordes celulares. El asterisco indica zonas donde las células se encuentran agregadas y no es posible delimitar los contornos celulares. Magnificación en todas las fotografías 100X.

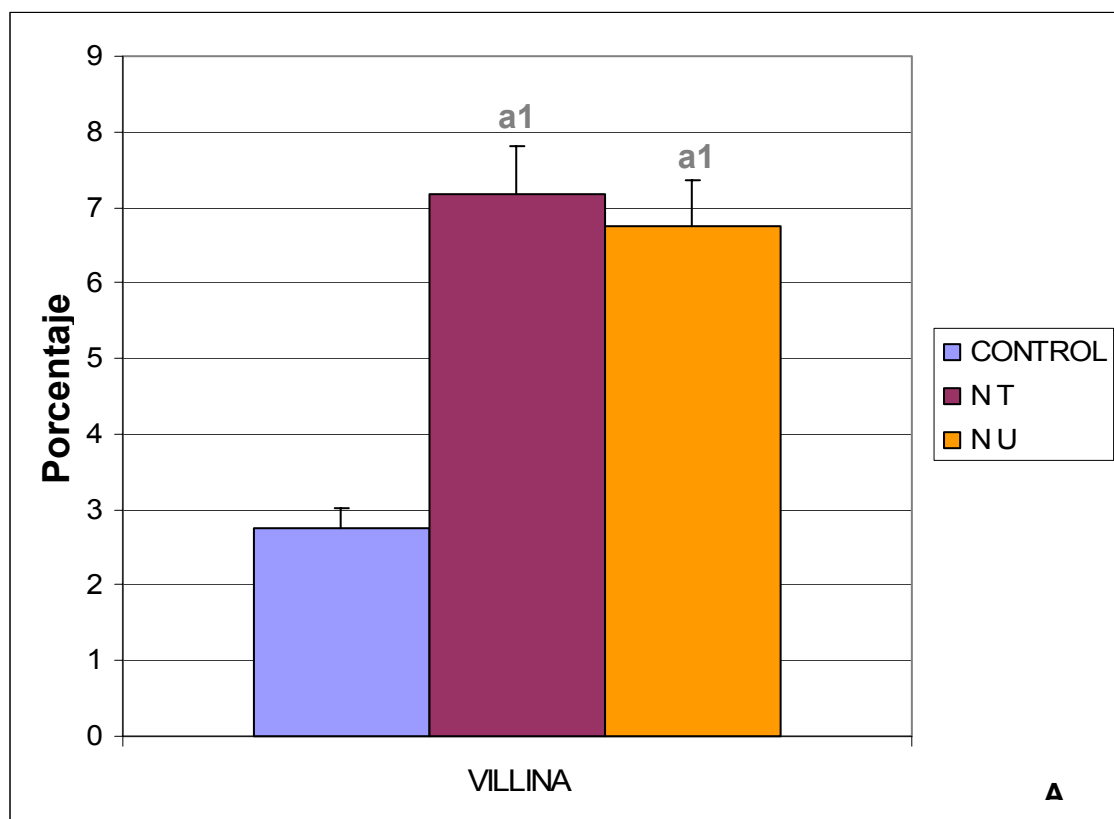
2.2 Determinación de los marcadores de diferenciación celular por inmunofluorescencia indirecta.

Para estudiar el grado de diferenciación adquirido por las células IEC-6 con los respectivos tratamientos, se realizaron estudios para la detección de los niveles de expresión de las proteínas villina y fosfatasa alcalina. De este modo, células IEC-6 fueron sembradas en placas de 75 cm² en condiciones de alta densidad celular, y tratadas con los medios de cultivo control, NT y NU respectivamente durante 5 días, realizando cambios de medio cada 12 horas.

Transcurrido dicho tiempo las células fueron despegadas de los frascos y procesadas para el análisis citométrico con anticuerpos específicos.

Respecto a la villina, el porcentaje de células del cultivo que expresaron la proteína en el grupo control fue de 2.76%, para el grupo NT 7.17% y para el NU 6.76% (Figura 25 A). En el caso de la fosfatasa alcalina se encontró una expresión del 2.89% para el control, 1.46% para el grupo NT y 1.47% para el grupo NU (Figura 25 B).

Estos resultados indican un comportamiento similar de los dos grupos tratados con nucleósidos, respecto al control. Desde otro punto de vista, resulta paradójico como para la villina, los grupos tratados con nucleósidos tienen mayor expresión que el control y para la fosfatasa alcalina se produce el efecto inverso, siendo ambas proteínas marcadores de diferenciación enterocítica.



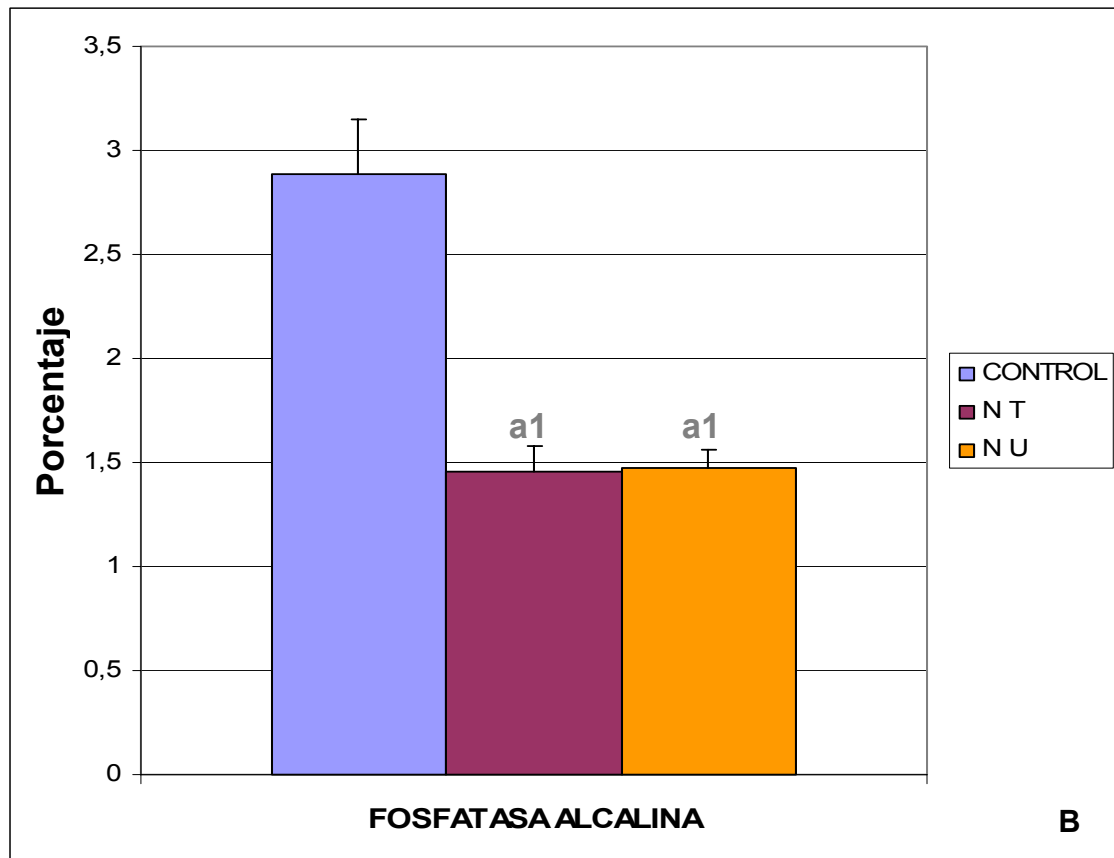


Figura 25. Análisis mediante FACScan de las modificaciones en la expresión de marcadores de diferenciación enterocítico en células IEC-6, cultivadas en condiciones de alta densidad celular. A, villina. B, fosfatasa alcalina. Las gráficas enfrentan el tipo de tratamiento, control, NT y NU respecto al porcentaje de células que expresan el marcador correspondiente. Cada histograma representa la media de tres determinaciones, y la barra vertical la desviación estándar. a: significación frente al grupo control; $1:p<0.01$.

2.3. Contenido proteico total de los cultivos

Para analizar las variaciones en las cantidades totales de proteína de los cultivos tratados bien con medio control, NT o NU, se realizaron ensayos para los que se cultivaron células IEC-6 en condiciones de alta densidad celular en falcons de 75 cm^2 , tras 5 días de cultivo se despegaron las monocapas y se procedió a contabilizar las cantidades de proteína total por el método de Lowry (Lowry y cols., 1951).

Los resultados indicaron que el grupo NT mostró un 128% y el grupo NU un 136% respecto a la cantidad total del control. En este sentido, los valores alcanzados por los grupos tratados con nucleósidos no presentan diferencias estadísticamente significativas entre ellos (Figura 26).

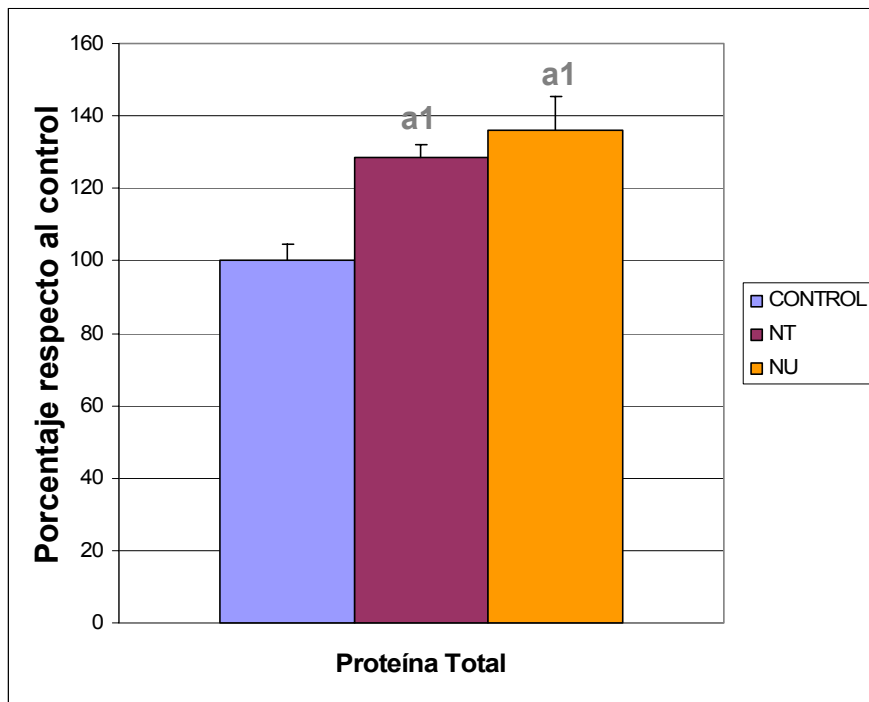


Figura 26. Producción de proteína total en células IEC-6 cultivadas durante 5 días en condiciones de alta densidad celular, y tratadas con medio de cultivo control, NT y NU respectivamente. Cada histograma representa la media de tres determinaciones y la barra vertical la desviación estándar. a: significación frente al grupo control; 1:p<0.01.

2.4. Estudio de marcadores de diferenciación mediante Western-Blot

Para comprobar por otra técnica los resultados obtenidos en la cuantificación de los porcentajes de expresión de villina y fosfatasa alcalina por citometría de flujo, se sembraron células IEC-6 en condiciones de alta densidad celular y fueron tratadas con medio control, NT y NU respectivamente. Tras 5 días de cultivo se levantaron las capas de células y se procesaron para la determinación de la expresión de los marcadores por Western-Blot. Los

resultados encontrados ratifican los obtenidos por citometría de flujo, apareciendo unos niveles de expresión de villina para las células tratadas con nucleósidos superior al grupo control, mientras que para el caso de la fosfatasa alcalina el resultado fue inverso. En la siguiente tablan se muestra los valores de expresión de los marcadores, expresados como el porcentaje que tienen respecto al control.

	VILLINA	FOSFATASA A.
CONTROL	100 ± 13.84	100 ± 8.29
NT	229.71 ± 14.24*	57.95 ± 5.31*
NU	239.65 ± 18.59*	55.94 ± 8.19 *

*: Diferencia significativa respecto al grupo control $p < 0.01$

3. ENSAYOS DE RECUPERACIÓN FRENTE AL TRATAMIENTO CON 5-FLUOROURACILO

Los ensayos encaminados al estudio del efecto de los nucleósidos exógenos sobre la recuperación del epitelio intestinal, tras el pretratamiento con 5-fluorouracilo, fueron realizados utilizando las células IEC-6 cultivadas a una densidad de 5.000 células / cm².

3.1. Curva de crecimiento

Células IEC-6 fueron sembradas en placas de 24 pocillos a una densidad de 5 000 células / cm², pretratadas con 5-fluorouracilo, excepto el grupo control e incubadas con medio de cultivo experimental sin nucleósidos (grupo control-5Fu y grupo control) o con alguna de las dos mezclas NT (grupo NT-5Fu) o NU (grupo NU-5Fu). Cada día se tomaron muestras de todos los tratamientos, que fueron procesadas para el contaje del número de células con tinción de sulforrodamina B, hasta un total de 7 días (Figura 27).

El primer día tras la aplicación del 5-Fluorouracilo se contabilizaron 19.127 células en el grupo control, que presentó diferencias estadísticamente significativas respecto a los otros grupos, que se mantuvieron hasta el final del ensayo. El grupo control-5Fu tuvo 4 145 células, el grupo NT-5Fu 9 343 y el grupo NU-5Fu 9 413. El tercer día se caracterizó por un incremento en la proliferación del grupo NT-5Fu, que con 18 822 células fue estadísticamente diferente al grupo control-5Fu que contaba con 5 368 células. El control tenía 75 691 células y el grupo NU-5Fu 11 789. En el cuarto día, el grupo NT-5Fu continuó con su impulso proliferativo distanciándose aún más del grupo control-5Fu. Además, estrenó diferencias significativas respecto al grupo NU-5Fu. En este momento el número de células fue de 97 705 para el control, 2 005 para el control-5Fu, 43 587 para el grupo NT-5Fu y 37 167 para NU-5Fu. A partir de ese momento, las diferencias existentes entre los grupos experimentales se mantuvieron hasta el final del ensayo. En el día 7, el número final de células fue de 213 291 para el control, 6 591 para el grupo control-5Fu, 156 409 para el grupo NT-5Fu y 72 328 para el NU-5Fu.

El crecimiento del grupo control presentó un perfil típico de crecimiento para una línea celular. El control con pretratamiento de 5-Fluorouracilo sufrió una caída inicial del 60% de la población celular que se continuó con fluctuaciones del número de células sin que se consiguiera en ningún momento valores superiores al 70% del número de células sembradas inicialmente. El grupo NT-5Fu experimentó a partir del tercer día una mejora importante en su crecimiento, que sin llegar a igualarse al grupo control se mantuvo muy distanciado de los grupos NU-5Fu y control-5Fu. El grupo NU-5Fu mejoró la situación del grupo control-5Fu pero permaneció alejado del NT-5Fu.

A tenor de los resultados obtenidos se puede concluir que el efecto de los diferentes medios de cultivo es muy variado. El pretratamiento con 5-Fluorouracilo afecta de manera radical a la evolución del crecimiento de la línea IEC-6. Dicho efecto se ve parcialmente contrarrestado por la adición de nucleósidos en los medios de cultivo. La mezcla NT resultó más eficaz que la NU, consiguiendo unos valores de crecimiento 2.16 veces mayor.

El análisis de la pendiente de cada intervalo de crecimiento refleja en primer lugar que el grupo control presentó mayor aceleración en el crecimiento en todos los tramos considerados excepto en el 4º que es tímidamente superado por el grupo NT-5Fu y el 5º, donde el grupo NT-5Fu manifestó un impulso 1.34 veces superior al del grupo control. El grupo control-5Fu sufrió una alternancia entre períodos de crecimiento negativo (tramos 1, 3, 4 y 7) y positivo (tramos 2, 5 y 6). El grupo NT-5Fu mantuvo en los dos primeros tramos un crecimiento negativo, que a partir del tercero se hace positivo y se va incrementado hasta el valor máximo obtenido en el tramo 5, reduciéndose posteriormente hasta el 7º. El grupo NU-5Fu, al igual que el NT-5Fu, sufrió un decrecimiento en los dos primeros tramos iniciales que se hizo positivo a partir del tercero, alcanzando el valor máximo en el 6º tramo reduciéndose en el 7º (Figura 28).

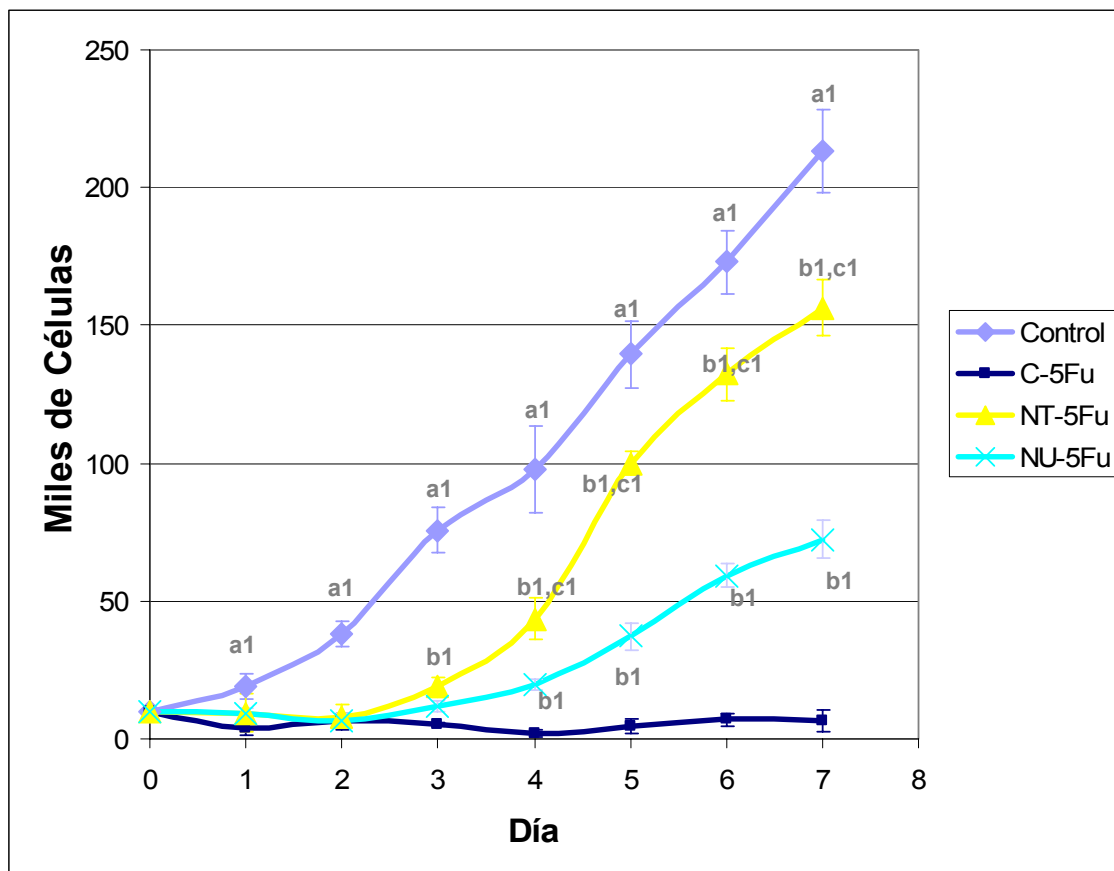


Figura 27. Efecto de las mezclas NT y NU sobre la recuperación del pretratamiento con 5-Fluorouracilo en células IEC-6. Las células fueron pretratadas con el fármaco (excepto el grupo control) e incubadas con medio control, NT o NU. Para cada día considerado, se representa el número de células como la media de cuatro determinaciones, junto con las barras de desviación estándar. a: diferencias significativas entre el grupo control y el resto de grupos experimentales, simultáneamente; b: significación frente al grupo control-5Fu; c: significación entre grupos NT-5Fu y NU-5Fu; $1;p<0.01$.

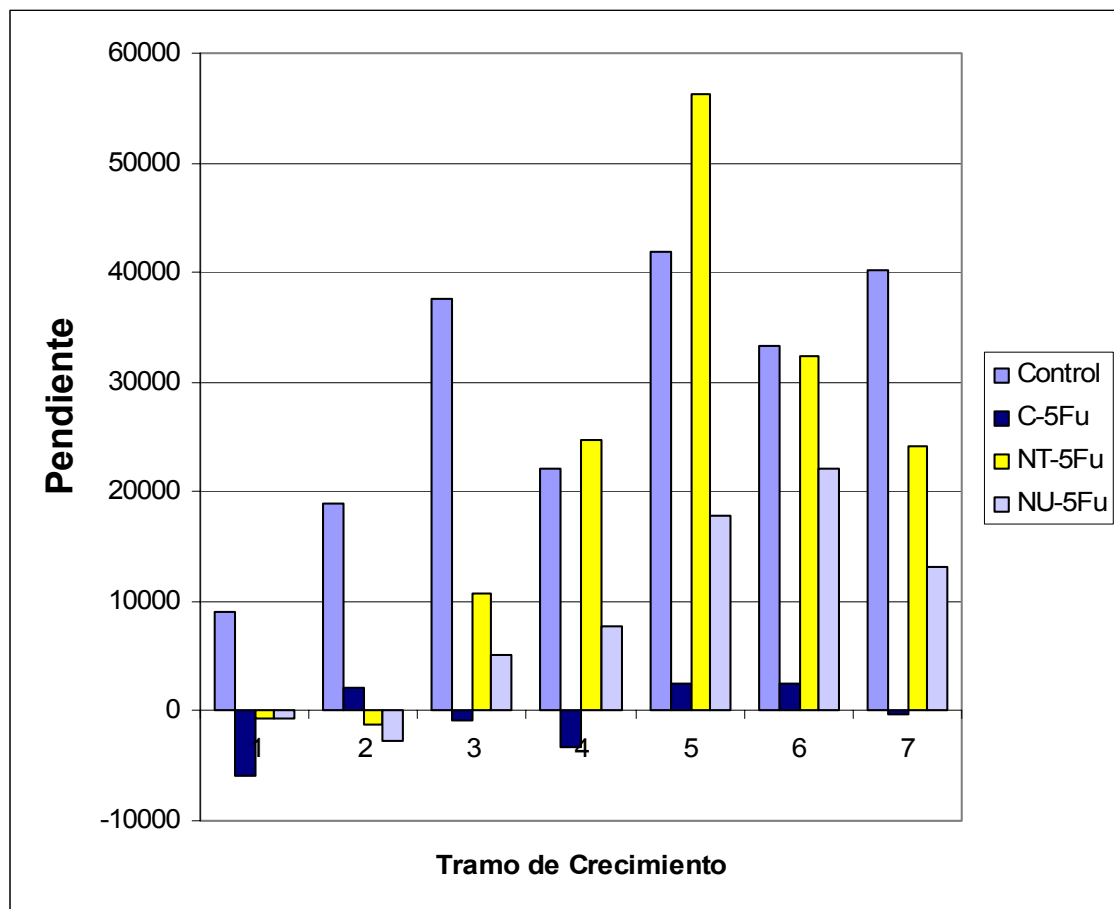


Figura 28. Representación gráfica de los valores de pendiente de cada tramo de crecimiento, calculado como el incremento del número de células respecto al incremento de tiempo.

3.2. Determinación del número de células mediante cámara de Neubauer

Se sembraron células IEC-6 a una densidad de 5.000 células / cm² en Falcons de 75 cm². Fueron pretratadas con el fármaco 5-Fluorouracilo (excepto

el grupo control) y posteriormente mantenidas medio control (grupo control y control-5Fu), NT (grupo NT-5Fu) y NU (NU-5Fu) respectivamente, realizándose un cambio de medio de cultivo cada 12 horas. Al séptimo día se levantó la monocapa de células y se determinó el número total de células (Figura 29).

Así, el número de células contadas al cabo de los días fue de 7.862.500, para el grupo control y 197.500, 4.660.000 y 2.015.000 para los grupos control-5Fu, NT-5Fu y NU-5Fu respectivamente. Estos resultados confirmaron las diferencias encontradas en la curva de crecimiento realizada con la tinción de sulforrodamina B. El grupo control sin pretratamiento con 5-Fluorouracilo experimentó la mayor tasa de proliferación, seguido del tratamiento con NT-5Fu, NU-5Fu y finalmente el grupo control-5Fu. Todos los grupos tuvieron diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($p < 0.01$).

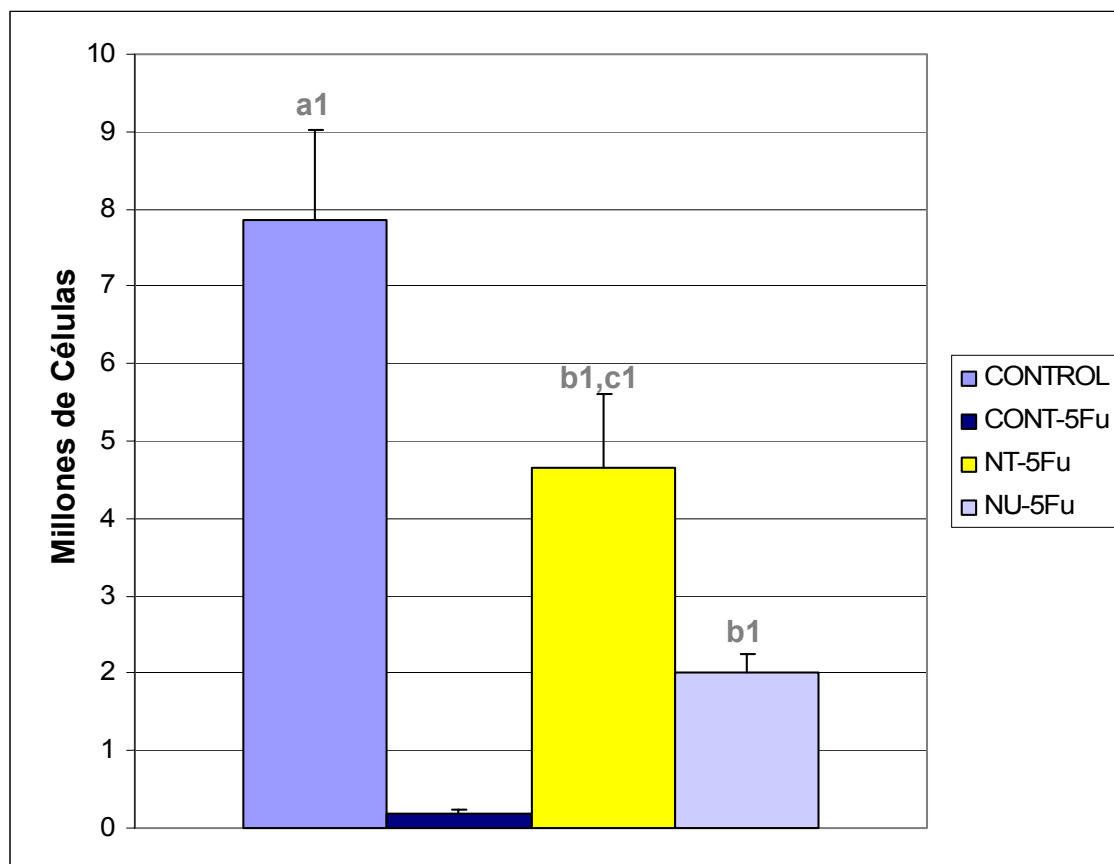


Figura 29. Efecto de las mezclas NT y NU sobre la recuperación del pretratamiento con 5-Fluorouracilo en células IEC-6. Las células fueron pretratadas con el fármaco (excepto el grupo control) e incubadas con medio control, NT o NU. La gráfica representa el número de células como la media de tres determinaciones, junto con las barras verticales de desviación estándar. a: diferencias significativas entre el grupo Control y el resto de grupos experimentales, simultáneamente; b: significación frente al grupo Control-5Fu; c: significación entre grupos NT-5Fu y NU-5Fu; $1:p<0.01$.

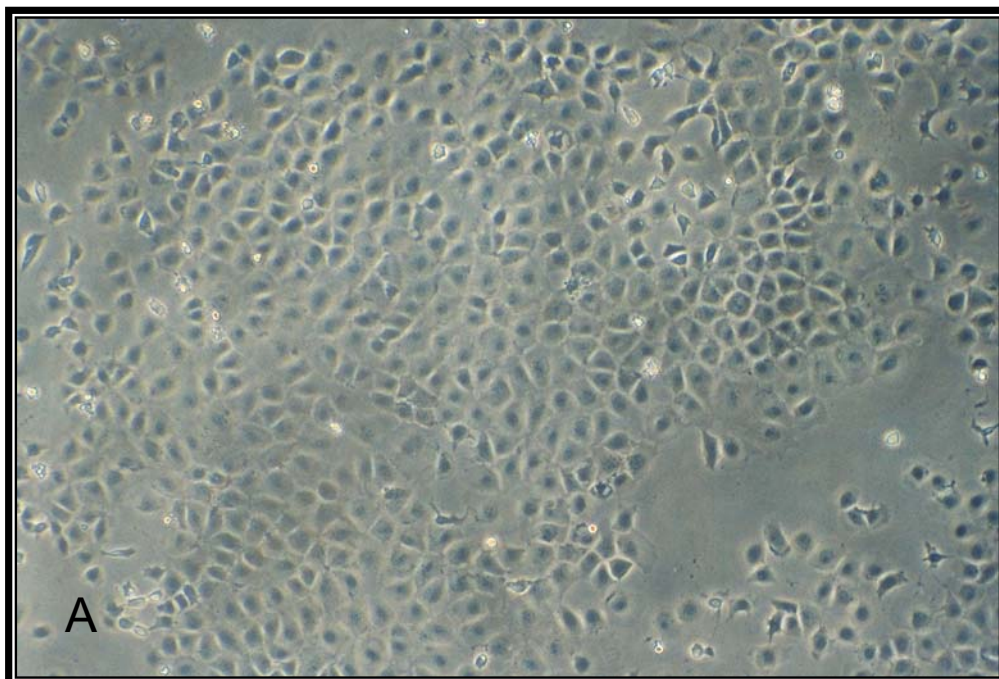
3.3. Estudio morfológico de las células a microscopía óptica

Las posibles variaciones morfológicas de las células IEC-6 en los ensayos de recuperación frente al 5-Fluorouracilo fueron estudiadas mediante la observación directa de las células bajo un microscopio invertido de contraste de fase. Las células fueron cultivadas a una densidad de 5.000 células / cm² en Falcons de 75 cm². Fueron pretratadas con el fármaco 5-Fluorouracilo (excepto el grupo control) y posteriormente mantenidas con medio control (grupo control y control-5Fu), NT (grupo NT-5Fu) y NU (NU-5Fu) respectivamente, realizándose un cambio de medio de cultivo cada 12 horas. Al séptimo día las células fueron estudiadas al microscopio óptico.

El grupo control presentó un aspecto homogéneo, donde las células poligonales se disponían constituyendo colonias bien definidas y cohesionadas (Figura 30 A). Por el contrario, el grupo control-5Fu se caracterizó además de por la baja densidad de células existentes, por contener mayoritariamente células hipertróficas, de aspecto redondeado con escasos contactos intercelulares (Figura 30 B). En los grupos experimentales recuperados con las mezclas de nucleósidos se observó el crecimiento de colonias con aspecto normalizado, aunque con la existencia de gran cantidad de células hipertróficas en comparación con el grupo control (Figura 30 C).

Como conclusión, el 5-Fluorouracilo afecta de manera importante a la morfología de las células en cultivo, y la adición de nucleósidos en los medios de cultivo parece amortiguar este efecto, adquiriendo la monocapa de células

un aspecto mucho más parecido a la situación control sin pretratamiento con el fármaco.



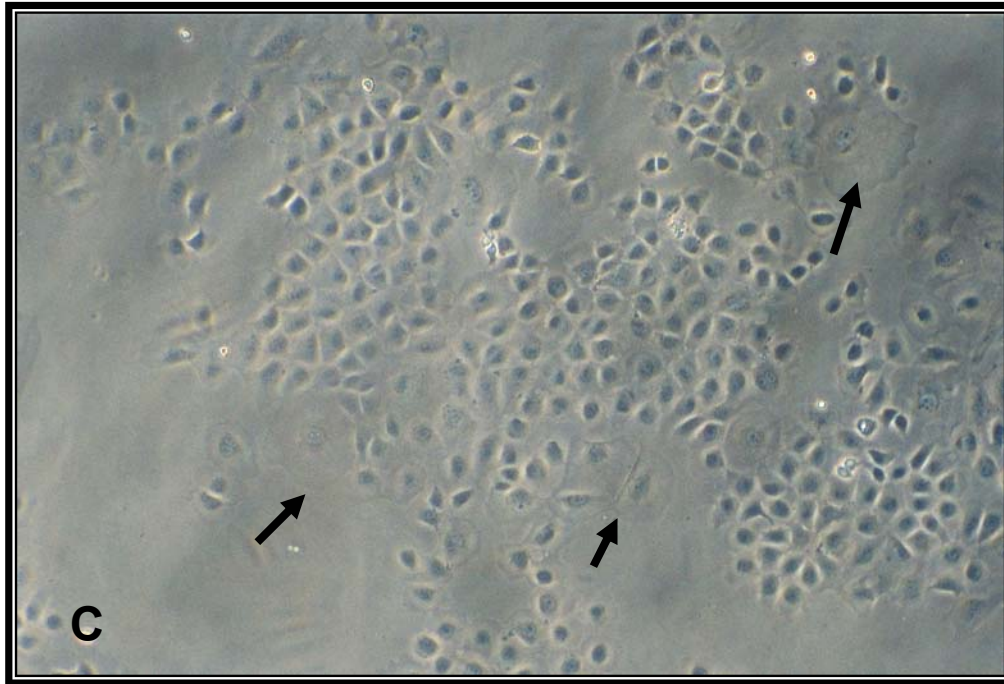
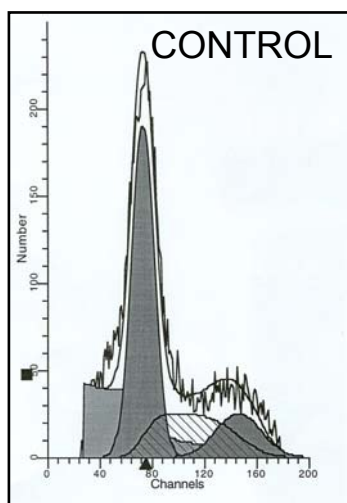


Figura 30. Estudio mediante microscopía óptica de contraste de fase de células IEC-6 en ensayos de recuperación frente al pretratamiento con 5-Fluorouracilo, en el día 7°. A, control sin pretratamiento con 5-Fluorouracilo. B, control con pretratamiento con 5-Fluorouracilo. C, células tratadas con 5-Fluorouracilo y recuperadas con medio NT. Las flechas indican la localización de células hipertróficas. Magnificación en todas las imágenes de 100X.

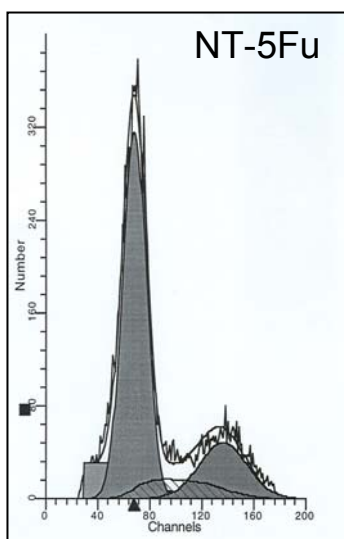
3.3. Análisis de la distribución del ciclo celular

Para determinar posibles modificaciones en el ciclo celular provocadas por la presencia de nucleósidos, en la recuperación del tratamiento con 5-Fluorouracilo, se realizaron estudios con las células IEC-6 que fueron sembradas a una densidad de 5000 células / cm² en Falcons de 75 cm². Fueron pretratadas con el fármaco 5-Fluorouracilo (excepto el grupo control) y posteriormente mantenidas con medio control (grupo control), NT (grupo NT-5Fu) y NU (NU-5Fu) respectivamente, realizándose un cambio de medio de cultivo cada 12 horas. Al cabo de 7 días se recolectaron las células y fue analizada la distribución del ciclo celular.

El análisis por citometría de flujo mostró para el grupo control un 60.73% de células en las fases G0-G1, un 15.55% en las fases G2-M y un 23.73% en la fase de síntesis. El grupo NT-5Fu obtuvo un 69.03% de células en fase G0-G1, un 9.28% en fase G2-M y un 21.69% en la fase de síntesis. El grupo NU tuvo un 59.48% de células en fase G0-G1, un 5.78% en fase G2-M y un 34.74% en la fase de síntesis (Figura 31). Respecto al grupo control-5Fu, no se consiguió obtener un millón de células para cada determinación, por lo que fue excluido del análisis.



GO/G1: 60,73 ± 3,68 %
G2/M: 15,55 ± 2,70 %
SÍNTESIS: 23,73 ± 2,20 %



GO/G1: 69,03 ± 1,06 %
G2/M: 9,28 ± 0,43 %
SÍNTESIS: 21,69 ± 0,88 %

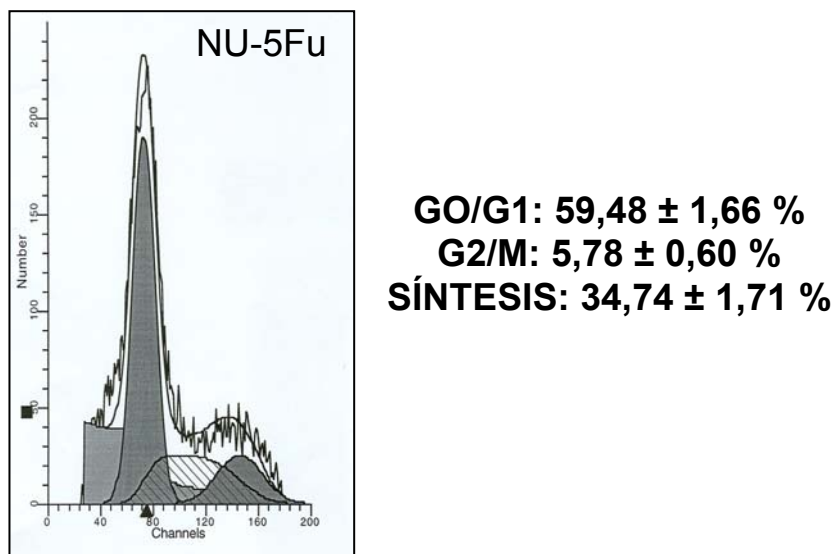


Figura 31. Análisis mediante FACScan del efecto de los nucleósidos exógenos sobre el ciclo celular, en ensayos de recuperación frente al tratamiento con 5-Fluorouracilo. Se representa para el grupo control, NT-5Fu y NU-5Fu respectivamente una gráfica a la izquierda, que refleja el número de células que aparecen en cada fase del ciclo celular. A la derecha aparecen los valores medios de tres determinaciones junto con la desviación estándar.

Las células tratadas con el medio NT se diferenciaron de las células control en una mayor localización en las fases G0-G1 y una reducción de algo más del 40% de las fases G2-M. El grupo NU-5Fu también sufrió una reducción de las fases G2-M, aún más pronunciada que el anterior (más del 60%), aunque no se afectaron las fases G0-G1. Además, experimentaron un incremento en la localización en la fase de síntesis 1.46 veces superior al control. El comportamiento de los grupos tratados con nucleósidos fue diferente en todas las fases del ciclo celular. El grupo NT-5Fu obtuvo mayor valor en las fases G0-G1 y G2-M, y menor valor en fase de síntesis que las células tratadas con el medio NU (Figura 32).

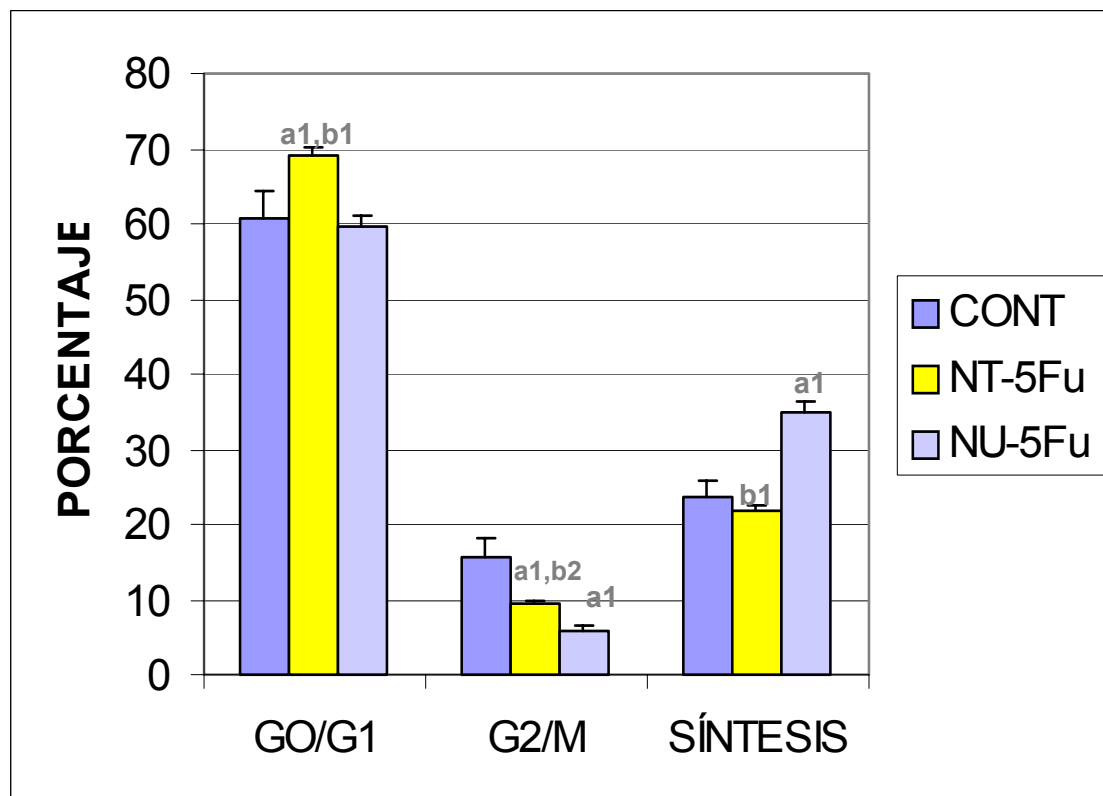


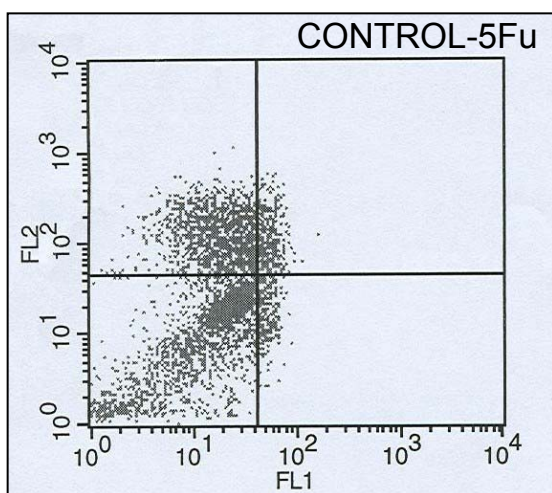
Figura 32. Análisis mediante FACScan del efecto de los nucleósidos exógenos sobre el ciclo celular, en ensayos de recuperación frente al tratamiento con 5-Fluorouracilo. Cada histograma representa la media de tres determinaciones y la barra vertical la desviación estándar. a: significación frente al grupo control; b: significación entre los grupos NT-5Fu y NU-5Fu; 1: $p < 0.01$; 2: $p < 0.05$.

3.4. Ensayo de viabilidad, necrosis y apoptosis.

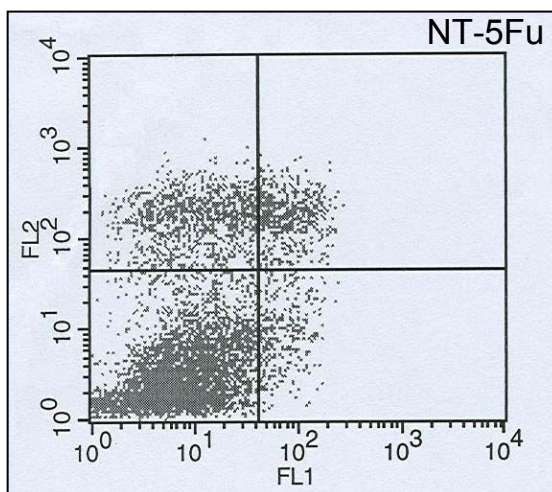
Se realizaron estudios sobre el efecto del pretratamiento con 5-Fluorouracilo y la recuperación en presencia o ausencia de nucleósidos, sobre los porcentajes de células viables, apoptóticas y necróticas de los cultivos. Para ello, las células fueron sembradas a una densidad de 5000 células / cm^2 en Falcons de 75 cm^2 . Fueron pretratadas con el fármaco 5-Fluorouracilo y posteriormente mantenidas con medio control (control-5Fu), NT (grupo NT-5Fu) o NU (NU-5Fu) respectivamente, realizándose un cambio de medio de cultivo cada 12 horas. Transcurridos 7 días, contados a partir de las 24 horas posteriores a la siembra, las células fueron levantadas de los falcons y

procesadas para su estudio en citometría de flujo con ioduro de propidio y Anexina V conjugada con fluoresceína.

Los valores resultantes fueron, para el grupo control-5Fu un 53.58% de células viables, un 30.48% de necrosis y un 15.94% de apoptosis. El grupo NT-5Fu presentó un 69.26%, 17.24% y 13.50% respectivamente, y para el grupo NU-5Fu, 65.15%, 25.24% y 9.61% respectivamente (Figura 33).



VIABLES 53,58 ± 3,42 %
NECRÓTICAS 30,48 ± 1,51 %
APOPTÓTICAS 15,94 ± 1,93 %



VIABLES 69,26 ± 2,46 %
NECRÓTICAS 17,24 ± 1,89 %
APOPTÓTICAS 13,50 ± 1,06 %

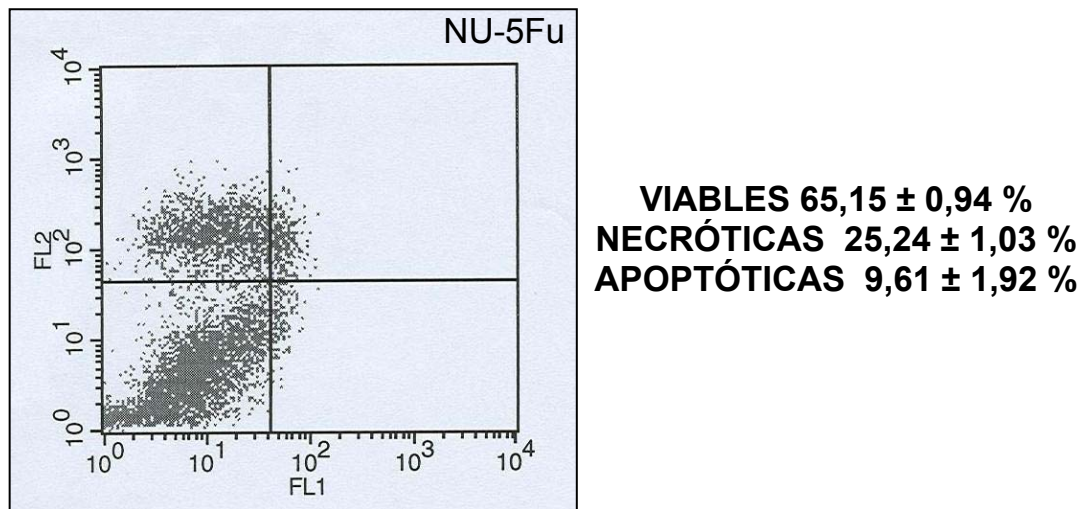


Figura 33. Análisis mediante FACScan del efecto de los nucleósidos exógenos sobre la viabilidad celular, necrosis y apoptosis. A la izquierda aparece una gráfica que refleja para cada tratamiento, la posición de cada célula evaluada, respecto a los cuadrantes que representan la viabilidad (abajo a la izquierda), necrosis (arriba a la izquierda) y apoptosis (a la derecha). A la derecha se expresan los valores medios de tres determinaciones, junto con la desviación estándar.

Las células tratadas con los medios de cultivo con nucleósidos demostraron tener mayor viabilidad celular ($p < 0.01$) y menor porcentaje de células necróticas ($p < 0.01$), respecto al grupo control. Sin embargo, el grupo recuperado con la mezcla NT presentó diferencias significativas con el grupo NU-5Fu en cuanto a menor necrosis celular y mayor apoptosis ($p < 0.01$ y $p < 0.05$, respectivamente). Un dato a resaltar es que el grupo NT-5Fu, teniendo los niveles más bajos de necrosis, no alcanza diferencias significativas de apoptosis con el grupo control, aún teniendo unos valores medios más bajos. (Figura 34).

Estos resultados indican que la presencia de nucleósidos en el medio extracelular, conduce a una mejor respuesta en la recuperación epitelial tras la agresión quimioterápica, aunque el tipo de mezclas de nucleósidos utilizada implica diferencias en el perfil de dicha recuperación.

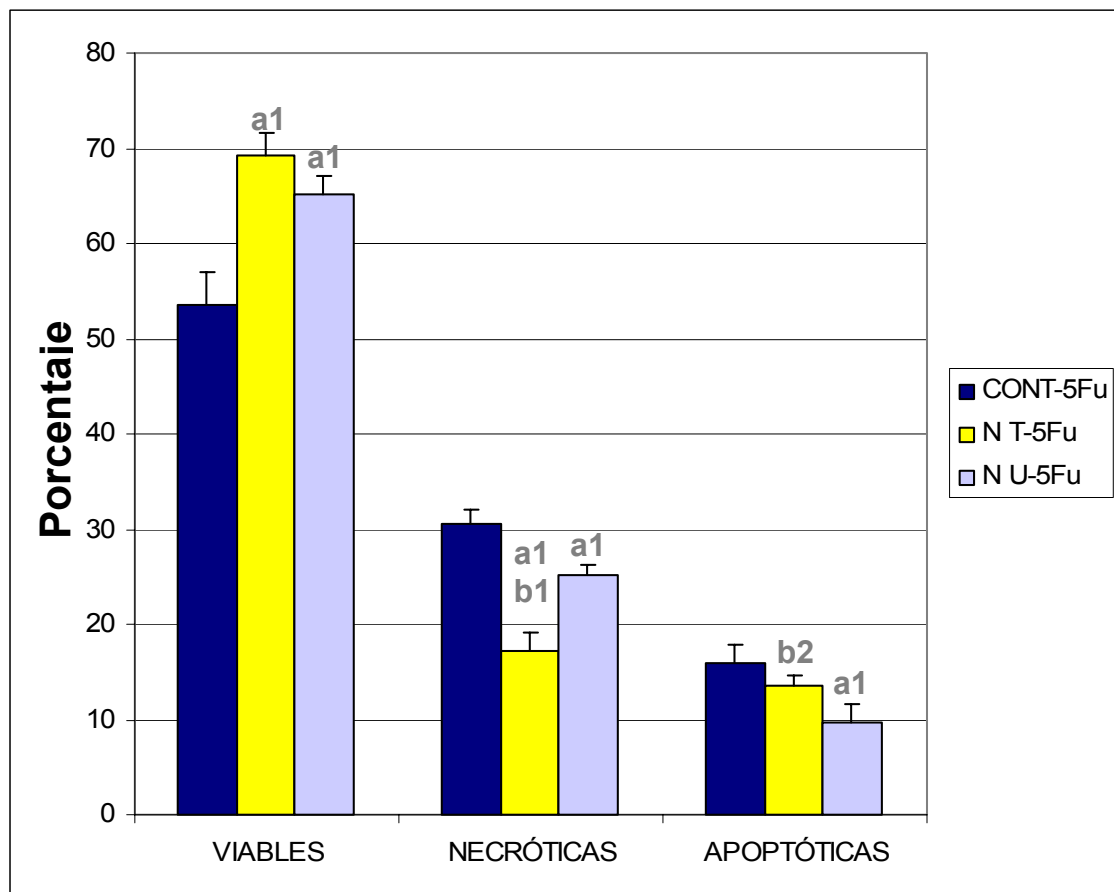


Figura 34. Análisis del efecto de los nucleósidos exógenos sobre la viabilidad celular, necrosis y apoptosis de células IEC-6 pretratadas con 5-Fluorouracilo y recuperadas durante 7 días con medio control (grupo control-5Fu), NT (grupo NT-5Fu) y NU (grupo NU-5Fu) respectivamente. Cada histograma representa la media de tres determinaciones y la barra vertical la desviación estándar. a: significación frente al grupo control-5Fu; b: significación entre los grupos NT-5Fu y NU-5Fu; 1: $p < 0.01$; 2: $p < 0.05$.

4. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE DIFERENTES CONDICIONES EXPERIMENTALES.

Para un mejor conocimiento del efecto de las diferentes condiciones experimentales empleadas en los ensayos realizados, se incluye este apartado encaminado a analizar el carácter multifactorial de los resultados obtenidos.

4.1 Efecto de la densidad celular y los medios de cultivo experimentales sobre el grado de diferenciación

Para esclarecer los factores que participan en la diferenciación de las células IEC-6, se van a comparar por un lado, los valores de proteína total de los cultivos y por otro los porcentajes de células que expresan los marcadores moleculares estudiados.

4.1.1. Porcentaje de proteína total

La comparación de las cantidades relativas de proteína total en condiciones de baja y alta densidad celular, arroja claras diferencias. Independientemente de las condiciones, el grupo NT presenta mayor valor respecto al control, pero el grupo NU pasa de tener un 35% menos que el control en condiciones de baja densidad celular a tener un 36% más en alta. Por otro lado, se traduce que el efecto de las dos mezclas de nucleósidos sobre la producción proteica final en alta densidad es la misma, mientras que a baja densidad celular los grupos NT y NU se comportan de manera diferente.

La estadística se realiza sobre cada condición de cultivo por separado, es decir, por un lado los valores de baja densidad celular y por otro los de alta. Esto se debe a que los resultados están expresados como un porcentaje respecto al grupo control y no como el valor absoluto de la cantidad de proteína total (Figura 35).

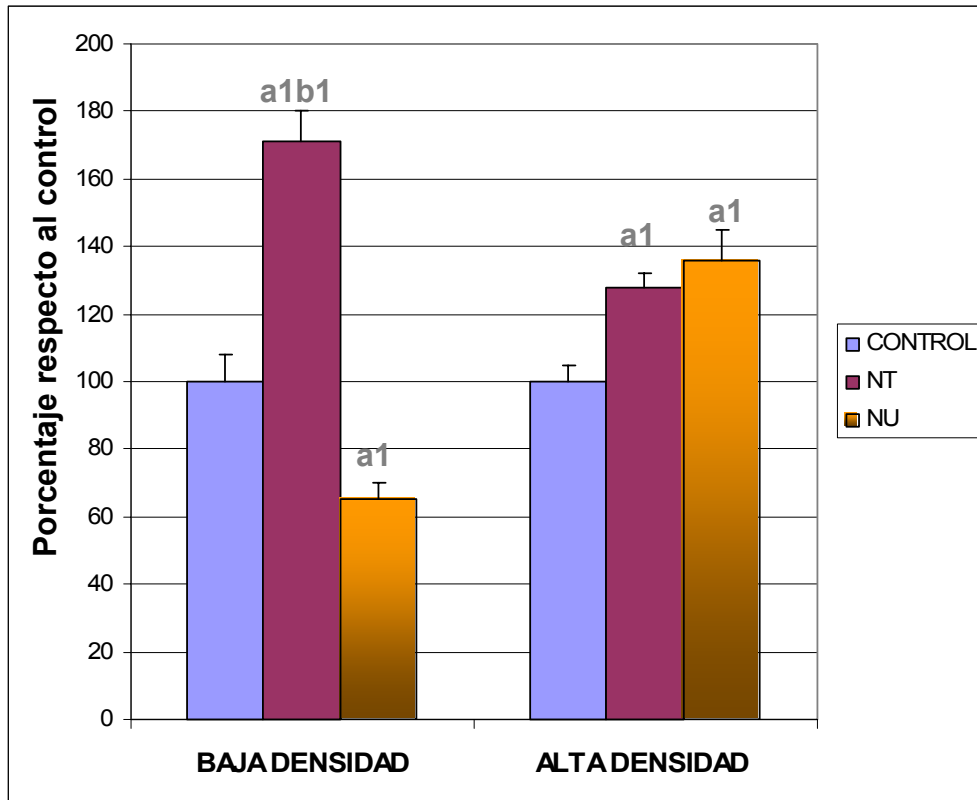


Figura 35. Producción de proteína total en células IEC-6 cultivadas durante 7 días en condiciones de baja densidad celular y de alta densidad celular. Fueron tratadas con medio de cultivo control, NT y NU respectivamente. Los resultados se expresan como porcentaje del valor alcanzado por el grupo control en cada condición considerada. Cada histograma representa la media de tres determinaciones y la barra vertical la desviación estándar. a: significación frente al grupo control; ; b: significación entre los grupos NT y NU; 1:p<0.01; 2:p<0.05.

4.1.2. Marcadores de diferenciación por citometría de flujo

La comparación de los resultados obtenidos en las diferentes condiciones experimentales determina que el paso de las células de baja densidad celular a alta densidad supone en todos los casos, un incremento en la expresión de villina (Figura 36), siendo del 2.48% para el control, 6.68 para el grupo NT y 6.30 para el NU. De esta forma, la expresión en el grupo control aumentó 9.86 veces, la del grupo NT 14.63 veces y la del NU 14.70 veces (Tabla 2).

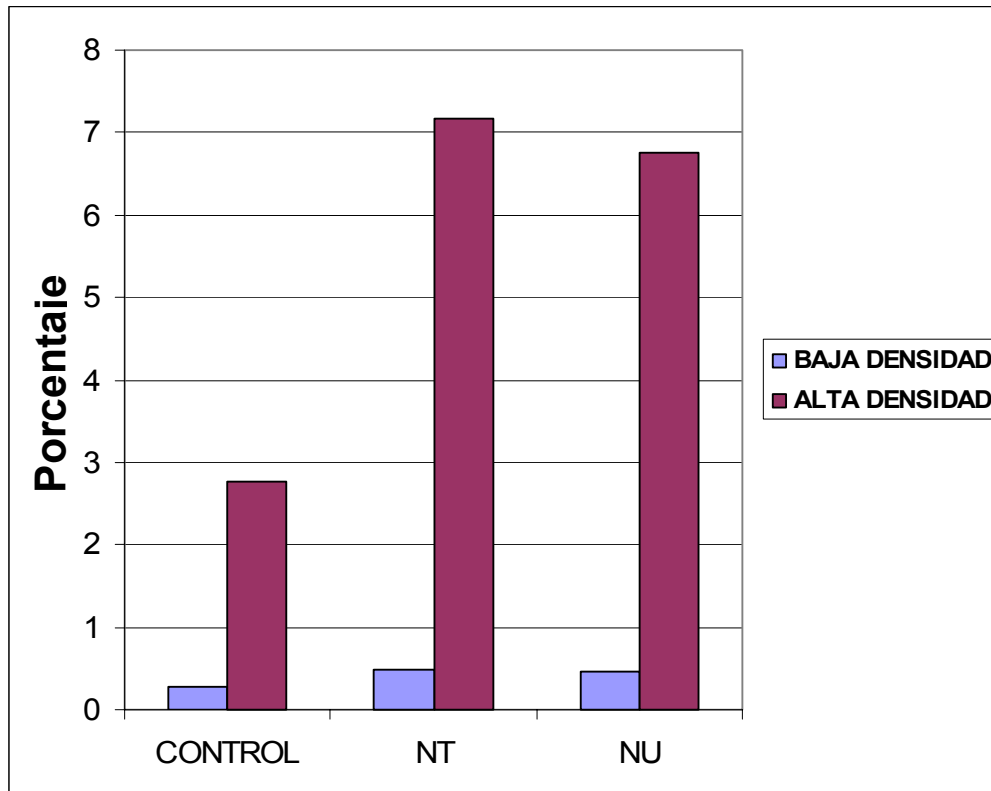


Figura 36. Expresión de villina en condiciones de baja y alta densidad celular. Los datos se presentan como el porcentaje de células del cultivo que expresan la proteína para cada tratamiento considerado, control, NT o NU.

INCREMENTO DE LA EXPRESIÓN DE VILLINA				
	BAJA DENSIDAD	ALTA DENSIDAD	INCREMENTO	FACTOR
CONTROL	0,28	2,76	2,48	9,86
NT	0,49	7,17	6,68	14,63
NU	0,46	6,76	6,30	14,70

Tabla 2. Expresión de villina en condiciones de baja y alta densidad celular. Los datos se presentan como el porcentaje de células del cultivo que expresan la proteína para cada tratamiento considerado, control, NT o NU. La columna “incremento” refleja la diferencia entre los valores obtenidos en alta y baja densidad celular. La columna “factor” expresa el número de veces que se incrementa la expresión del marcador, al pasar de la condición de baja a alta densidad.

El análisis de la varianza a doble vía, considerando el efecto del tipo de tratamiento y de la densidad celular sobre el porcentaje de la expresión de villina, nos muestra que la explicación de la variabilidad en la expresión de villina entre los diferentes grupos experimentales, depende tanto del tipo de tratamiento sometido a los cultivos ($p < 0.01$), como de la consideración de diferentes densidades celulares en los ensayos realizados ($p < 0.01$). El contraste múltiple de rango, utilizando el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher, nos permite realizar un análisis pormenorizado del aporte de cada factor. De esta manera se observa homogeneidad entre los grupos tratados con nucleósidos, que además difieren sobre el grupo control ($p < 0.01$). Respecto al factor densidad celular, los grupos experimentales mantenidos en condiciones de baja densidad celular difieren significativamente de los de alta densidad ($p < 0.01$).

La expresión de la fosfatasa alcalina, al igual que la villina, experimenta un incremento positivo al pasar de condiciones de baja a alta densidad celular (Figura 37), para todos los tipos de medio de cultivo utilizados. El grupo control pasó del 1.8% al 2.89%, lo que supone un aumento de 1.61 veces. Las células tratadas con el medio NT pasaron de 0.61% al 1.46%, incrementándose 2.39 veces. Por último el grupo NU saltó de 0.58% al 1.47%, creciendo 2.53 veces (Tabla 3).

INCREMENTO DE LA EXPRESIÓN DE FOSFATASA ALCALINA				
	BAJA DENSIDAD	ALTA DENSIDAD	INCREMENTO	FACTOR
CONTROL	1,8	2,89	1,09	1,61
NT	0,61	1,46	0,85	2,39
NU	0,58	1,47	0,89	2,53

Tabla 3. Expresión de fosfatasa alcalina en condiciones de baja y alta densidad celular. Los datos se presentan como el porcentaje de células del cultivo que expresan la proteína para cada tratamiento considerado, control, NT o NU. La columna “incremento” refleja la diferencia entre los valores obtenidos en alta y baja densidad celular. La columna “factor” expresa el

número de veces que se incrementa la expresión del marcador, al pasar de la condición de baja a alta densidad.

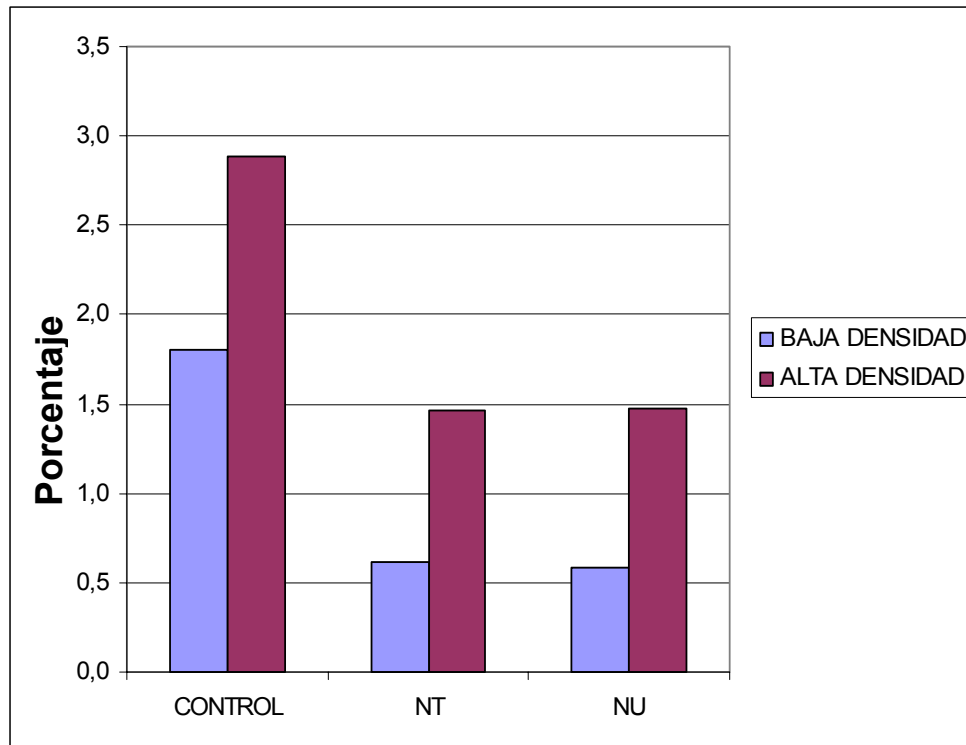


Figura 37. Expresión de villina en condiciones de baja y alta densidad celular. Los datos se presentan como el porcentaje de células del cultivo que expresan la proteína para cada tratamiento considerado, control, NT o NU.

El estudio mediante ANOVA de doble vía sobre la incidencia de los factores, tipo de medio de cultivo utilizado y densidad celular, sobre la expresión de fosfatasa alcalina, nos muestra que la explicación de la variabilidad en la expresión de fosfatasa alcalina entre los diferentes grupos experimentales, depende tanto del tipo de medio sometido a los cultivos ($p < 0.01$), como de la consideración de diferentes densidades celulares en los ensayos realizados ($p < 0.01$). Se observan diferencias significativas entre el grupo control y los grupos NT y NU respectivamente, así como homogeneidad entre estos últimos ($p < 0.01$). Respecto a la densidad celular, los grupos

experimentales mantenidos en condiciones de baja densidad difieren significativamente de los de alta ($p < 0.01$).

Como conclusión del análisis comparativo realizado, los grupos tratados con nucleósidos se comportan como un mismo grupo experimental. Tienen el mismo grado de expresión en condiciones de baja densidad celular ($p > 0.05$) y sufren el mismo incremento en alta densidad celular. El grupo control, difiere claramente de los otros dos grupos. Por otro lado, el establecimiento de las células control en condiciones favorables para la diferenciación aumenta la expresión de ambos marcadores, aunque dicho aumento es proporcionalmente inferior al que experimentan los grupos tratados con nucleósidos.

4.2. Efectos del 5-Fluorouracilo y de los nucleósidos exógenos

A continuación se presentan comparaciones multifactoriales en las que intervienen los tipos de medios de cultivos utilizados (control, NT y NU) y el pretratamiento o no con 5-Fluorouracilo. Se valorarán los efectos tanto a nivel de la proliferación celular, de la distribución de las fases del ciclo celular y de la apoptosis/necrosis.

4.2.1. Efectos del 5-Fluorouracilo y de los nucleósidos sobre la proliferación celular

Para conocer mejor el efecto del 5-Fluorouracilo sobre la proliferación celular, se va a realizar un análisis en el día 7 de cultivo de los valores de número de células totales en las condiciones experimentales de baja densidad celular y de recuperación con 5-Fluorouracilo. Se consideran los valores obtenidos por el método de determinación del número de células con tinción con Sulforrodamina B.

El efecto del 5-Fluorouracilo sobre la proliferación celular es muy importante, reduciendo los valores de número de células entonos los casos (Figura 38). El grupo control fue el más afectado, pasando de 213.291 células

sin pretratar con el fármaco a 6.591, quedando sólo el 3.09% de las células. El grupo NT tuvo un crecimiento negativo de - 167.552, quedando el 48.28% de la población en comparación con el grupo sin pretratar con el 5-Fluorouracilo. El grupo NU varió en -86.833 células, manteniendo el 45.44% de las no pretratadas (Tabla 4).

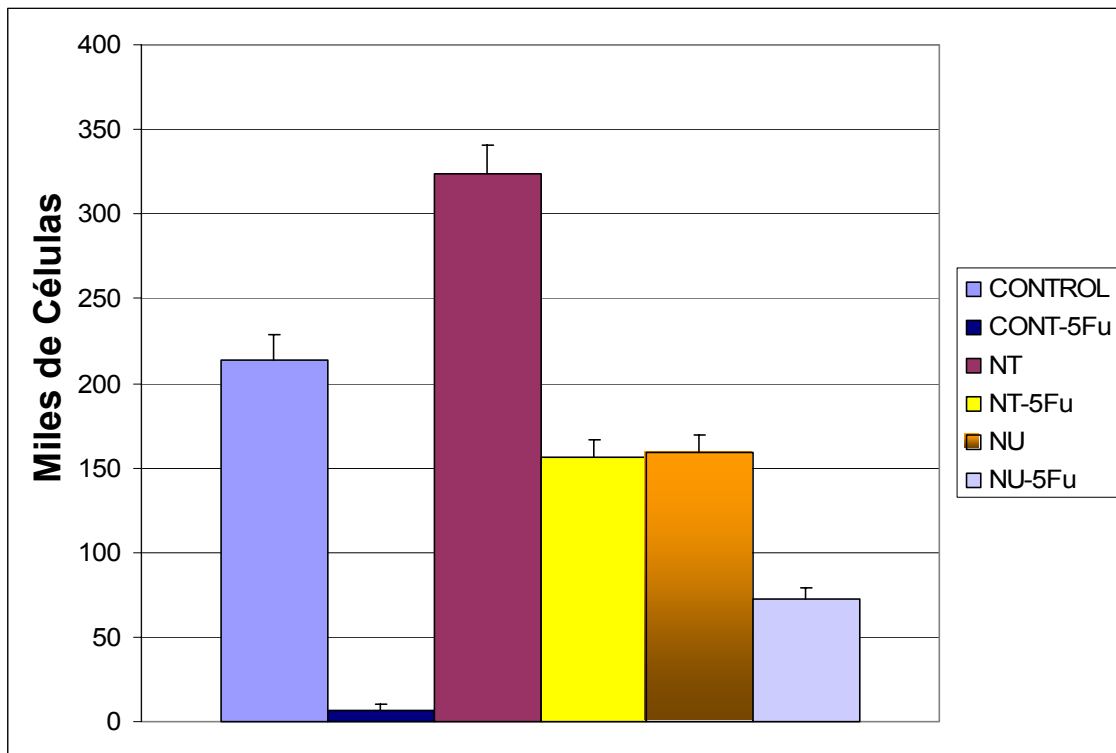


Figura 38. Efecto de las mezclas NT y NU sobre la proliferación celular en el día 7 de cultivo, con (grupos control-5Fu, NT-5Fu y NU-5Fu) o sin pretratamiento con 5-Fluorouracilo (grupos control, NT y NU). La gráfica representa el número de células como la media de tres determinaciones, y las barras verticales la desviación estándar.

EFECTO DEL 5-Fu SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR				
	SIN 5-Fu	CON 5-Fu	INCREMENTO	PORCENTAJE
CONTROL	213291	6591	-206700	3,09
NT	323961	156409	-167552	48,28
NU	159161	72328	-86833	45,44

Tabla 4. Efecto del 5-Fluorouracilo sobre la proliferación de las células IEC-6 a día 7 de tratamiento. La columna “incremento” se calcula restando al valor del número de células de los

grupos tratados con 5-Fluorouracilo, el valor de los grupos sin pretratar, para cada medio de cultivo considerado. La columna "porcentaje" representa el porcentaje de células de los grupos tratados con el fármaco respecto a los no tratados, para cada medio de cultivo considerado.

El amplio rango de valores de número de células respecto a las diferentes condiciones experimentales, puede ser explicado por el efecto del tipo de tratamiento utilizado: control, NT y NU, ($p < 0.01$), y por el efecto del pretratamiento o no con 5-fluorouracilo ($p < 0.01$). El análisis entre parejas de distribuciones de datos señala la existencia de diferencias significativas entre todas ellas ($p < 0.01$), excepto para el par NT-5Fu y NU, considerados estadísticamente como grupos homogéneos.

A tenor de los resultados, se puede puntualizar que el efecto antiproliferativo del 5-fluorouracilo es amortiguado por la presencia de nucleósidos, existiendo la misma capacidad por parte de las dos mezclas de nucleósidos para conseguir dicho efecto.

4.2.2. Efectos del 5-Fluorouracilo y de los nucleósidos sobre el ciclo celular.

El tratamiento con 5-Fluorouracilo produjo unas modificaciones parecidas en los dos grupos cultivados con las mezclas de nucleósidos. Ambos tuvieron una reducción en las fases G2-M, de -12.28% para el grupo NT y -7.44% para el NU. También se apreció un incremento del porcentaje de células en la fase de síntesis que fue del 12.63% y 14.64% para los grupos NT y NU respectivamente. La única diferencia entre ambos fue la reducción de células del grupo NU en las fases G0-G1, con un -7.21%, que fue casi imperceptible para el grupo NT (-0.35%) (Tabla 5 y figura 39).

EFECTO DEL 5-Fu SOBRE EL CICLO CELULAR			
GO/G1	SIN 5-Fu	CON 5-Fu	INCREMENTO
CONTROL	60,73	-----	-----
NT	69,38	69,03	-0,35
NU	66,69	59,48	-7,21
G2/M			
CONTROL	15,55	-----	-----
NT	21,56	9,28	-12,28
NU	13,22	5,78	-7,44
SÍNTESIS			
CONTROL	23,73	-----	-----
NT	9,06	21,69	12,63
NU	20,1	34,74	14,64

Tabla 5. . Efecto de las mezclas control, NT y NU, y del pretratamiento (NT-5Fu y NU-5Fu) o no con 5-Fluorouracilo (grupos control, NT y NU) sobre la distribución del ciclo celular al día 7. La columna "incremento" se calcula restando al valor del porcentaje de una determinada fase del ciclo de los grupos tratados con 5-Fluorouracilo, el correspondiente valor de los grupos sin pretratar, para cada medio de cultivo considerado.

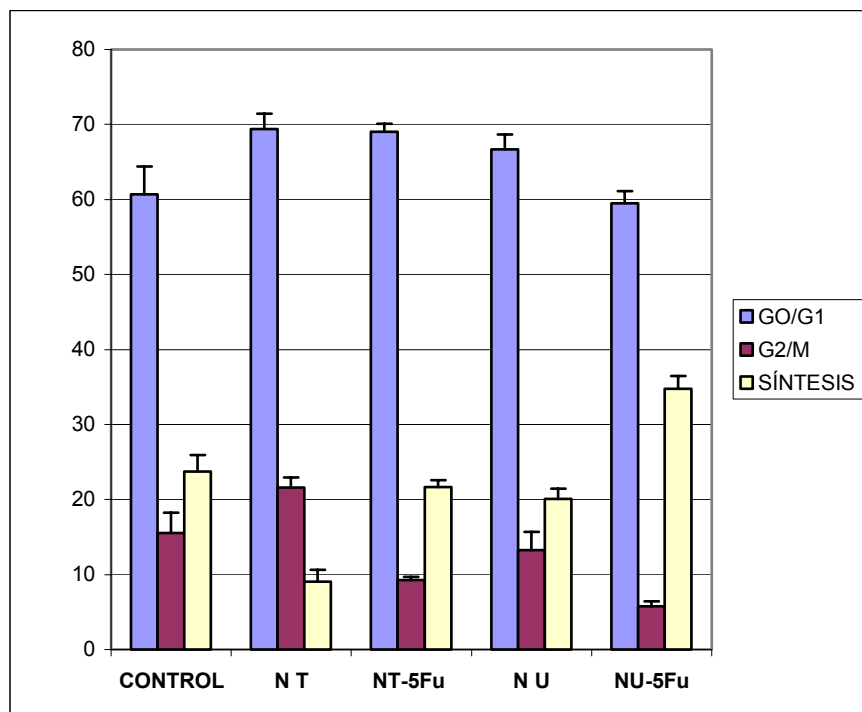


Figura 39. Efecto de las mezclas control, NT y NU, y del pretratamiento (NT-5Fu y NU-5Fu) o no con 5-Fluorouracilo (grupos control, NT y NU) sobre la distribución del ciclo celular al día 7 de cultivo. El eje vertical representa el porcentaje de células que aparecen en cada fase del

ciclo celular. Los histogramas muestran la media de tres determinaciones, junto con las barras verticales de desviación estándar.

En este caso, dado que no se tienen resultados del grupo control-5Fu para el ciclo celular, sólo se van a considerar en la estadística multifactorial los valores de NT y NU, con sus respectivas formas sin pretratamiento y con pretratamiento de 5-Fluorouracilo. Por otro lado, las diferentes fases del ciclo celular son consideradas independientemente.

La variable dependiente “número de células” se ve afectada por el tipo de medio de cultivo utilizado (NT o NU) y por el pretratamiento o no con 5-Fluorouracilo, tanto para las fases GO/G1 ($p < 0.01$, $p < 0.05$, respectivamente), G2/M ($p < 0.01$, en ambos casos) y la fase de Síntesis ($p < 0.01$, en ambos casos). La comparación de las parejas de distribuciones de datos confirma en los tres intervalos de las fases de ciclo celular, diferencias significativas entre los grupos tratados con las mezclas NT y NU por un lado, y los grupos pretratados y no pretratados con 5-Fluorouracilo por otro.

4.2.3. Efectos del 5-Fluorouracilo y los nucleósidos sobre las tasas de viabilidad, necrosis y apoptosis.

Para conocer con mayor profundidad los efectos producidos por el 5-Fluorouracilo y los nucleósidos exógenos sobre los niveles de viabilidad, necrosis y apoptosis de las células IEC-6, se van a comparar los resultados obtenidos anteriormente.

El tratamiento con 5-Fluorouracilo produjo en todos los grupos experimentales, una reducción de la viabilidad celular y un incremento de los niveles de apoptosis y de necrosis (Figura 40). El grupo control redujo la viabilidad un 39.76%, el NT un 25.3% y el NU un 28.14%. La necrosis se incrementó un 25.96%, 13.07% y 20.48 % para los grupos control, NT y NU respectivamente. Finalmente la apoptosis aumentó de igual modo 13.79%, 12.23% y 7.66% respectivamente (Tabla 6).

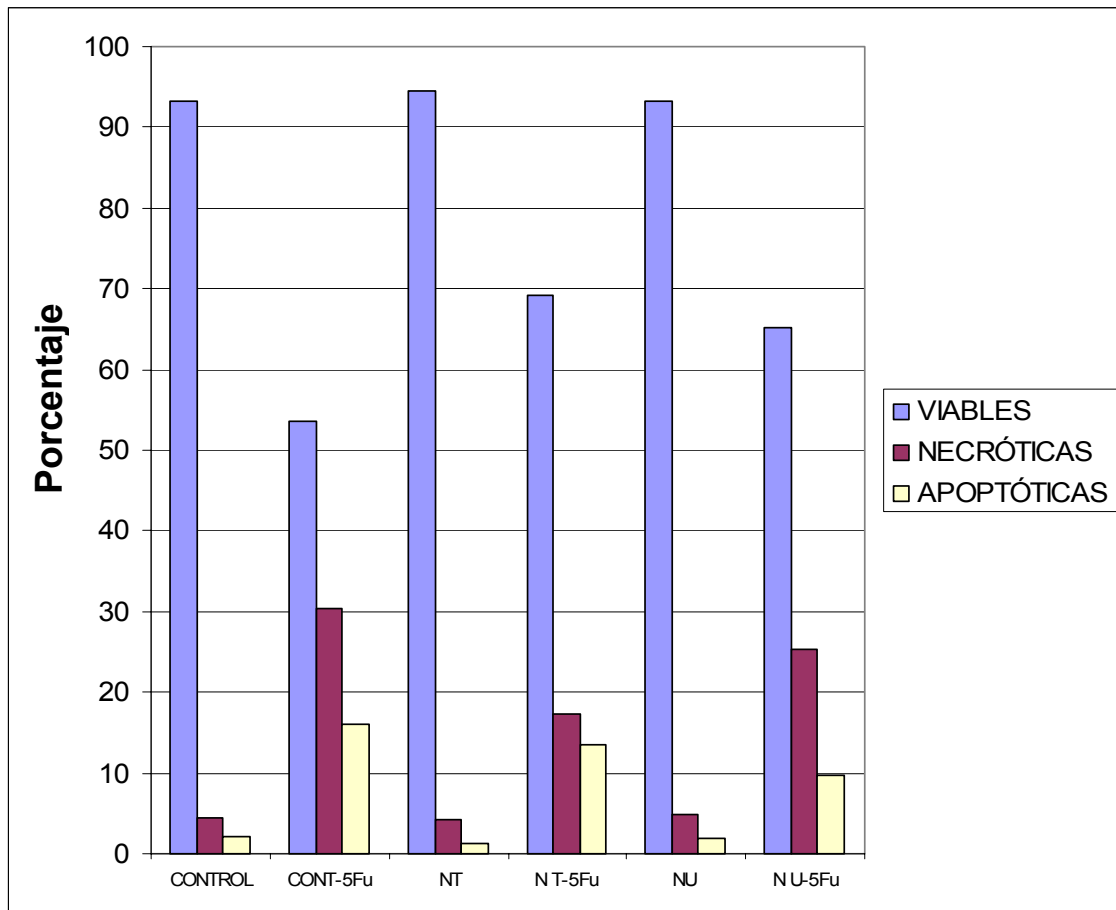


Figura 40. Efecto de las mezclas control, NT y NU, y del pretratamiento (grupos control-5Fu, NT-5Fu y NU-5Fu) o no con 5-Fluorouracilo (grupos control, NT y NU) sobre los porcentajes de viabilidad celular, necrosis y apoptosis en células IEC-6. Los histogramas muestran la media de tres determinaciones a día 7 de tratamiento, junto con las barras verticales de desviación estándar.

EFECTO DEL 5-Fu SOBRE NECROSIS/APOPTOSIS			
VIABLES	SIN 5-Fu	CON 5-Fu	INCREMENTO
CONTROL	93,34	53,58	-39,76
NT	94,56	69,26	-25,3
NU	93,29	65,15	-28,14
NECRÓTICAS			
CONTROL	4,52	30,48	25,96
NT	4,17	17,24	13,07
NU	4,76	25,24	20,48
APOPTÓTICAS			
CONTROL	2,15	15,94	13,79
NT	1,27	13,5	12,23
NU	1,95	9,61	7,66

Tabla 6. Efecto de las mezclas control, NT y NU, y del pretratamiento (Control-5Fu, NT-5Fu y NU-5Fu) o no con 5-Fluorouracilo (grupos control, NT y NU) sobre los porcentajes de viabilidad celular, necrosis y apoptosis en células IEC-6, para el día 7 de cultivo. La columna "incremento" se calcula restando al valor de los grupos tratados con 5-Fluorouracilo, el correspondiente valor de los grupos sin pretratar.

Para la estadística multifactorial se han considerado los porcentajes de células viables, necróticas y apoptóticas por separado.

La variable dependiente "número de células" se ve afectada por el tipo de medio de cultivo utilizado (NT o NU) y por el pretratamiento o no con 5-Fluorouracilo, respecto a la viabilidad celular ($p < 0.01$, en ambos casos), necrosis ($p < 0.01$, en ambos casos) y apoptosis ($p < 0.05$, $p < 0.01$, respectivamente). La comparación de las parejas de distribuciones de datos refleja que tanto respecto a la viabilidad celular, como a necrosis y apoptosis, los grupos control, NT y NU constituyen un grupo homogéneo sin diferencias significativas, mientras que el resto de tratamientos difieren de estos y entre sí.

5. ANÁLISIS DE LA INCORPORACIÓN INTRACELULAR DE NUCLEÓSIDOS TRITIADOS

5.1. Determinación de la incorporación intracelular por contador de centelleo líquido.

El estudio de la cinética de la captación de los nucleósidos exógenos se llevó a cabo mediante contador de centelleo. La guanosina y uridina experimentaron un perfil de incorporación celular muy similar. Transcurridos 30 minutos de incubación con los medios tritiados había desaparecido un 36.86% de la uridina y un 30.76% de guanosina. Este primer intervalo fue en el que se produjo la mayor velocidad de captación de los nucleósidos. A la hora, el medio contaba sólo con algo más de la mitad de los nucleósidos tritiados iniciales, un 55.54% de uridina y un 51.15% de guanosina. Finalmente, al cabo de cuatro horas de incubación los medios de cultivo contaban con un 25.89% de uridina y un 21.07% de guanosina (Figura 41).

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente para determinar si se ajustaban a alguna función conocida. La función matemática por la que se ajustan los datos es una función inversa de la variable dependiente. En ambos casos el ajuste fue significativo, con un coeficiente de correlación de 0.976 ($p < 0.01$) y 0.994 ($p < 0.01$) para la uridina y la guanosina respectivamente.

URIDINA	
	130.462
$T = - 1.46226 +$	$\frac{\text{-----}}{\%}$
GUANOSINA	
	103.935
$T = - 0.972934 +$	$\frac{\text{-----}}{\%}$

Siendo T, el tiempo de incubación de las células con el medio tritiado y %, el porcentaje de nucleósido tritiado que queda en el medio de cultivo en dicho tiempo dado.

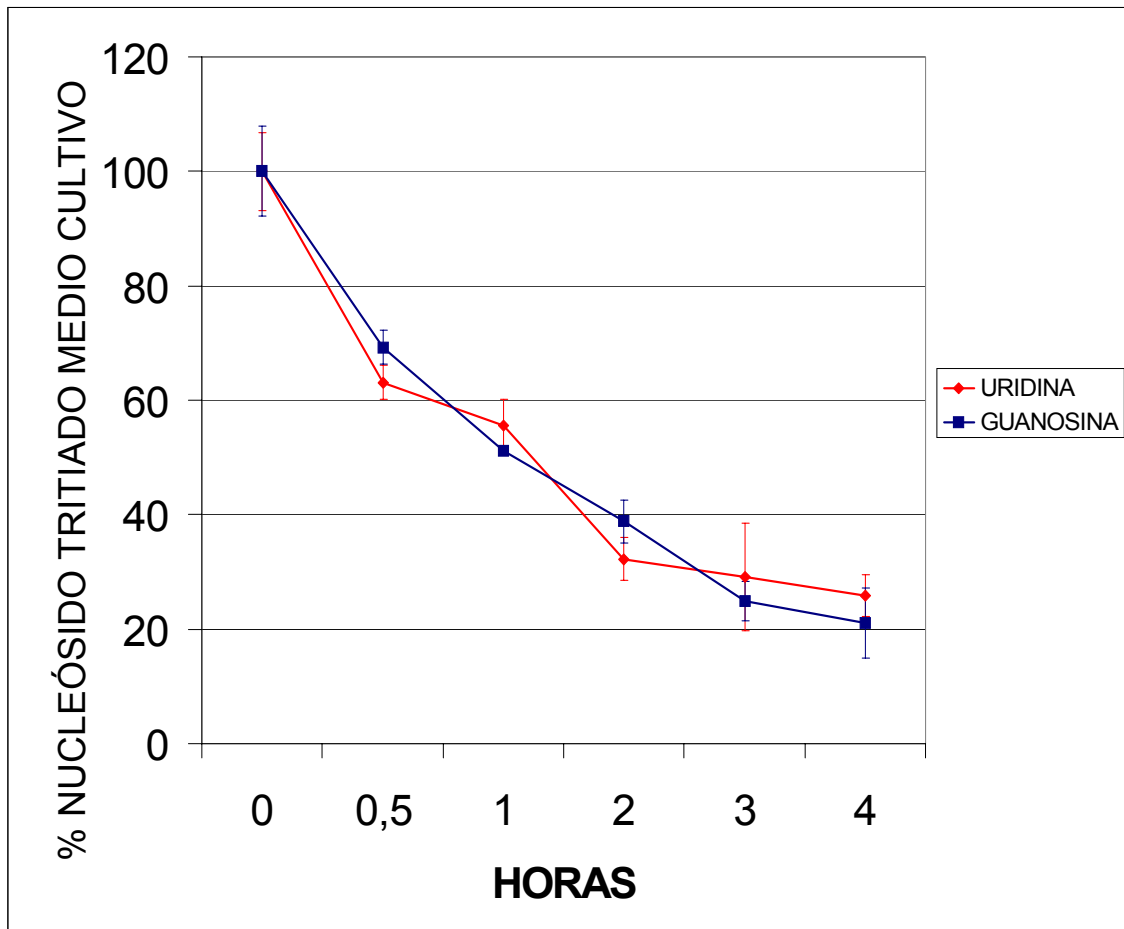


Figura 41. Captación de nucleósidos tritiados por parte de las células IEC-6. El eje vertical representa el porcentaje de nucleósido tritiado que permanece en el medio de cultivo. El eje horizontal representa las horas de incubación con los medios tritiados. Cada valor resulta de la media de tres determinaciones, y la barra vertical representa la desviación estándar.

El análisis estadístico por ANOVA de doble vía muestra que en la captación de los nucleósidos tritiados sólo tiene efecto estadísticamente significativo el tiempo de incubación ($p < 0.01$), mientras que el hecho de ser guanósina o uridina la molécula captada no presenta significación. En cada tiempo de incubación no aparecieron diferencias significativas entre los valores de guanósina y uridina.

5.2. Autorradiografía para microscopía electrónica de transmisión

Células IEC-6 fueron cultivadas en Transwell a una densidad de 100 000 células /cm². Tras 24 horas de la siembra fueron incubadas con medios NT-Tritio y NU-Tritio respectivamente. Muestras de los dos tipos de tratamientos fueron tomadas al cabo de 30 minutos y 1, 2, 3 y 4 horas. Posteriormente las muestras fueron procesadas para autorradiografía a nivel de microscopía electrónica de transmisión.

Las micrografías obtenidas a través del microscopio electrónico de transmisión fueron estudiadas a diferentes niveles. Por un lado se determinaron posibles diferencias en la proporción de núcleo y citoplasma así como del índice resultante de la relación Núcleo / Citoplasma. En segundo lugar se determinó la cantidad de marcaje radioactivo que aparecía por unidad de superficie, así como la riqueza relativa del marcaje entre núcleo y citoplasma. Finalmente se intentó identificar la ruta intracelular de incorporación de los nucleósidos tritiados e identificar los orgánulos y compartimentos celulares implicados en dicho proceso.

5.2.1. Relación entre tamaño del núcleo y citoplasma

Para valorar las posibles diferencias respecto al tamaño relativo entre núcleo y citoplasma en función al tratamiento recibido, se llevó a cabo la medición de las micrografías electrónicas digitalizadas. Se expresaron los resultados como porcentajes de núcleo y citoplasma y se calculó la relación entre núcleo y citoplasma (Tabla 7, figura 42).

Tanto para la guanosina como para la uridina, en los diferentes tiempos de incubación los valores de porcentaje de núcleo y citoplasma fueron equilibrados, en torno al 50.26% de núcleo de media entre todos los grupos y 49.74% de citoplasma. La desviación estándar fue relativamente grande, con un 13.86% de media, indicando por tanto una amplia dispersión de los valores

experimentales. El índice núcleo/citoplasma en conjunto, tuvo un valor próximo a 1 (Tabla 6).

GRUPO	% NUCLEO	% CITOP	DESV. EST.	RELACIÓN N / C
G 30 MIN	57,12	42,88	9,74	1,33
G 1 H	52,14	47,86	13,46	1,09
G 2 H	52,03	47,97	13,72	1,08
G 3 H	46,33	53,67	18,18	0,86
G 4 H	54,45	45,55	18,87	1,20
U 30 MIN	49,14	50,86	16,99	0,97
U 1 H	46,76	53,24	10,13	0,88
U 2 H	50,78	49,22	12,51	1,03
U 3 H	45,77	54,23	10,37	0,84
U 4 H	48,09	51,91	14,64	0,93

Tabla 7. Estudio de células IEC-6 incubadas con las mezclas NT-tritio (guanosina-³H) o NU-tritio (uridina-³H) durante 30 minutos, 1, 2, 3 o 4 horas. A, porcentaje de núcleo. B, porcentaje de citoplasma. Cada porcentaje expresado en la tabla se corresponde con el valor medio del conteo realizado en 20.

El análisis de la varianza de los valores de núcleo y citoplasma indica que no existen diferencias significativas entre los diferentes grupos. La ANOVA de doble vía, considerando el posible efecto del tratamiento con guanosina o uridina y los diferentes tiempos de incubación, no muestra diferencias significativas, de manera que los valores de tamaño relativo de núcleo y citoplasma se consideran iguales entre todos los tratamientos realizados. El contraste múltiple de rango tampoco determina diferencias entre ningún par de grupos de datos (Figura 42).

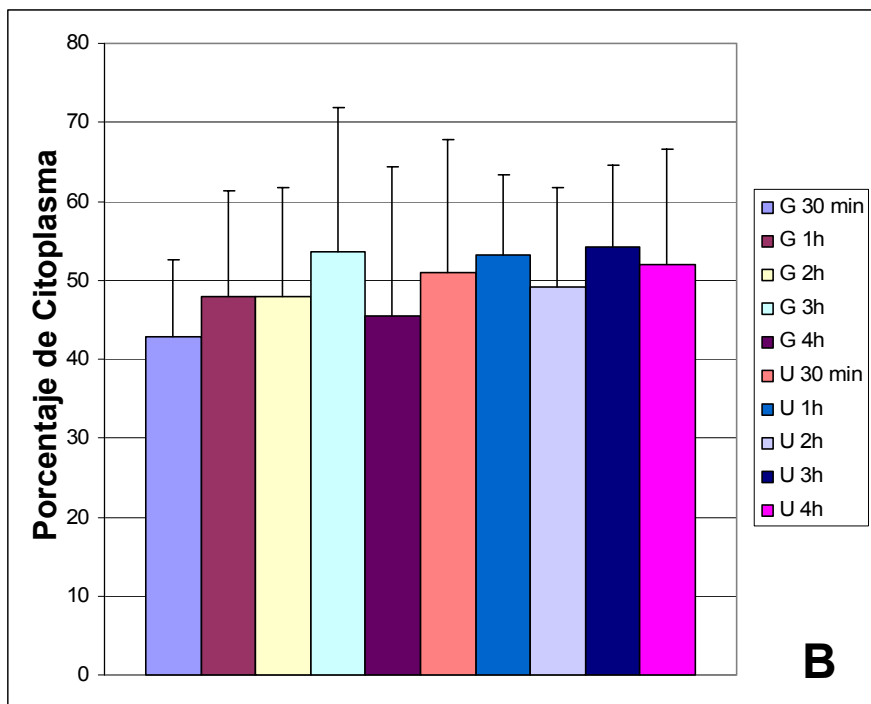
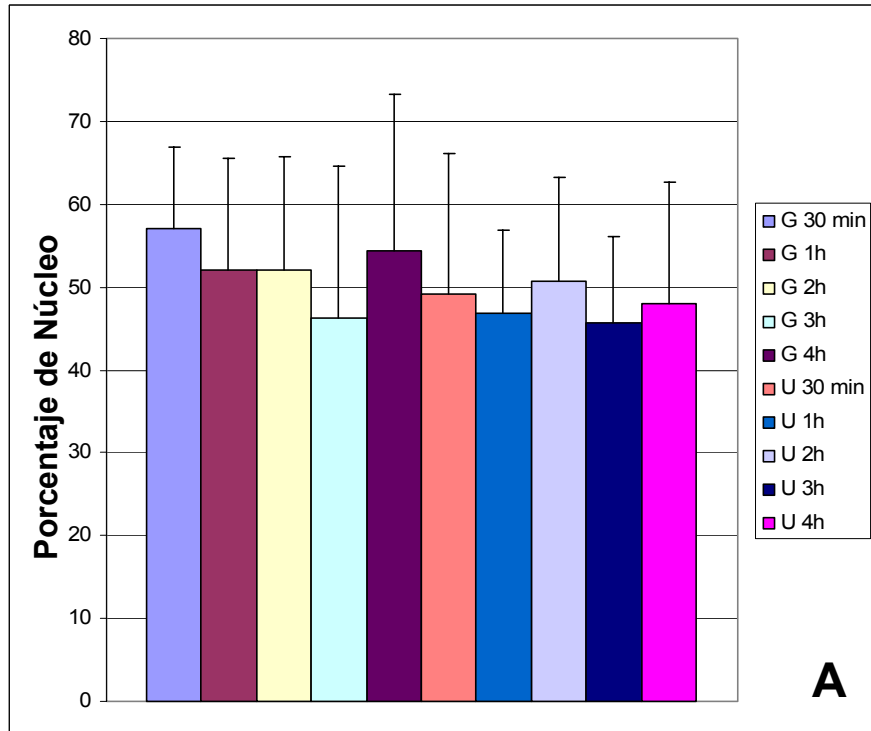


Figura 42. Estudio métrico de células IEC-6 incubadas con las mezclas NT-tritio (guanosina-³H) o NU-tritio (uridina-³H) durante 30 minutos, 1, 2, 3 o 4 horas. A, porcentaje de núcleo. B, porcentaje de citoplasma. Cada histograma representa el valor medio de 20 determinaciones y la barra vertical la desviación estándar.

5.2.2. Análisis de las marcas radioactivas

Sobre las micrografías electrónicas se llevó a cabo el contaje del número de marcas que aparecen en el total de las células, y las que aparecen tanto en el núcleo como en el citoplasma. Una vez recolectados los datos se elaboraron tres índices que hacen referencia al grado de riqueza en marcaje radioactivo.

Se define el índice de incorporación como el número de marcas que aparecen por unidad de superficie (píxel x píxel) multiplicado por 10 000. El índice fue calculado para la célula en su conjunto (índice de incorporación total, IIT), para el núcleo (índice de incorporación al núcleo, IIN) y para el citoplasma (índice de incorporación al citoplasma, IIC). Los tiempos de incubación considerados fueron los iniciales (30 minutos y 1 hora) y el final (4 horas).

Los tres índices de incorporación tanto de guanosina como de uridina fueron aumentando con el tiempo (Figuras 43 y 44). Los índices IIT, IIN y IIC para la guanosina a los 30 minutos fueron 0.604, 1.066 y 0.369 respectivamente. Al cabo de la hora de incubación los valores se incrementaron de manera importante alcanzando 3.408, 5.612 y 1.716 respectivamente. Finalmente, a las cuatro horas los valores aumentaron respecto de la situación encontrada a los 30 minutos 15.42 veces para IIT, 11.17 para IIN y 17.78 para el IIC, situándose en los 9.315, 11.908 y 6.561 respectivamente. En el caso de la uridina a los 30 minutos los valores fueron 1.116, 1.475 y 0.704 para IIT, IIN e IIC respectivamente, y a las cuatro horas 5.616, 10.698 y 4.3 respectivamente (tabla 8).

Inicialmente la uridina tuvo una incorporación total mayor que la guanosina, aunque este nucleósido, rápidamente superó la diferencia inicial y resultó con mayor incorporación a las 4 horas. Ambos nucleósidos tuvieron una incorporación mayor en el núcleo que en el citoplasma, del orden de 1.81 veces más en el caso de la guanosina y 2.49 veces la uridina, a las cuatro horas. Sin embargo, la relación entre los índices IIN/IIC mantuvo ciertas diferencias. Para la guanosina a los 30 minutos la relación fue de 2.89, pasando a 3.27 a la hora

de incubación. A las cuatro horas el índice cayó al 1.81. Estos datos indican un enriquecimiento inicial de guanosina en el núcleo que se va igualando a lo largo del tiempo con el citoplasma. En cambio, la uridina tuvo un incremento al final del intervalo de estudio, pasando de 2.10 a los 30 minutos a 2.04 a la hora y finalmente 2.49 a las cuatro horas.

	I. I. TOTAL	I. I. NUCLEO	I. I. CITOP
G 30 MIN	0,604	1,066	0,369
G 1 H	3,408	5,612	1,716
G 4 H	9,315	11,908	6,561
U 30 MIN	1,166	1,475	0,704
U 1 H	1,942	2,832	1,391
U 4 H	5,616	10,698	4,300

Tabla 8. Índice de incorporación total, al núcleo y al citoplasma para guanosina (G) y uridina (U), a los tiempos de incubación de 30 minutos, 1 y 4 horas.

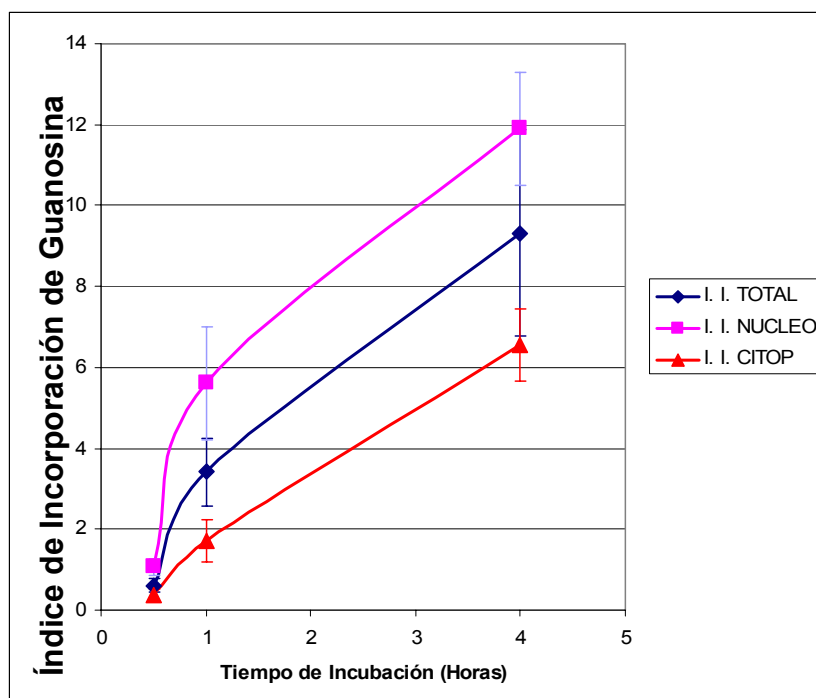


Figura 43. Representación gráfica de los índices de incorporación para la guanosina, en función al tiempo de incubación de las células. Cada valor se corresponde con la media de 20 determinaciones y las barras verticales con la desviación estándar.

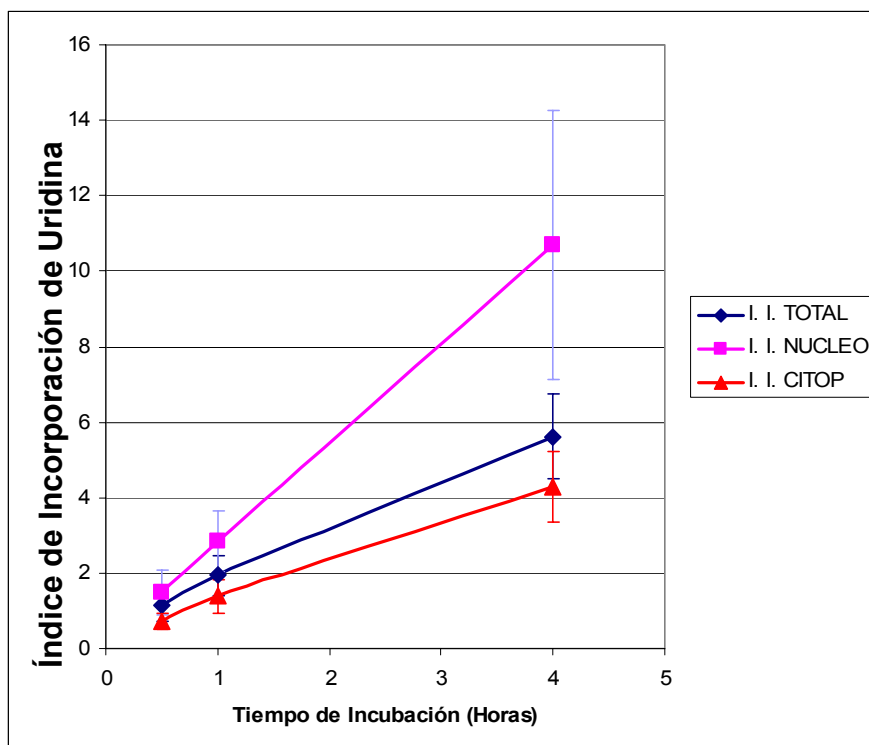


Figura 44. Representación gráfica de los índices de incorporación para la uridina, en función al tiempo de incubación de las células. Cada valor se corresponde con la media de 20 determinaciones y las barras verticales con la desviación estándar.

El análisis estadístico multifactorial de los datos se realizó considerando por separado los índices de incorporación total de las células, del núcleo y del citoplasma. Se comprobó el efecto del tiempo de incubación (30 minutos, 1 hora y 4 horas) y el empleo de guanosina o uridina sobre los respectivos índices. Para el primero ($p < 0.01$, en ambos casos), el índice de incorporación en el núcleo ($p < 0.01$, $p < 0.05$, respectivamente) y el del citoplasma ($p < 0.01$, en ambos casos) los dos factores tienen un efecto estadísticamente significativo. Al final del ensayo, los índices IIT y IIC fueron mayores para la guanosina que para la uridina ($p < 0.01$ y $p < 0.05$, respectivamente), mientras que el IIN no presentó diferencias significativas (Figura 45).

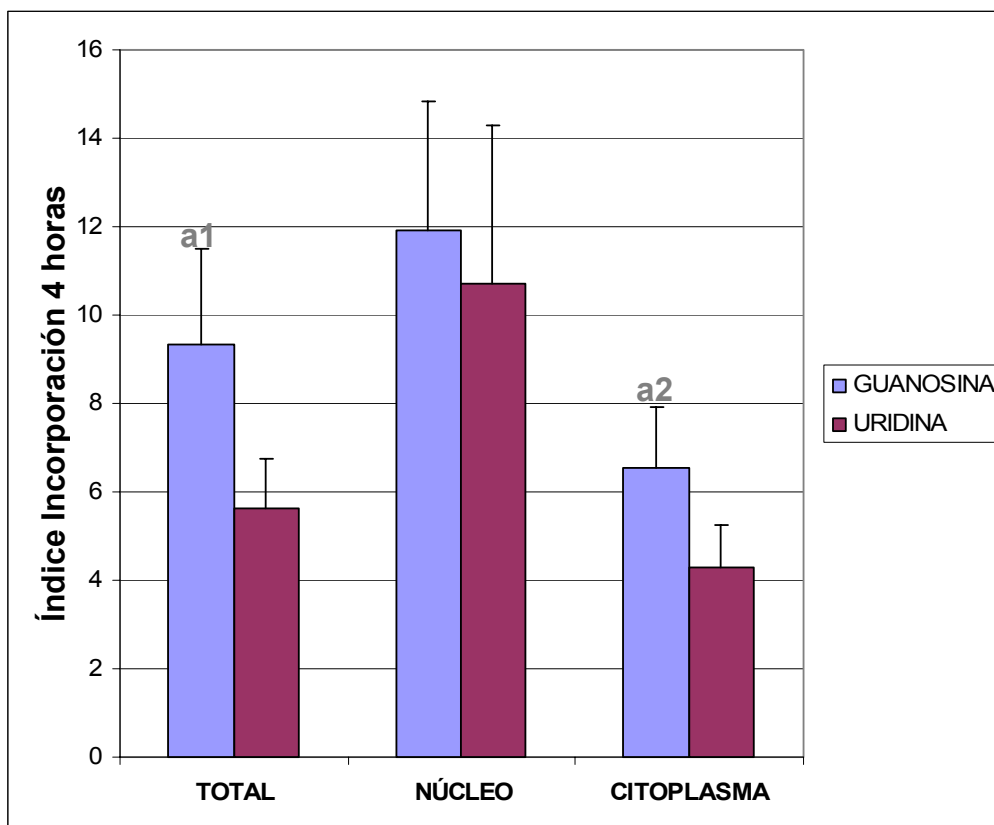
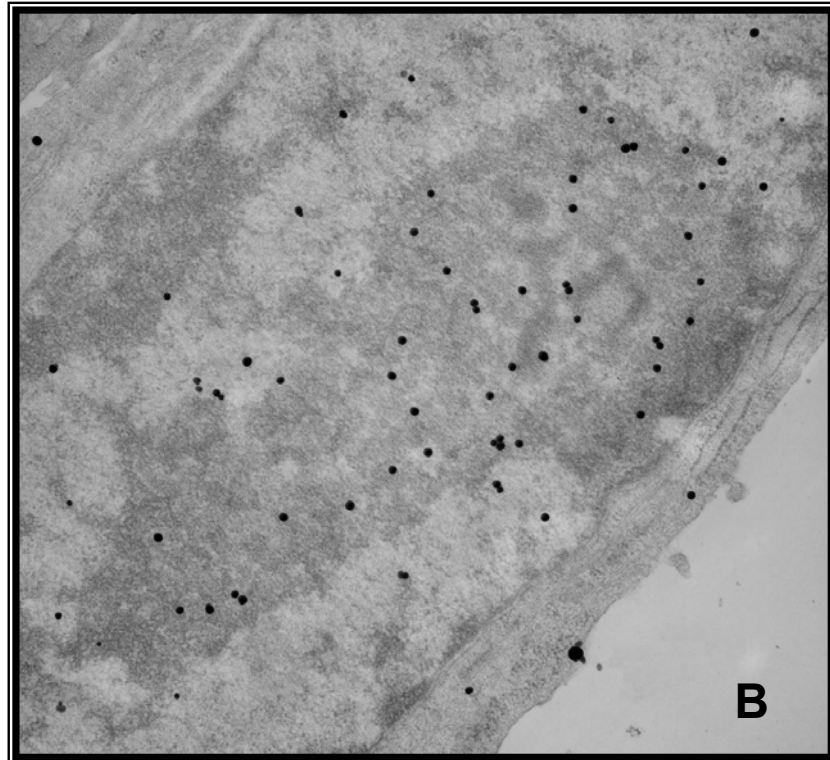
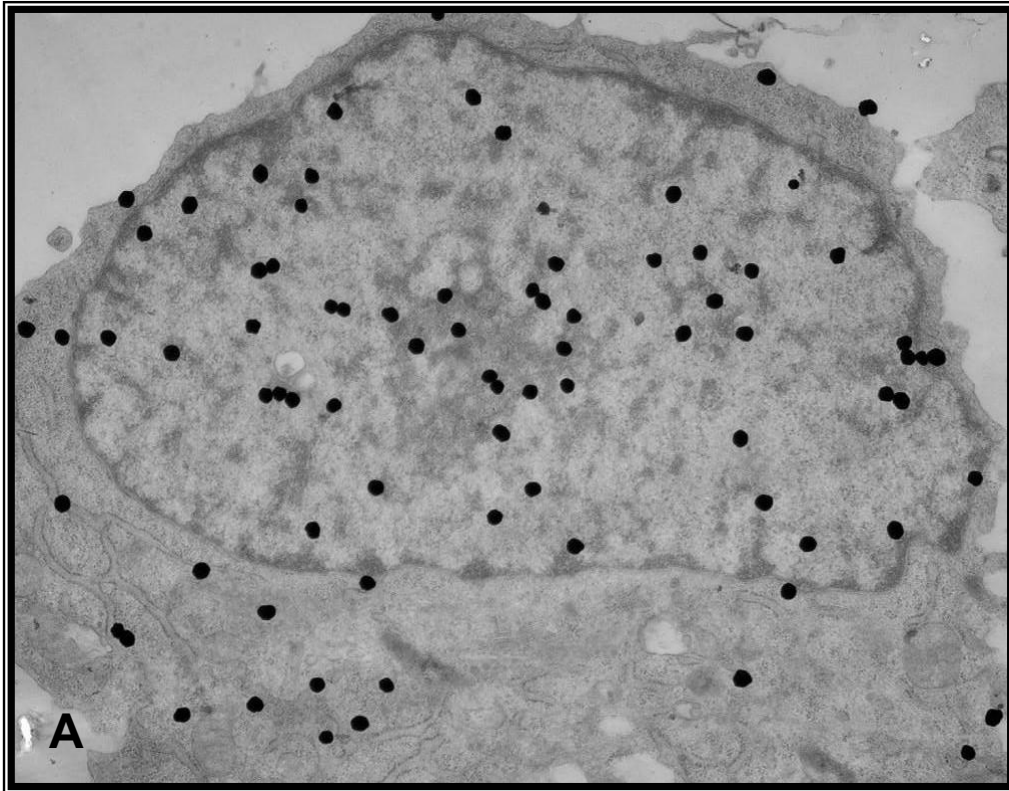


Figura 45. Índices IIT, IIN y IIC para guanosina y uridina tritiada a las 4 horas de incubación con los nucleósidos tritiados. a: diferencias significativas entre guanosina y uridina; 1: $p < 0.01$; 2: $p < 0.05$

5.2.3. Análisis de la ruta intracelular de incorporación de los nucleósidos tritiados.

Para esclarecer la ruta intracelular de incorporación de los nucleósidos exógenos, se estudiaron las micrografías electrónicas con el fin de detectar los orgánulos y compartimentos celulares implicados. Se observó marcaje en orgánulos como retículo endoplasmático rugoso y mitocondrias, independientemente del tiempo de incubación empleado. También se vio claramente el predominio del marcaje en el núcleo respecto al citoplasma, y se observó frecuentemente acúmulos en regiones heterocromáticas y nucleolo. Sin embargo, no se pudo establecer una ruta ordenada de incorporación de los nucleósidos en función del tiempo (Figura 46).



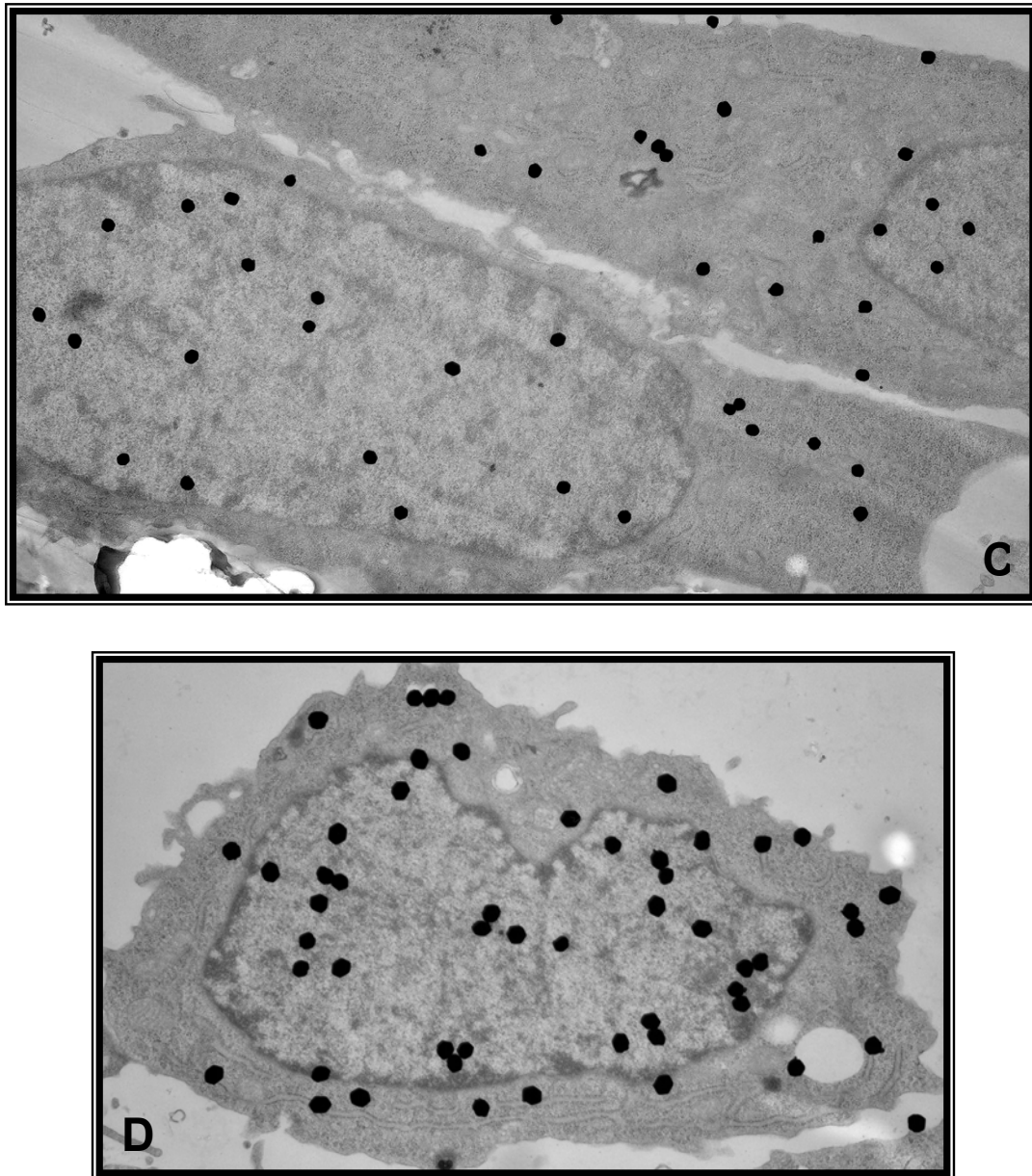


Figura 46. Micrografías electrónicas de células IEC-6 tratadas con medios de cultivo NT-Tritio (C y D) y NU-Tritio (A y B), a las cuatro horas de incubación. A: el núcleo presenta mayor densidad de marcaje que el citoplasma. B: Marcaje en regiones heterocromáticas. C: Las células son alargadas con el núcleo ocupando un abultamiento que se proyecta lateralmente como citoplasma. D: se observa como los granos son de mayor tamaño que en B, este hecho se debe a pequeñas variaciones ambientales en el proceso de revelado, especialmente a los cambios de temperatura.

DISCUSIÓN

Condiciones de baja densidad celular

El papel de los nucleótidos como componentes nutricionales semiesenciales se va afianzando gracias a los efectos reportados, producidos principalmente a nivel gastrointestinal, inmunológico y hepático. El grado de relevancia de los nucleótidos exógenos está relacionado con tejidos que experimentan unas importantes tasas de proliferación celular, generalmente como respuesta a situaciones de desarrollo y mantenimiento de las respectivas funciones fisiológicas o de recuperación ante cuadros de daño tisular. Sin embargo, los mecanismos por los que los nucleótidos llevan a cabo dichos efectos no están esclarecidos.

La utilización de modelos experimentales *in vitro* permite una situación de aislamiento de tejidos, necesaria para la comprensión de procesos complejos, y aún más en los que afectan muchos factores. En los estudios *in vitro* sobre los efectos de los nucleótidos exógenos, la elección de la línea celular, el empleo de nucleótidos aislados o formando mezclas heterogéneas, el tipo de combinaciones de nucleótidos en las mezclas, las proporciones entre ellos, las concentraciones totales, las formas químicas empleadas, la frecuencia en el cambio de medio de cultivo y la duración total de los ensayos constituyen variables que se tiene que tener en cuenta de forma especial.

La concentración de los nucleósidos en diferentes fluidos corporales se encuentra en un rango micromolar. Los niveles de los nucleósidos uridina y citidina en el plasma de rata, ratón y humanos son de 1, 2.2 y 4.9 μM respectivamente para la uridina y 3.3, 1.5 y 0.47 μM respectivamente para citidina (Moyer y cols., 1981). En la leche materna, la concentración de los nucleósidos totales potencialmente disponibles son de 189, 161, 163 y 203 μM para las mujeres europeas, americanas, suecas y asiáticas respectivamente. Dichas cantidades permanecen sin grandes cambios a lo largo de la lactación excepto los niveles algo inferiores que aparecen en el calostro (Tressler y cols., 2003).

Ohyanagi y cols., utilizó cultivos primarios de hepatocitos a los que tras el aislamiento incubó durante 24 horas con inosina, GMP, citidina, uridina y timidina, aisladamente o haciendo una mezcla conjunta de todos a una relación molar 4:4:4:3:1 (OG-VI). Demostraron que los hepatocitos era capaces de utilizar los nucleósidos y nucleótidos excepto la citidina y que el efecto de las moléculas individuales era menos efectivo que el de la mezcla. Observaron que a concentraciones elevadas de nucleósidos y del nucleótido se producía la inhibición de la síntesis de ADN y ARN. A concentraciones de la mezcla OG-VI de entre 3.35 mg/dl (120.4 μ M total) y 33.5 mg/dl (1204 μ M total) para el ADN y a 33.5 mg/dl (1204 μ M total) para el ARN se producía el punto óptimo para la síntesis de ADN y ARN por la ruta de recuperación. Sobre pasado dichos puntos se produce la inhibición de ambos procesos. La uridina de forma aislada presentó un punto óptimo para el ADN de entre 23 μ M y 230 μ M, mientras que para el ARN fue de 230 μ M (Ohyanagi y cols., 1989).

En nuestros ensayos las concentraciones de nucleósidos utilizadas fueron de 100 μ M en mezclas de 4 nucleósidos, lo que da un total de 400 μ M. Estas concentraciones han sido usadas recientemente por otros autores en estudios relacionados con los efectos de nucleósidos exógenos en hepatocitos (Arnaud y cols., 2003; Arnaud y cols., 2004; Saez-Lara y cols., 2004), siendo consideradas, al estar situadas por debajo de las concentraciones inhibitorias, como más fisiológicas .

Respecto a la proliferación de las células IEC-6 con los nucleósidos, inicialmente no se revelaron diferencias importantes, aunque al cabo de varios días las mezclas de nucleósidos produjeron distintas respuestas en la proliferación celular. La presencia de timidina condujo a un importante incremento de la proliferación, presentando un perfil de crecimiento logarítmico característicos de las líneas celulares en cultivo, mientras que la mezcla con uridina mostró una clara reducción de la proliferación celular. Estos datos fueron corroborados por los niveles de proteínas totales encontrados en los cultivos, siendo un factor correlacionado directamente con la proliferación celular (Saez-Lara y cols., 2004). En cultivos de hepatocitos adultos, las mezclas no produjeron cambios en los niveles de proliferación celular, ni

tampoco en la viabilidad celular (Arnaud y cols., 2003), aunque los estudios fueron realizados a 24 horas y el efecto que hemos encontrado en los enterocitos se produce más tarde. Sin embargo, sobre hepatocitos fetales, ambas mezclas produjeron un incremento de la proliferación a las 24 horas, acentuado principalmente por el grupo NU, sin evidenciarse además muestras de toxicidad de las mezclas (Saez-Lara y cols., 2004). Los autores señalan la posibilidad de la conversión de la citidina en uridina, a través de una reacción de desaminación, potenciando los efectos estimulantes de la mezcla NU respecto a la mezcla con timidina. En nuestro caso dicha conversión inclinaría aún más la balanza en el sentido antiproliferativo de la mezcla.

El efecto de los nucleótidos presentes en la leche humana sobre la proliferación epitelial intestinal ha sido objeto de estudio por diferentes autores. He y cols, emplearon la suplementación con cantidades iguales de los nucleótidos AMP, CMP, GMP, IMP, y UMP (10 mg/l, de cada) y observaron que no se producían variaciones en las tasas proliferativas de células tumorales Caco-2 en condiciones nutricionales normales, aunque si en condiciones de estrés nutricional, simuladas con la eliminación de glutamina del medio de cultivo. Por el contrario las células IEC-6 si se veían afectadas en ambas situaciones, incrementándose la proliferación celular (He y cols., 1993).

La glutamina es un aminoácido muy utilizado por el intestino delgado tanto como fuente de energía, como donador de nitrógeno para la síntesis de novo de purinas y pirimidinas (McCauley y cols., 1998). De hecho se ha comprobado que es un elemento esencial para la proliferación de las células Caco-2 y su carencia no puede ser suplida por la presencia de nucleótidos (Boza y cols., 2000). En nuestros estudios no se produce restricción de la disponibilidad de glutamina, por lo que en base a los resultados encontrados por He y cols. hubiera sido esperado, si hubiésemos puesto la restricción, la aparición de diferencias significativas y/o de mayor magnitud entre nuestros grupos experimentales en un tiempo más temprano del encontrado con disponibilidad de glutamina. Además, nuestros estudios presentan algunas diferencias respecto a este, si bien He y cols. usan un medio experimental constituido por DMEM con bajo contenido en suero, adicionado de suero fetal

bovino dializado (5 ml/l) y Mito+ (1 ml/l), introducen nucleótidos como la forma química de purinas y pirimidinas para la valoración de la actividad in vitro, cuando la forma preferente para la absorción es la de nucleósido (Quan y cols., 1990; Gil y cols., 1993).

Las células tumorales tienen una gran capacidad para la síntesis de novo y de recuperación de nucleótidos, además de una reducción en la actividad de enzimas clave en el catabolismo de los mismos. En contraposición, las células epiteliales intestinales normales tienen una limitada actividad de las enzimas clave para la síntesis de novo de nucleótidos, lo que las hace ser más dependientes del aporte exógeno. Además, el pool intracelular de nucleótidos de las células tumorales es mayor que el que aparece en células no malignas (Sanderson y cols., 1994). Estos hechos parecen justificar la respuesta de las células Caco-2, e IEC-6 en condiciones de estrés nutricional por la ausencia o no de glutamina.

Sato y cols. realizaron ensayos utilizando los mismos nucleótidos que los empleados por He y cols., sin embargo, no usaron cantidades iguales de los mismos, sino que guardaron una proporcionalidad 10:1:1:1:1 en peso respecto a CMP, UMP, AMP, IMP y GMP, alegando que dicha relación en peso es la mantenida en la leche humana. A una cantidad total de 100 µgr/ml de nucleótidos totales, considerados por los autores como de rango filológico, al igual que los resultados obtenidos por He y cols., no encuentran mejora en la proliferación de caco-2, excepto si se le pone restricción de glutamina, mientras que si encuentran incremento de la proliferación de IEC-6 que depende de la concentración total de nucleósidos empleada. Por otro lado, al aplicar los nucleótidos de forma aislada a 70 µgr/ml (cantidad que tiene en la mezcla el CMP), sólo el nucleótido CMP mostró diferencias significativas respecto al control (Sato y cols., 1999). Por el contrario, los efectos nutricionales de los nucleótidos exógenos reportados por He y cols. no fueron observados cuando fueron administrados de forma individual (He y cols., 1993), por lo que el efecto estimulador de la proliferación del CMP tendrá un umbral inicial más allá de los 10 mg/l.

El empleo de una dieta a base de cereales adicionada de sal sódica de ADN extraído de huevas de pescado, ha demostrado mejorar el estado de salud e incrementar los niveles de IgG en niños malnutridos de una zona deprimida de Ghana, en el continente africano. El efecto de dicha sal sódica y de ARN procedente de levaduras, se ha valorado sobre la proliferación in vitro tanto de la línea Caco-2 como de IEC-6. La línea IEC-6 volvió a poner de manifiesto la mayor dependencia externa de nucleótidos. A condiciones óptimas no sufre cambios significativos respecto al control, mientras que a condiciones de limitación nutricional (eliminando la glutamina y reduciendo un 50% del suero fetal bovino) se mejoró la proliferación.

Estos datos de crecimiento de la línea IEC-6 contrastan con los obtenidos por nosotros, pudiendo deberse a que la biodisponibilidad celular de los nucleósidos a partir de los ácidos nucleicos sea escasa, notándose diferencias de crecimiento en condiciones de restricción nutricional pero insuficiente en condiciones normales. En nuestra metodología, al utilizar la forma química de nucleósido, garantizamos una buena disponibilidad intracelular.

Por otro lado, tanto el ADN como el ARN inhibieron la proliferación de las Caco-2 en condiciones nutricionales óptimas, pero la mantuvieron o mejoraron en condiciones de limitación nutricional, aunque el aumento de la proliferación se produjo más tarde que lo ocurrido en las células IEC-6. Para los autores, este hecho se debe a que las células tumorales usan como fuente de nucleótidos el ADN o ARN cuando las limitaciones nutricionales son prolongadas en el tiempo, además no consideran que los ácidos nucleicos aplicados sean tóxicos, ya que en condiciones de limitación nutricional se promovió el crecimiento (Holen, 2004). El efecto antiproliferativo lo relacionan con la expresión de receptores P2Y que ante la estimulación por parte de los nucleótidos exógenos inducen apoptosis e inhibición del crecimiento celular (Hopfner y cols., 2001).

La promoción de la proliferación por parte de la timidina en la mezcla de nucleósidos se puso de manifiesto muy tempranamente, ya a 25 μ M se

presentaron diferencias significativas, mientras que la uridina se retrasó hasta los 75µM en su efecto antiproliferativo. Estos datos contrastan con los encontrados por Ohyanagi y cols. para los que no se producen efectos inhibitorios sobre la síntesis de ADN o ARN en el caso de la uridina a menos de 230 µM. Sin embargo, su estudio se realiza durante 24 horas de incubación mientras que en nuestro caso las diferencias proliferativas significativas fueron encontradas a partir del sexto día de cultivo (Ohyanagi y cols., 1989). Del mismo modo, en los diferentes fluidos corporales la presencia de uridina se ve reducida respecto a los niveles de 100µM empleados en nuestros ensayos. Todo esto parece indicar que no es un acierto considerar los niveles al menos mayores de 75µM de uridina, como de rango fisiológico.

El efecto estimulante o inhibidor de los nucleótidos y nucleósidos sobre la proliferación celular depende del grado de diferenciación de las células, la fase del ciclo celular en la que se encuentren y del tiempo de incubación (Saez-Lara y cols., 2004). Ante la inhibición de la proliferación aparecida con la mezcla NU se nos plantearon varias alternativas que explicaran el suceso. Entre las opciones barajadas se pensó en una posible toxicidad de la mezcla, que afectando a la viabilidad celular fuese la responsable de la diferencias proliferativas. Otra posibilidad planteada fue la existencia de un diferente grado de diferenciación celular en los cultivos incubados con la mezcla de uridina, que mediante el bloqueo del ciclo celular, quedarán las células comprometidas en un estado no proliferativo en el que adquiriesen características diferenciadas.

La apoptosis en el epitelio intestinal es el más importante mecanismo responsable de la pérdida de las células epiteliales en el ápice de las vellosidades intestinales. De esta manera, el mantenimiento de la homeostasis epitelial pasa por un equilibrio entre la división celular y la apoptosis. Los niveles de apoptosis y necrosis encontradas en las células IEC-6, en los ensayos en condiciones de baja densidad celular, son similares a los encontrados en cultivos de células IEC-6 control reportados por otros autores (Neopikhanov y cols., 2000; Zhang y cols., 2004). Al no observarse diferencias significativas entre los diferentes grupos, no pueden ser explicadas las

modificaciones en los patrones de proliferación en base a variaciones de viabilidad celular, necrosis o apoptosis. No obstante, los nucleósidos mostraron cierta tendencia, en cuanto a una inferior tasa de apoptosis, aunque no constituyó diferencias significativas.

Los nucleósidos producen una reducción de la proporción de células en la fase de síntesis del ciclo celular y mayoritariamente la mezcla NT, este hecho puede ser debido a que la reutilización de los nucleósidos preformados adicionados, produzca una reducción del tiempo necesario para que las células completen la fase S, incrementándose por consiguiente la fase de G2/M, tal y como aparece en el grupo NT, si embargo el grupo NU no mantiene diferencias respecto al grupo control en cuanto a G2/M. Por otro lado, los nucleósidos producen un incremento de células en las fases G0-G1. El estudio por microscopía electrónica de transmisión mostró ciertos indicios de un mayor grado de organización diferenciada de los grupos tratados con nucleósidos, por lo que sería normal que cierto porcentaje de células se encontraran diferencialmente en las fases G0 de bloqueo del ciclo respecto al control (Fajkus y cols., 2003). El grupo NU mantuvo un comportamiento mixto entre el NT y el control pero no se pueden deducir claramente, variaciones en el perfil del ciclo que determinen las causas antiproliferativas.

Conforme progresa el proceso de diferenciación del epitelio intestinal se va produciendo expresión de villina (Soubeyran y cols., 1999; Houde y cols., 2001; Wang y cols., 2003). En nuestros cultivos la expresión es muy baja, indicando el grado de inmadurez de las células, sin embargo se observan diferencias en cuanto a los grupos tratados con nucleósidos, que cuentan con casi el doble de expresión del marcador respecto al grupo control. Este hecho viene a corroborar lo encontrado tanto por microscopía electrónica como por los resultados del ciclo celular en relación al incremento de las fases G0/G1.

La fosfatasa alcalina es al igual que la villina, otro marcador de diferenciación enterocítica (Ortega y cols., 1995a; Fan y cols., 2001; Hinnebusch y cols., 2002; Pacha y cols., 2002; Wood y cols., 2003). En nuestros ensayos a baja densidad celular paradójicamente se produce una

inversión de lo ocurrido con la expresión de villina. Los grupos tratados con nucleósidos muestran menos expresión del marcador. Esto nos llevaría a la deducción de un efecto antidiferenciador de los nucleósidos, que contradice los resultados obtenidos por las otras técnicas. Por lo que la información suministrada por este marcador no goza de mucha credibilidad.

Ensayos a alta densidad celular

Ametani y cols. consiguieron inducir la diferenciación enterocítica de células de la línea IEC-6 sin la utilización de una base de matriz extracelular. Determinaron que la diferenciación ocurre en presencia de suero fetal bovino, insulina y medio de cultivo DMEM, tras alcanzar la confluencia celular. Propusieron que una vez alcanzada la confluencia se establecen contactos célula-célula que dan lugar a interacciones efectivas entre las células y los componentes de membrana basal que van produciendo, induciéndose la diferenciación (Ametani y cols., 1996). Posteriormente Wood y cols. llegaron a la misma conclusión y observaron una estructuras similares a las aparecidas en cultivos de células IEC-6 sobre Matrigel que las denominaron estructura multicelulares tipo cresta sobre el día 5º de cultivo. Además, asociaron la expresión de fosfatasa alcalina principalmente a estas estructuras morfológicamente diferenciadas (Wood y cols., 2003).

Nosotros hemos encontrado de forma similar, diferenciación en las células IEC-6 a partir de un estado de confluencia celular. Los grupos tratados con nucleósidos presentaron estructuras morfológicamente diferenciadas tal y como se encontraron en los controles positivos realizados con células sembradas sobre Matrigel. Las zonas del cultivo caracterizadas por la agregación celular sin límites definidos, que presentaban un engrosamiento vertical, son las zonas denominadas por Word y cols. como estructuras de tipo cresta o cordillera. En dichas zonas las células no se organizan en monocapa como en el cultivo indiferenciado, sino que aparecen regiones multicelulares.

Las zonas multicelulares en cresta rodona generalmente espacios vacíos de células que son los mismos encontrados en el control positivo.

El estudio de la cantidad total de proteínas de los cultivos arrojó diferencias significativas entre el grupo control y los grupos de nucleósidos NT y NU. La cantidad total de proteína de los cultivos se asocia a una mayor proliferación celular (Saez-Lara y cols., 2004), sin embargo en los ensayos realizadas a alta densidad celular, ya se parte de una situación de confluencia por lo que el incremento de proteína total de los grupos de nucleósidos sólo puede ser debido al aumento del número de células en el cultivo organizado respecto a un crecimiento vertical en multicapa alimentando a las estructuras en creta o cordillera, o a la mayor producción de proteínas extracelulares por parte de las células IEC-6, ya que Quaroni describió la formación por parte de estas células de una matriz extracelular de material microfilamentoso, agregados globulares, y cubiertas de la superficie celular parecidas a la membrana basal (Quaroni y cols., 1979). En definitiva, siendo por un determinado proceso, por el otro o por una sinergia entre ambos, se puede concluir que los grupos tratados con nucleósidos tienen mayor grado de diferenciación celular.

El estudio de los marcadores de diferenciación mostró unos resultados similares a los obtenidos en condiciones de baja densidad celular. Los grupos NT y NU exhibieron similares resultados en cuanto a la expresión de villina y ambos superiores al grupo control. Esto complementa la información suministrada tanto por la microscopía óptica, como por las cantidades de proteína total en los cultivos. El incremento de expresión de la villina al pasar de las condiciones de baja densidad celular a alta densidad se ve aumentada en los tres tratamientos, aunque los grupos NT y NU experimentan una mayor aceleración respecto al control, por lo que se refleja que la adquisición de una situación diferenciada se va logrando a mayor velocidad.

Los niveles de fosfatasa alcalina volvieron a presentar el patrón inverso al de la villina. El grupo control con una expresión casi el doble a los otros dos grupos tratados con nucleósidos. Nuestra explicación del fenómeno se basa en

que la fosfatasa alcalina es una enzima que produce la hidrólisis del grupo fosfato de los nucleótidos para dar nucleósidos, que es la forma química de las purinas y pirimidinas preferente, en cuanto a la absorción por parte de los enterocitos. Las células del cultivo control parecen haber expresado mayor cantidad de la enzima en respuesta a la inexistencia de nucleósidos en el medio de cultivo, con la finalidad de llevar a cabo la hidrólisis de nucleótidos y poder así internalizarlos. Sin embargo, en trabajos como el de He y cols. la administración de nucleótidos produce un incremento en la actividad de las enzimas sacarasa y fosfatasa alcalina en células IEC-6 (He y cols., 1993). Si nuestra aproximación fuese correcta, este hecho se habría producido al suplementar los cultivos con el sustrato de la fosfatasa alcalina, que no es el mismo supuesto que en nuestro caso, en que el aporte es del producto final de la reacción que cataliza. Por ello, en el caso de que se hubiese incluido en nuestros ensayos un grupo experimental tratado con una mezcla análoga a las NT y NU pero en forma de nucleótidos, se hubiese esperado que los niveles de fosfatasa alcalina en dicho grupo hubieran estado a un nivel de expresión superior a nuestro grupo control.

Otro aspecto a destacar es que en los trabajos realizados por Wood y cols. determinan que la expresión de la fosfatasa alcalina intestinal no sufre modificaciones entre el cultivo preconfluyente y el cultivo en postconfluencia de 5 días (Wood y cols., 2003). Por el contrario, nuestros resultados muestran que si se produce variaciones entre las dos situaciones. Los valores de expresión de la proteína fosfatasa alcalina en baja densidad celular aumentan 1.61 veces para el grupo control, 2.39 y 2.53 veces para los grupos NT y NU respectivamente, al pasar a alta densidad celular. Estos datos muestran que al igual que lo encontrado por otros autores, al someter las células IEC-6 a condiciones propicias para la diferenciación, se produce un aumento en la expresión de fosfatasa alcalina (Carroll y cols., 1988; He y cols., 1993; Pacha y cols., 2002). Por otro lado, esos datos señalan que el crecimiento en expresión del marcador es mayor en los grupos de nucleósidos que en el control. Según nuestra explicación del paradójico comportamiento de la fosfatasa alcalina, al ir avanzando más rápidamente en el proceso de diferenciación celular, los grupos

tratados con nucleósidos aceleran la adquisición de la enzima respecto al grupo control, que también va en aumento pero a menor aceleración.

No obstante es necesario realizar nuevos ensayos encaminados a aclarar este efecto inicial de la fosfatasa alcalina, y comprobar si esa tendencia de crecimiento más ralentizado proporcionalmente al de los grupos tratados con nucleósidos se mantiene en el tiempo.

En definitiva, a tenor de nuestros resultados, el efecto de los nucleósidos exógenos en condiciones de alta densidad celular promueve la diferenciación celular, y concuerdan con los resultados obtenidos por He y cols., y Sato y cols. para los que los nucleótidos exógenos producen una mejora en la diferenciación de las células IEC-6 (He y cols., 1993; Sato y cols., 1999; Sato y cols., 2000). Además, las mezclas NT y NU en hepatocitos adultos también producen una mejora en el estado diferenciado de las células y una promoción de la funcionalidad (Arnaud y cols., 2003).

Recuperación con 5-Fluorouracilo

El 5-fluorouracilo es un agente antineoplásico muy utilizado en tumores sólidos como cáncer de mama e intestinal (Cunningham y cols., 2001), cuyo mecanismo de acción, previa transformación en la forma nucleotídica, es por un lado la inhibición de la enzima timidilato sintasa y por tanto de la síntesis de timidilato y del ADN, también puede introducirse en la cadena de ADN, generando daño en la molécula y por otro lado se puede incorporar en el ARN, produciendo la inhibición de la maduración del ARNr (Hatse y cols., 1999). Este proceso tiene un efecto beneficioso a nivel de los tejidos neoplásicos, pero por otra parte afecta de manera negativa a los tejidos sanos principalmente donde la renovación celular es alta, tal y como ocurre en el epitelio gastrointestinal (Vazquez Gallego y cols., 1984).

En nuestros cultivos de IEC-6, el 5-fluorouracilo produjo un claro perjuicio sobre la proliferación celular. No obstante, la presencia de nucleósidos

en los medios de cultivo contrareestó parcialmente dicho efecto. En modelos experimentales de cáncer de colon en rata, la administración de un pulso de 5-Fu produce inicialmente una inhibición de la actividad de la timidilato sintasa, que tras 24-48 horas queda recobrada (van der Wilt y cols., 1995). En nuestro modelo de trabajo, se produce un fenómeno parecido, ya que las células en los instantes iniciales no son capaces de soportar el crecimiento, y a partir del tercer día se comienzan a percibir variaciones entre los grupos. Esta respuesta de los diferentes tratamientos puede ser debida en parte a la síntesis de nueva timidilato sintasa, pero el hecho de que el grupo control no tuviese capacidad de mejorar su crecimiento nos indica que la recuperación se produce mayoritariamente por los nucleósidos.

En nuestros ensayos de recuperación con 5-Fu, los grupos tratados con la mezcla que presentaba timidina respondían mucho mejor que los otros dos grupos también tratados con el fármaco, de hecho, la presencia de timidina en los fluidos corporales produce una reducción en la eficiencia de los fármacos inhibidores de la timidilato sintasa, de manera que la reducción artificial de la concentración de timidina con la administración de timidina fosforilasa conlleva a un incremento en la toxicidad de los fármacos (Jackman y cols., 1995; Cao y cols., 1999). El mecanismo por el que esto se produce es por la recuperación de timidina hacia dTMP, incrementando los reducidos niveles producidos por la acción del 5-Fu (van der Wilt y cols., 2001). Por otro lado, la mezcla sin timidina y con uridina tuvo una recuperación mucho mejor que la del control tratado con el fármaco, por lo que es de suponer algún tipo de conversión hacia timidina o sus derivados, o bien que a partir de los tres primeros días comenzó a sintetizarse timidilato sintetasa y se fue recuperando el crecimiento. Sin embargo, al realizar el análisis comparativo del crecimiento entre los diferentes grupos experimentales, ante el tratamiento o no con el fármaco, se observa como los dos grupos con nucleósidos consiguen mantener el mismo porcentaje de células respecto a la situación sin pretratar. Por ello, aunque sea cierto que el grupo con timidina presentar mayor crecimiento, el grupo con uridina mantuvo el cultivo ante la presión del 5-fluorouracilo de modo proporcional a lo conseguido por la mezcla de timidina, por lo que el número de células que lo diferencia del grupo NT podría ser debido a los efectos inhibitorios de la uridina

por sí sola, tal y como ocurre en los ensayos de baja densidad celular. La observación a microscopía óptica puso de manifiesto las grandes diferencias entre los grupos, y más intensamente la anormal morfología de las células control tratado con el fármaco.

Los efectos producidos por el fármaco en las células IEC-6 a nivel del ciclo celular son principalmente la acumulación en la fase de síntesis y la reducción de la localización en G2/M. Entre los grupos NT y NU la diferencia más notable es que la contribución para el incremento de la fase de síntesis procede tanto de la G0/G1 como de la G2/M para el caso del grupo NU, mientras que para el grupo NT el aporte es casi íntegro de la fase G2/M. Además, el 5-Fu produce una fuerte reducción de la viabilidad celular en los tres grupos.

El grupo control-5Fu presenta el peor perfil de viabilidad, necrosis y apoptosis. Los grupos tratados con nucleósidos tuvieron un comportamiento algo diferente. EL grupo NT obtuvo mejor nivel de necrosis que los otros dos pero no se diferenció del grupo control respecto a la apoptosis, mientras que el grupo NU tuvo el nivel más bajo de apoptosis de los tres grupos.

Los efectos del fármaco tanto a nivel del ciclo celular y apoptosis son los mismos reportados en trabajos de farmacología antitumoral con cáncer de mama. En células de la línea MCF-7 de mama, se produce tras la aplicación del 5-Fu una parada en la fase de síntesis, justificada por la incapacidad de las células para la síntesis de timidilato, que es el mismo mecanismo encontrado en nuestras células. Por otro lado el 5-Fu produce efectos citotóxicos e inducción de la apoptosis dependiente de p-53 (Marchal y cols., 2004). Del mismo modo, la administración del fármaco en ratones produce muerte apoptótica asociada a altos niveles de p53, mientras que en ratones Knockout para el gen no asumen apoptosis (Pritchard y cols., 1997)

La toxicidad del 5-Fu a nivel gastrointestinal parece estar producida principalmente por la incorporación de los nucleótidos derivados tras su activación intracelular, al ARN (Houghton y cols., 1979; Geoffroy y cols., 1994).

La administración de uridina tras el 5-Fluorouracilo produce el rescate tanto en ratones como en pacientes de la toxicidad del 5-Fluorouracilo (Pinedo y cols., 1988), esto es debido a que los nucleótidos naturales derivados de la uridina suministrada son capaces de competir con los derivados del 5-Fu respecto a la intención de incorporarse al ARN, evitando así la aparición de los efectos citotóxicos. Esto puede explicar como el grupo NU que no lleva timidina consigue finalmente unos niveles de crecimiento proporcionales a los encontrados en el grupo NT aún sin llevar timidina, que sería la forma intuitiva más directa de salvar la acción del fármaco. Además, los efectos citotóxicos no se han visto prevenidos con la acción de timidina. Esto concuerda con los resultados obtenidos en el grupo NT. Por un lado al poseer niveles importantes de timidina se hubiese esperado tener una evolución prácticamente normal, al estar garantizada la síntesis de ADN, pero se observa que el crecimiento dista de manera importante del registrado por el grupo control no tratado con nucleósidos y del mismo grupo NT sin tratar con 5-Fu. Dado que la toxicidad está mediada principalmente por los efectos en ARN, se puede entender que no haya tenido una evolución normal, sin embargo ha conseguido un crecimiento considerablemente mejor que el grupo NU, esto sería posible debido a la conversión entre citidina y uridina, que permitiría amortiguar la toxicidad en el ARN.

Se ha comprobado que la uridina no tiene efecto en la apoptosis iniciada por la radiación en animales de experimentación, pero si se ha visto como es capaz de inhibir la muerte apoptótica dependiente de p53 inducida por el 5-Fu, mientras que la timidina no es capaz (Pritchard y cols., 1997). Esto hallazgos justifican nuestros resultados obtenidos en cuanto a los niveles de apoptosis encontrados en los diferentes grupos. Las células recuperadas con la mezcla de uridina tuvieron los niveles más bajos de apoptosis, diferenciándose estadísticamente de los otros dos grupos. Las células con tratamiento NT, si bien redujeron la media en dichos niveles, debidos a la posible conversión de citidina en uridina, no fue lo suficientemente importante como para establecer diferencias significativas con el control-5Fu.

En conclusión la timidina invalida los efectos producidos por el 5-Fu en cuanto a la inhibición de la timidilato sintasa, mientras que la uridina inhibe la incorporación de 5-Fu en el ARN. Por ello el tratamiento más adecuado respecto al número de células resultante y viabilidad celular, para la recuperación de las células IEC-6 tras la agresión quimioterápica parece ser la mezcla NT.

Dado que se podría suponer las cantidades de nucleósidos utilizadas en los estudios realizados como de aporte superior al de las condiciones fisiológicas normales, y debido a que las células normales presentan mayor dependencia al aporte exógeno que las células tumorales, sería muy interesante realizar el estudio comparativo de la recuperación de la línea normal IEC-6 y una tumoral como Caco-2 o HT-29 frente al tratamiento con 5-Fluorouracilo, en presencia o no de nucleósidos. Nuestros ensayos reflejan que la recuperación con la mezcla NT produce un efecto favorecedor muy importante, pero ¿pasará lo mismo con las líneas tumorales? ¿sería posible un resultado como el encontrado en los estudios de He y cols (1993) y Sato y cols.(1999) en el que, a diferencia de las células no malignas, manteniendo niveles suficientes de glutamina no se producen modificaciones en la proliferación de las células tumorales?. En caso afirmativo, se podría estudiar la posible aplicación terapéutica de la mezcla NT en la recuperación del epitelio sano tras el tratamiento de agentes quimioterápicos, con el fin de reducir por consiguiente la toxicidad de dichos compuestos en los tejidos sanos.

Análisis de la incorporación de nucleósidos marcados

Los resultados obtenidos sobre la absorción de nucleósidos púricos y pirimidínicos muestran que ambos tipos son captados rápidamente, existiendo al cabo de 4 horas el 25.89 % y el 21.07% de uridina y guanosina respectivamente en el medio de cultivo. Estos datos se corresponden parcialmente a la velocidad de captación de los nucleósidos encontrados en cultivos de hepatocitos aislados de rata adulta, donde partiendo de las mezclas NT y NU a 100 μ M tanto la uridina como la guanosina e inosina desaparecen

del medio de cultivo a las 24 horas (Arnaud y cols., 2003). En nuestros resultados no aparecen diferencias significativas en la captación de ambos nucleósidos, pero a nivel de hepatocitos la guanosina e inosina desaparecían del medio de cultivo al cabo de 0 a 3 horas, mientras que la uridina va reduciendo su concentración en el medio de cultivo de forma moderada hasta desaparecer tras 24 horas. Al cabo de entre 3 y 5 horas la concentración de uridina se sitúa en unos 75 μM , cuando en nuestras células estábamos a un 25.89%. En los hepatocitos la concentración de timidina cayó bruscamente hasta el 20% de la concentración inicial al cabo de 5 horas, que es aproximadamente lo sucedido tanto a la guanosina como a la uridina en las células IEC-6. En relación a estos datos podemos entender que las células IEC-6 tienen mayor capacidad de captación de la uridina y menor de guanosina en comparación con hepatocitos adulto.

En hepatocitos fetales la situación es muy diferente. En general, la capacidad de absorción es mucho menor en comparación con los hepatocitos adultos y con las células IEC-6. Respecto a la guanosina al cabo de 48 horas se consigue absorber entre un 50% y un 60% de los 100 μM puestos inicialmente en las mezclas NT y NU. La uridina en dicho período de tiempo se encuentra sobre el nivel del 70 μM en el medio de cultivo (Saez-Lara y cols., 2004). Un aspecto interesante mostrado en el estudio realizado por Saez y cols. es que la absorción de los nucleósidos de las mezclas NT y NU se ven escasamente influenciados por el hecho de formar parte de una u otra mezcla. En nuestro estudio de incorporación de los nucleósidos radioactivos se han usado las dos mezclas para valorar la absorción de distintos nucleósidos, guanosina en NT y uridina en NU, por lo que sería posible pensar que el comportamiento en la captación de guanosina formando parte de la mezcla NT no tendría que corresponderse con lo que ocurriría al estudiar el mismo proceso desde la mezcla NU. Por ello, sería interesante estudiar si en el caso de las células IEC-6 ocurre lo mismo que en los hepatocitos embrionarios.

Una vez absorbidos los mezclas nucleósidos, se produce un incremento en el pool intracelular de nucleótidos. En hepatocitos adultos, los efectos de las mezclas NT y NU a 100 μM aumentaron la concentración intracelular de los

nucleótidos totales analizados excepto los derivados de guanosina (Arnaud y cols., 2003). La administración de AMP en células Caco-2 produce un incremento intracelular tanto de AMP, como de ATP, NAD, adenina y adenosina (He y cols., 1993).

El análisis del recuento de marcas radioactivas de las imágenes obtenidas por autorradiografía a nivel de microscopía electrónica de transmisión muestran como conforme avanza el tiempo se va produciendo un incremento de incorporación intracelular. Esta descripción se complementa con la absorción estudiada anteriormente de los nucleósidos tritiados. No obstante, se perciben algunas diferencias entre la guanosina y uridina. Al cabo de las 4 horas la incorporación de guanosina en el total de las células es superior al de uridina, sin embargo esto no se aprecia en la curva de absorción. Este hecho puede deberse a una diferente utilización de los dos grupos de nucleósidos por parte de las células IEC-6. En 1994, Sanderson y colaboradores realizaron estudios sobre la absorción de nucleósidos y el transporte transepitelial en los dos sentidos, de apical a basolateral y viceversa, utilizando células caco-2 diferenciadas. Se adicionaron nucleósidos marcados radiactivamente en los cultivos y obtuvieron muestras a los 20, 40, 60, 120 y 180 min, tanto del medio apical como del basolateral. Dedujeron que el transporte desde la región apical hacia la basolateral fue más rápido y presentó mayor capacidad que el proceso inverso. También hubo diferencias respecto a los diferentes nucleósidos, siendo la guanosina uno de los más rápidamente transportados. (Sanderson y cols., 1994). En relación a esto, en nuestras células IEC-6 es posible que se hayan producido variaciones en los niveles de transporte transepitelial, de manera que se liberaran diferencialmente los nucleósidos tritiados en el compartimento inferior de los transwells, explicando así las diferencias entre lo ocurrido con la guanosina y uridina. Para comprobar esto es necesaria la realización de nuevas experiencias que contemplen el análisis de la concentración radioactiva tanto del compartimento superior (apical) como inferior (basolateral).

Tanto en el caso de guanosina como en uridina, y durante todos los tiempos de incubación analizados, el marcaje se contenía mayoritariamente en

el núcleo celular. La guanosina es un nucleósidos que tras su recuperación en nucleótidos puede ser incorporada para la de ácidos nucleicos, por lo que su localización diferencial en el núcleo celular parece indicar que la célula lo utiliza mayoritariamente para este fin. La uridina, puede ser usada por las células para la síntesis de ARN, de hecho la administración de uridina tritiada es utilizada de forma rutinaria para la demostración de la síntesis de ARN (Nagata, 1998). Estas apreciaciones parecen indicar que los nucleósidos exógenos son utilizados por las células IEC-6 principalmente para la síntesis de ácidos nucleicos.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La mezcla NT de nucleósidos estimulan la proliferación de las células epiteliales intestinales IEC-6.
2. La uridina ejerce un papel antiproliferativo en la mezcla de nucleósidos, lo que parece indicar que la concentración de 100 μM no puede ser considerada como de rango fisiológico, debiendo situarse esta por debajo de los 75 μM .
3. El efecto antiproliferativo de la uridina no está mediado por un proceso que afecte a la apoptosis, viabilidad celular o al grado de diferenciación celular.
4. Los nucleósidos exógenos producen una reducción de la duración de la fase de síntesis en el ciclo celular de las células IEC-6.
5. Los nucleósidos exógenos estimulan la diferenciación de las células IEC-6.
6. La utilización de la fosfatasa alcalina como marcador de diferenciación enterocítica en células IEC-6 no parece adecuado, por lo que sugerimos el uso de un marcador estructural como la villina.
7. El comportamiento de las mezclas de nucleósidos, NT y NU, en el proceso de diferenciación es similar, mientras que sobre la proliferación existen profundas diferencias entre ambas mezclas.
8. El cultivo de las células IEC-6 en confluencia celular es un modelo adecuado para el estudio de la diferenciación enterocítica.
9. El medio de cultivo bajo en suero empleado en los diferentes ensayos es capaz de mantener el crecimiento del cultivo, así como de permitir la diferenciación enterocítica.

10. El fármaco 5-Fluorouracilo produce un gran impacto sobre las células IEC-6 que afecta a la capacidad proliferativa, morfología, fases del ciclo celular y niveles de viabilidad, necrosis y apoptosis.

11. La recuperación de la agresión producida por el fármaco 5-fluorouracilo se ve claramente favorecida por la presencia de nucleósidos, y el perfil de dicha recuperación dependerá del tipo de combinaciones de nucleósidos utilizadas.

12. Las células IEC-6 en cultivo presentan una gran capacidad para la absorción tanto de nucleósidos púricos como pirimidínicos, aunque parecen existir indicios de una diferente tasa de liberación transepitelial.

13. Los resultados obtenidos por autorradiografía parecen indicar que el uso principal que se les da a los nucleósidos exógenos por parte de las células IEC-6 es la síntesis de ácidos nucleicos.

BIBLIOGRAFÍA

- Ametani A., Hachimura S., Yamamoto Y., Shimizu M., Imaoka A., Yi H. K., Hashimoto K. Consecutive events of growth, differentiation and death of the small intestinal epithelial cell line, IEC-6. **In Vitro Cell Dev Biol Anim** 1996; 32(3): 127-30.
- Arnaud A., Fontana L., Angulo A. J., Gil A., Lopez-Pedrosa J. M. Exogenous nucleosides alter the intracellular nucleotide pool in hepatic cell cultures. Implications in cell proliferation and function. **Clin Nutr** 2003; 22(4): 391-9.
- Arnaud A., Fontana L., Saez-Lara M. J., Gil A., Lopez-Pedrosa J. M. Exogenous nucleosides modulate the expression of rat liver extracellular matrix genes in single cultures of primary hepatocytes and a liver stellate cell line and in their co-culture. **Clin Nutr** 2004; 23(1): 43-51.
- Athman R., Louvard D., Robine S. The epithelial cell cytoskeleton and intracellular trafficking. III. How is villin involved in the actin cytoskeleton dynamics in intestinal cells? **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 2002; 283(3): G496-502.
- Baldwin S. A., Beal P. R., Yao S. Y., King A. E., Cass C. E., Young J. D. The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. **Pflugers Arch** 2004; 447(5): 735-43.
- Baldwin S. A., Mackey J. R., Cass C. E., Young J. D. Nucleoside transporters: molecular biology and implications for therapeutic development. **Mol Med Today** 1999; 5(5): 216-24.
- Beaulieu J. F., Weiser M. M., Herrera L., Quaroni A. Detection and characterization of sucrase-isomaltase in adult human colon and in colonic polyps. **Gastroenterology** 1990; 98(6): 1467-77.
- Beck P. L., Rosenberg I. M., Xavier R. J., Koh T., Wong J. F., Podolsky D. K. Transforming growth factor-beta mediates intestinal healing and susceptibility to injury in vitro and in vivo through epithelial cells. **Am J Pathol** 2003; 162(2): 597-608.
- Blake M. S., Johnston K. H., Russell-Jones G. J., Gotschlich E. C. A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. **Anal Biochem** 1984; 136(1): 175-9.
- Boza J. J., Moennoz D., Bournot C. E., Blum S., Zbinden I., Finot P. A., Ballevre O. Role of glutamine on the de novo purine nucleotide synthesis in Caco-2 cells. **Eur J Nutr** 2000; 39(1): 38-46.
- Brittan M., Wright N. A. Gastrointestinal stem cells. **J Pathol** 2002; 197(4): 492-509.
- Brunser O., Espinoza J., Araya M., Cruchet S., Gil A. Effect of dietary nucleotide supplementation on diarrhoeal disease in infants. **Acta Paediatr** 1994; 83(2): 188-91.

- Bueno J., Torres M., Almendros A., Carmona R., Nunez M. C., Rios A., Gil A. Effect of dietary nucleotides on small intestinal repair after diarrhoea. Histological and ultrastructural changes. **Gut** 1994; 35(7): 926-33.
- Burgess A. W. Growth control mechanisms in normal and transformed intestinal cells. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** 1998; 353(1370): 903-9.
- Burridge P. W., Woods R. A., Henderson J. F. Utilization of dietary nucleic acid purines for nucleotide and nucleic acid synthesis in the mouse. **Can J Biochem** 1976; 54(5): 500-6.
- Cairnie A. B., Lamerton L. F., Steel G. G. Cell proliferation studies in the intestinal epithelium of the rat. I. Determination of the kinetic parameters. **Exp Cell Res** 1965; 39(2): 528-38.
- Calhau C., Martel F., Hipolito-Reis C., Azevedo I. Differences between duodenal and jejunal rat alkaline phosphatase. **Clinical Biochemistry** 2000; 33(7): 571.
- Cao S., McGuire J. J., Rustum Y. M. Antitumor activity of ZD1694 (tomudex) against human head and neck cancer in nude mouse models: role of dosing schedule and plasma thymidine. **Clin Cancer Res** 1999; 5(7): 1925-34.
- Carroll K. M., Wong T. T., Drabik D. L., Chang E. B. Differentiation of rat small intestinal epithelial cells by extracellular matrix. **Am J Physiol** 1988; 254(3 Pt 1): G355-60.
- Carver J. D. Dietary nucleotides: cellular immune, intestinal and hepatic system effects. **J Nutr** 1994; 124(1 Suppl): 144S-148S.
- Carver J. D. Dietary nucleotides: effects on the immune and gastrointestinal systems. **Acta Paediatr Suppl** 1999; 88(430): 83-8.
- Carver J. D. Advances in nutritional modifications of infant formulas. **Am J Clin Nutr** 2003; 77(6): 1550S-1554.
- Carver J. D., Pimentel B., Cox W. I., Barness L. A. Dietary nucleotide effects upon immune function in infants. **Pediatrics** 1991; 88(2): 359-63.
- Carver J. D., Saste M., Sosa R., Zaritt J., Kuchan M., Barness L. A. The effects of dietary nucleotides on intestinal blood flow in preterm infants. **Pediatr Res** 2002; 52(3): 425-9.
- Carver J. D., Sosa R., Saste M., Kuchan M. Dietary nucleotides and intestinal blood flow velocity in term infants. **J Pediatr Gastroenterol Nutr** 2004; 39(1): 38-42.
- Carver J. D., Walker W. A. The role of nucleotides in human nutrition. **J Nutr Biochem** 1995; 6: 58-72.

- Casado F. J., Lostao M. P., Aymerich I., Larrayoz I. M., Duflot S., Rodríguez-Mulero S., Pastor-Anglada M. Nucleoside transporters in absorptive epithelia. **J Physiol Biochem** 2002; 58(4): 207-16.
- Cass C. E., Young J. D., Baldwin S. A. Recent advances in the molecular biology of nucleoside transporters of mammalian cells. **Biochem Cell Biol** 1998; 76(5): 761-70.
- Clatworthy J. P., Subramanian V. Stem cells and the regulation of proliferation, differentiation and patterning in the intestinal epithelium: emerging insights from gene expression patterns, transgenic and gene ablation studies. **Mech Dev** 2001; 101(1-2): 3-9.
- Clifford A. J., Story D. L. Levels of purines in foods and their metabolic effects in rats. **J Nutr** 1976; 106: 435-442.
- Colbeau A., Maroux S. Integration of alkaline phosphatase in the intestinal brush border membrane. **Biochim Biophys Acta** 1978; 511(1): 39-51.
- Cooper G., Hausman R. (2004). The cell. A molecular approach. Washington, ASM Press.
- Corkins M. R., Vanderhoof J. A., Slentz D. H., MacDonald R. G., Park J. H. Growth stimulation by transfection of intestinal epithelial cells with an antisense insulin-like growth factor binding protein-2 construct. **Biochem Biophys Res Commun** 1995; 211(3): 707-13.
- Cory J. G. (1997). Textbook of biochemistry: with clinical correlations. New York, USA.
- Cosgrove M. Perinatal and infant nutrition. Nucleotides. **Nutrition** 1998; 14(10): 748-51.
- Cunningham D., Coleman R. New options for outpatient chemotherapy--the role of oral fluoropyrimidines. **Cancer Treat Rev** 2001; 27(4): 211-20.
- Chakrabarty A., Anderson N. J., Beutner R., Tying S. K. Valacyclovir for the management of herpes viral infections. **Skin Therapy Lett** 2005; 10(1): 1-4.
- Chantret I., Chevalier G., Dussaulx E., Zweibaum A. A and H blood group antigens as markers of sucrase-isomaltase from the enterocyte-like differentiated human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2. **Cancer Res** 1987; 47(5): 1426-33.
- Chen K., Nezu R., Wasa M., Sando K., Kamata S., Takagi Y., Okada A. Insulin-like growth factor-1 modulation of intestinal epithelial cell restitution. **JPEN J Parenter Enteral Nutr** 1999; 23(5 Suppl): S89-92.
- Dash B. C., El-Deiry W. S. Cell cycle checkpoint control mechanisms that can be disrupted in cancer. **Methods Mol Biol** 2004; 280: 99-161.

- De Antonio I., Torres-Jimenez R., Verdu-Perez A., Prior de Castro C., Garcia-Puig J. Tratamiento del síndrome de Lesch-Nyhan. **Rev Neurol** 2002; 35(9): 877-83.
- Devlin T. M. (1997). Textbook of biochemistry with clinical correlations. New York, Wiley-Liss.
- Dignass A. U. Mechanisms and modulation of intestinal epithelial repair. **Inflamm Bowel Dis** 2001; 7(1): 68-77.
- Engle M. J., Alpers D. H. The two mRNAs encoding rat intestinal alkaline phosphatase represent two distinct nucleotide sequences. **Clin Chem** 1992; 38(12): 2506-9.
- Estlin E. J. Continuing therapy for childhood acute lymphoblastic leukaemia: clinical and cellular pharmacology of methotrexate, 6-mercaptopurine and 6-thioguanine. **Cancer Treat Rev** 2001; 27(6): 351-63.
- Fajkus J., Borsky M., Kunicka Z., Kovarikova M., Dvorakova D., Hofmanova J., Kozubik A. Changes in telomerase activity, expression and splicing in response to differentiation of normal and carcinoma colon cells. **Anticancer Res** 2003; 23(2B): 1605-12.
- Fan M. Z., Stoll B., Jiang R., Burrin D. G. Enterocyte digestive enzyme activity along the crypt-villus and longitudinal axes in the neonatal pig small intestine. **J Anim Sci** 2001; 79(2): 371-81.
- Fernandez I., Torres I., Moreira E., Fontana L., Gil A., Rios A. Influence of administration of long-chain polyunsaturated fatty acids on process of histological recovery in liver cirrhosis produced by oral intake of thioacetamide. **Dig Dis Sci** 1996; 41(1): 197-207.
- Fishman P., Bar-Yehuda S., Madi L., Cohn I. A3 adenosine receptor as a target for cancer therapy. **Anticancer Drugs** 2002; 13(5): 437-43.
- Fontana L. (1993). Contribución de los nucleótidos de la dieta al tratamiento de la cirrosis hepática experimental producida por tioacetamida, Universidad de Granada.
- Fontana L., Moreira E., Torres M. I., Fernandez I., Rios A., Sanchez de Medina F., Gil A. Dietary nucleotides correct plasma and liver microsomal fatty acid alterations in rats with liver cirrhosis induced by oral intake of thioacetamide. **J Hepatol** 1998; 28(4): 662-9.
- Freshney R. I. (2000). Culture of animal cells. A manual of basic technique. New York, Wiley-Liss, Inc.
- García-Porrero J. A., Hurlé J. M. (2005). Anatomía humana. Madrid, McGraw-Hill-Interamericana de España, S. A. U.

- Geoffroy F. J., Allegra C. J., Sinha B., Grem J. L. Enhanced cytotoxicity with interleukin-1 alpha and 5-fluorouracil in HCT116 colon cancer cells. **Oncol Res** 1994; 6(12): 581-91.
- Georgiev I. P., Georgieva T. M., Pfaffl M., Hammon H. M., Blum J. W. Insulin-like growth factor and insulin receptors in intestinal mucosa of neonatal calves. **J Endocrinol** 2003; 176(1): 121-32.
- Gil A. Modulation of the immune response mediated by dietary nucleotides. **Eur J Clin Nutr** 2002; 56 Suppl 3: S1-4.
- Gil A., Corral E., Martínez A., Molina J. A. Effects of the addition of nucleotides to an adapted milk formula on the microbial pattern of faeces in at-term newborn infants. **J. Clin. Nutr. Gastroenterol.** 1986; 1: 127-132.
- Gil A., Jiménez J., Navarro J., Núñez M. C. (1993). Nucleótidos y nutrición.
- Gil A., Sanchez-Medina F. Acid-soluble nucleotides of cow's, goat's and sheep's milks, at different stages of lactation. **J Dairy Res** 1981; 48(1): 35-44.
- Gil A., Sanchez-Medina F. Acid-soluble nucleotides of human milk at different stages of lactation. **J Dairy Res** 1982; 49(2): 301-7.
- Glinka A., Wu W., Delius H., Monaghan A. P., Blumenstock C., Niehrs C. Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. **Nature** 1998; 391(6665): 357-62.
- Gordon J. I., Schmidt G. H., Roth K. A. Studies of intestinal stem cells using normal, chimeric, and transgenic mice. **Faseb J** 1992; 6(12): 3039-50.
- Gray J. H., Owen R. P., Giacomini K. M. The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. **Pflugers Arch** 2004; 447(5): 728-34.
- Grewal R., Mahmood A. Coordinated secretion of alkaline phosphatase into serum and intestine in fat-fed rats. **Indian J Gastroenterol** 2004; 23(5): 175-7.
- Hanna S. D., Mircheff A. K., Wright E. M. Alkaline phosphatase of basal lateral and brush border plasma membranes from intestinal epithelium. **J Supramol Struct** 1979; 11(4): 451-66.
- Hatse S., De Clercq E., Balzarini J. Role of antimetabolites of purine and pyrimidine nucleotide metabolism in tumor cell differentiation. **Biochem Pharmacol** 1999; 58(4): 539-55.
- Hauri H. P., Quaroni A., Isselbacher K. J. Biogenesis of intestinal plasma membrane: posttranslational route and cleavage of sucrase-isomaltase. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1979; 76(10): 5183-6.
- Hauri H. P., Sterchi E. E., Bienz D., Fransen J. A., Marxer A. Expression and intracellular transport of microvillus membrane hydrolases in human intestinal epithelial cells. **J Cell Biol** 1985; 101(3): 838-51.

- He Y., Chu S. H., Walker W. A. Nucleotide supplements alter proliferation and differentiation of cultured human (Caco-2) and rat (IEC-6) intestinal epithelial cells. **J Nutr** 1993; 123(6): 1017-27.
- Hinnebusch B. F., Ma Q., Henderson J. W., Siddique A., Archer S. Y., Hodin R. A. Enterocyte response to ischemia is dependent on differentiation state. **J Gastrointest Surg** 2002; 6(3): 403-9.
- Hirata K., Horie T. Stimulation of intestinal epithelial restitution by prostaglandin E(1) analogue. **Cancer Chemother Pharmacol** 2003; 51(3): 216-20.
- Ho C. Y., Miller K. V., Savaiano D. A., Crane R. T., Ericson K. A., Clifford A. J. Absorption and metabolism of orally administered purines in fed and fasted rats. **J Nutr** 1979; 109(8): 1377-82.
- Holen E. Dietary nucleotides and intestinal cell lines: I. Modulation of growth. **Nutr res** 2004; 24: 197-207.
- Hopfner M., Maaser K., Barthel B., von Lampe B., Hanski C., Riecken E. O., Zeitz M., Scherubl H. Growth inhibition and apoptosis induced by P2Y2 receptors in human colorectal carcinoma cells: involvement of intracellular calcium and cyclic adenosine monophosphate. **Int J Colorectal Dis** 2001; 16(3): 154-66.
- Houde M., Laprise P., Jean D., Blais M., Asselin C., Rivard N. Intestinal epithelial cell differentiation involves activation of p38 mitogen-activated protein kinase that regulates the homeobox transcription factor CDX2. **J Biol Chem** 2001; 276(24): 21885-94.
- Houghton J. A., Houghton P. J., Wooten R. S. Mechanism of induction of gastrointestinal toxicity in the mouse by 5-fluorouracil, 5-fluorouridine, and 5-fluoro-2'-deoxyuridine. **Cancer Res** 1979; 39(7 Pt 1): 2406-13.
- Huang N., Wang D. J., Heppel L. A. Extracellular ATP is a mitogen for 3T3, 3T6, and A431 cells and acts synergistically with other growth factors. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1989; 86(20): 7904-8.
- Iijima S., Tsujinaka T., Kido Y., Hayashida Y., Ishida H., Homma T., Yokoyama H., Mori T. Intravenous administration of nucleosides and a nucleotide mixture diminishes intestinal mucosal atrophy induced by total parenteral nutrition. **JPEN J Parenter Enteral Nutr** 1993; 17(3): 265-70.
- Iwasa M., Iwasa Y., Ohmori Y., Ogoshi S. Effect of administration of nucleosides and nucleotides on protein turnover and the hypoxic myocardium. **J Gastroenterol** 2000; 35 Suppl 12: 25-8.
- Jackman A. L., Farrugia D. C., Gibson W., Kimbell R., Harrap K. R., Stephens T. C., Azab M., Boyle F. T. ZD1694 (Tomudex): a new thymidylate synthase inhibitor with activity in colorectal cancer. **Eur J Cancer** 1995; 31A(7-8): 1277-82.

- Janas L. M., Picciano M. F. The nucleotide profile of human milk. **Pediatr Res** 1982; 16(8): 659-62.
- Jasleen J., Ashley S. W., Shimoda N., Zinner M. J., Whang E. E. Glucagon-like peptide 2 stimulates intestinal epithelial proliferation in vitro. **Dig Dis Sci** 2002; 47(5): 1135-40.
- Jehle P. M., Fussgaenger R. D., Blum W. F., Angelus N. K., Hoeflich A., Wolf E., Jungwirth R. J. Differential autocrine regulation of intestine epithelial cell proliferation and differentiation by insulin-like growth factor (IGF) system components. **Horm Metab Res** 1999; 31(2-3): 97-102.
- Jimenez A., Pubill D., Pallas M., Camins A., Llado S., Camarasa J., Escubedo E. Further characterization of an adenosine transport system in the mitochondrial fraction of rat testis. **Eur J Pharmacol** 2000; 398(1): 31-9.
- Junqueira L. C., Carneiro J. (1996). Histología básica. Texto y atlas. Barcelona, Masson, S.A.
- Kerr J. F., Wyllie A. H., Currie A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer** 1972; 26(4): 239-57.
- Kitchen P. A., Fitzgerald A. J., Goodlad R. A., Barley N. F., Ghatei M. A., Legon S., Bloom S. R., Price A., Walters J. R., Forbes A. Glucagon-like peptide-2 increases sucrase-isomaltase but not caudal-related homeobox protein-2 gene expression. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 2000; 278(3): G425-8.
- Kleinman H. K., McGarvey M. L., Liotta L. A., Robey P. G., Tryggvason K., Martin G. R. Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. **Biochemistry** 1982; 21(24): 6188-93.
- 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(3): 197-206.
- Korinek V., Barker N., Moerer P., van Donselaar E., Huls G., Peters P. J., Clevers H. Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. **Nat Genet** 1998; 19(4): 379-83.
- Kumar R. 5-(1-Substituted) alkyl pyrimidine nucleosides as antiviral (herpes) agents. **Curr Med Chem** 2004; 11(20): 2749-66.
- Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 1970; 227(5259): 680-5.

- Le Du M. H., Millan J. L. Structural evidence of functional divergence in human alkaline phosphatases. **J Biol Chem** 2002; 277(51): 49808-14.
- Leach J. L., Baxter J. H., Molitor B. E., Ramstack M. B., Masor M. L. Total potentially available nucleosides of human milk by stage of lactation. **Am J Clin Nutr** 1995; 61(6): 1224-30.
- Lee C. S., Kaestner K. H. Clinical endocrinology and metabolism. Development of gut endocrine cells. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab** 2004; 18(4): 453-62.
- Lee H., Hanes J., Johnson K. A. Toxicity of nucleoside analogues used to treat AIDS and the selectivity of the mitochondrial DNA polymerase. **Biochemistry** 2003; 42(50): 14711-9.
- Leedham S. J., Brittan M., McDonald S. A., Wright N. A. Intestinal stem cells. **J Cell Mol Med** 2005; 9(1): 11-24.
- Leiva J., Mendoza J., Navarro J. M., Plata J. C., de la Rosa M. [Pattern of antibodies in acute human brucellosis defined by Western blotting]. **Enferm Infecc Microbiol Clin** 1990; 8(1): 15-8.
- LeLeiko N. S., Bronstein A. D., Baliga B. S., Munro H. N. De novo purine nucleotide synthesis in the rat small and large intestine: effect of dietary protein and purines. **J Pediatr Gastroenterol Nutr** 1983; 2(2): 313-9.
- Leleiko N. S., Martin B. A., Walsh M., Kazlow P., Rabinowitz S., Sterling K. Tissue-specific gene expression results from a purine- and pyrimidine-free diet and 6-mercaptopurine in the rat small intestine and colon. **Gastroenterology** 1987; 93(5): 1014-20.
- Liu L., Han L., Wong D. Y., Yue P. Y., Ha W. Y., Hu Y. H., Wang P. X., Wong R. N. Effects of Si-Jun-Zi decoction polysaccharides on cell migration and gene expression in wounded rat intestinal epithelial cells. **Br J Nutr** 2005; 93(1): 21-9.
- Logan C. Y., Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. **Annu Rev Cell Dev Biol** 2004; 20: 781-810.
- Lopez-Navarro A., Gil A., Sanchez-Pozo A. Age-related effect of dietary nucleotides on liver nucleic acid content in rats. **Ann Nutr Metab** 1997; 41(5): 324-30.
- Lopez-Navarro A. T., Gil A., Sanchez-Pozo A. Deprivation of dietary nucleotides results in a transient decrease in acid-soluble nucleotides and RNA concentration in rat liver. **J Nutr** 1995; 125(8): 2090-5.
- Lopez-Navarro A. T., Ortega M. A., Peragon J., Bueno J. D., Gil A., Sanchez-Pozo A. Deprivation of dietary nucleotides decreases protein synthesis in the liver and small intestine in rats. **Gastroenterology** 1996; 110(6): 1760-9.

- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem** 1951; 193(1): 265-75.
- Lu H., Chen C., Klaassen C. Tissue distribution of concentrative and equilibrative nucleoside transporters in male and female rats and mice. **Drug Metab Dispos** 2004; 32(12): 1455-61.
- Lukas J., Lukas C., Bartek J. Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. **DNA Repair (Amst)** 2004; 3(8-9): 997-1007.
- MacLennan A. J., Orringer M. B., Beer D. G. Identification of intestinal-type Barrett's metaplasia by using the intestine-specific protein villin and esophageal brush cytology. **Mol Carcinog** 1999; 24(2): 137-43.
- Madison B. B., Braunstein K., Kuizon E., Portman K., Qiao X. T., Gumucio D. L. Epithelial hedgehog signals pattern the intestinal crypt-villus axis. **Development** 2005; 132(2): 279-89.
- Mahmood A., Shao J. S., Alpers D. H. Rat enterocytes secrete SLPs containing alkaline phosphatase and cubilin in response to corn oil feeding. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 2003; 285(2): G433-41.
- Man A. L., Prieto-Garcia M. E., Nicoletti C. Improving M cell mediated transport across mucosal barriers: do certain bacteria hold the keys? **Immunology** 2004; 113(1): 15-22.
- Marchal J. A., Boulaiz H., Suarez I., Saniger E., Campos J., Carrillo E., Prados J., Gallo M. A., Espinosa A., Aranega A. Growth inhibition, G(1)-arrest, and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells by novel highly lipophilic 5-fluorouracil derivatives. **Invest New Drugs** 2004; 22(4): 379-89.
- Mariadason J. M., Nicholas C., L'Italien K. E., Zhuang M., Smartt H. J., Heerdt B. G., Yang W., Corner G. A., Wilson A. J., Klampfer L., Arango D., Augenlicht L. H. Gene expression profiling of intestinal epithelial cell maturation along the crypt-villus axis. **Gastroenterology** 2005; 128(4): 1081-8.
- Martín P. G., Soto J. M. (1994). Enfermería Anatómo-fisiológica. Barcelona, Masson-Salvat.
- Martinez-Augustin O., Boza J. J., Del Pino J. I., Lucena J., Martinez-Valverde A., Gil A. Dietary nucleotides might influence the humoral immune response against cow's milk proteins in preterm neonates. **Biol Neonate** 1997; 71(4): 215-23.
- Massey-Harroche D. Epithelial cell polarity as reflected in enterocytes. **Microsc Res Tech** 2000; 49(4): 353-62.

- Matsuda A., Sasaki T. Antitumor activity of sugar-modified cytosine nucleosides. **Cancer Sci** 2004; 95(2): 105-11.
- McCauley R., Kong S. E., Hall J. Glutamine and nucleotide metabolism within enterocytes. **JPEN J Parenter Enteral Nutr** 1998; 22(2): 105-11.
- McCormack S. A., Blanner P. M., Zimmerman B. J., Ray R., Poppleton H. M., Patel T. B., Johnson L. R. Polyamine deficiency alters EGF receptor distribution and signaling effectiveness in IEC-6 cells. **Am J Physiol** 1998; 274(1 Pt 1): C192-205.
- McGee D. W., Elson C. O., McGhee J. R. Enhancing effect of cholera toxin on interleukin-6 secretion by IEC-6 intestinal epithelial cells: mode of action and augmenting effect of inflammatory cytokines. **Infect Immun** 1993; 61(11): 4637-44.
- Miura S., Yoshioka M., Hamada Y., Morita A., Asakura H., Tsuchiya M. Alkaline phosphatase of rat intestinal lymph: its characterization and the effect of fat administration. **Clin Chim Acta** 1990; 186(2): 239-48.
- Morel E., Demignot S., Chateau D., Chambaz J., Rousset M., Delers F. Lipid-dependent bidirectional traffic of apolipoprotein B in polarized enterocytes. **Mol Biol Cell** 2004; 15(1): 132-41.
- Moyer J. D., Oliver J. T., Handschumacher R. E. Salvage of circulating pyrimidine nucleosides in the rat. **Cancer Res** 1981; 41(8): 3010-7.
- Nagata T. Radioautography: the proposal of a new concept. **Braz J Med Biol Res** 1998; 31(8): 978-1018.
- Nambu Y., Iannettoni M. D., Orringer M. B., Beer D. G. Unique expression patterns and alterations in the intestinal protein villin in primary and metastatic pulmonary adenocarcinomas. **Mol Carcinog** 1998; 23(4): 234-42.
- Neopikhanov V., Samali A., Wreiber K., Engstrand L., Uribe A. 40- to 100-kD protein(s) of *Helicobacter pylori* stimulate DNA synthesis in epithelial cell lines without affecting apoptosis. **Digestion** 2000; 61(1): 22-9.
- Nielsen O. H., Vainer B., Rask-Madsen J. Review article: the treatment of inflammatory bowel disease with 6-mercaptopurine or azathioprine. **Aliment Pharmacol Ther** 2001; 15(11): 1699-708.
- Ogoshi S., Iwasa M., Kitagawa S., Ohmori Y., Mizobuchi S., Iwasa Y., Tamiya T. Effects of total parenteral nutrition with nucleoside and nucleotide mixture on D-galactosamine-induced liver injury in rats. **JPEN J Parenter Enteral Nutr** 1988; 12(1): 53-7.
- Ogoshi S., Iwasa M., Yonezawa T., Tamiya T. Effect of nucleotide and nucleoside mixture on rats given total parenteral nutrition after 70% hepatectomy. **JPEN J Parenter Enteral Nutr** 1985; 9(3): 339-42.

- Ogoshi S., Mizobuchi S., Iwasa M., Tamiya T. Effect of a nucleoside-nucleotide mixture on protein metabolism in rats after seventy percent hepatectomy. **Nutrition** 1989; 5(3): 173-8.
- Ohta A., Sitkovsky M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. **Nature** 2001; 414(6866): 916-20.
- Ohyanagi H., Nishimatsu S., Kanbara Y., Usami M., Saitoh Y. Effects of nucleosides and a nucleotide on DNA and RNA syntheses by the salvage and de novo pathway in primary monolayer cultures of hepatocytes and hepatoma cells. **JPEN J Parenter Enteral Nutr** 1989; 13(1): 51-8.
- Okazaki Y., Kano S., Ogoshi S., Ichihara K. Effects of OG-VI, a nucleoside-nucleotide mixture, on ischemic myocardial metabolism in dogs. **Coron Artery Dis** 1997; 8(1): 39-43.
- Ortega M. A., Gil A., Sanchez-Pozo A. Maturation status of small intestine epithelium in rats deprived of dietary nucleotides. **Life Sci** 1995a; 56(19): 1623-30.
- Ortega M. A., Nunez M. C., Gil A., Sanchez-Pozo A. Dietary nucleotides accelerate intestinal recovery after food deprivation in old rats. **J Nutr** 1995b; 125(6): 1413-8.
- Ozkan H., Oren H., Erdag N., Cevik N. Breast milk versus infant formulas: effects on intestinal blood flow in neonates. **Indian J Pediatr** 1994; 61(6): 703-9.
- Pacha J., Lisa V., Miksik I. Effect of cellular differentiation on 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in the intestine. **Steroids** 2002; 67(2): 119-26.
- Pageot L. P., Perreault N., Basora N., Francoeur C., Magny P., Beaulieu J. F. Human cell models to study small intestinal functions: recapitulation of the crypt-villus axis. **Microsc Res Tech** 2000; 49(4): 394-406.
- Papazisis K. T., Geromichalos G. D., Dimitriadis K. A., Kortsaris A. H. Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. **J Immunol Methods** 1997; 208(2): 151-8.
- Pinedo H. M., Peters G. F. Fluorouracil: biochemistry and pharmacology. **J Clin Oncol** 1988; 6(10): 1653-64.
- Pinto D., Gregorieff A., Begthel H., Clevers H. Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. **Genes Dev** 2003; 17(14): 1709-13.
- Pinto M., Appay M. D., Simon-Assmann P., Chevalier G., Dracopoli N., Fogh J., Zweibaum A. Enterocytic differentiation of cultured human colon cancer

- cells by replacement of glucose by galactose in the medium. **Biol. Cell** 1982; 44: 193-196.
- Porter E. M., Bevins C. L., Ghosh D., Ganz T. The multifaceted Paneth cell. **Cell Mol Life Sci** 2002; 59(1): 156-70.
- Pringault E., Robine S., Louvard D. Structure of the human villin gene. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1991; 88(23): 10811-5.
- Pritchard D. M., Watson A. J., Potten C. S., Jackman A. L., Hickman J. A. Inhibition by uridine but not thymidine of p53-dependent intestinal apoptosis initiated by 5-fluorouracil: evidence for the involvement of RNA perturbation. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1997; 94(5): 1795-9.
- Puig J. G., Mateos F. A. Clinical and biochemical aspects of uric acid overproduction. **Pharm World Sci** 1994a; 16(2): 40-54.
- Puig J. G., Mateos F. A., Miranda M. E., Torres R. J., de Miguel E., Perez de Ayala C., Gil A. A. Purine metabolism in women with primary gout. **Am J Med** 1994b; 97(4): 332-8.
- Quan R., Barness L. A. Do infants need nucleotide supplemented formula for optimal nutrition? **J Pediatr Gastroenterol Nutr** 1990; 11(4): 429-34.
- Quan R., Uauy R. Nucleotides and gastrointestinal development. **Sem. Pediatr. Gastr. Nutr.** 1991; 2: 3-11.
- Quaroni A., Tian J. Q., Goke M., Podolsky D. K. Glucocorticoids have pleiotropic effects on small intestinal crypt cells. **Am J Physiol** 1999; 277(5 Pt 1): G1027-40.
- Quaroni A., Wands J., Trelstad R. L., Isselbacher K. J. Epithelioid cell cultures from rat small intestine. Characterization by morphologic and immunologic criteria. **J Cell Biol** 1979; 80(2): 248-65.
- Ramachandran A., Madesh M., Balasubramanian K. A. Apoptosis in the intestinal epithelium: its relevance in normal and pathophysiological conditions. **J Gastroenterol Hepatol** 2000; 15(2): 109-20.
- Rempel R. E., Saenz-Robles M. T., Storms R., Morham S., Ishida S., Engel A., Jakoi L., Melhem M. F., Pipas J. M., Smith C., Nevins J. R. Loss of E2F4 activity leads to abnormal development of multiple cellular lineages. **Mol Cell** 2000; 6(2): 293-306.
- Renau J., Megías L. (1998). Manual de técnicas de microscopía electrónica. Aplicaciones biológicas. Granada.
- Ross M. H., Kaye G. I., Pawlina W. (2005). Histología. Texto y atlas color con Biología Celular y Molecular. Buenos Aires, Editorial Panamericana.
- Rousset M., Laburthe M., Pinto M., Chevalier G., Rouyer-Fessard C., Dussaulx E., Trugnan G., Boige N., Brun J. L., Zweibaum A. Enterocytic

- differentiation and glucose utilization in the human colon tumor cell line Caco-2: modulation by forskolin. **J Cell Physiol** 1985; 123(3): 377-85.
- Rudolph F. B. The biochemistry and physiology of nucleotides. **J Nutr** 1994; 124(1 Suppl): 124S-127S.
- Saez-Lara M. J., Manzano M., Angulo A. J., Suarez A., Torres M. I., Gomez-Llorente C., Gil A., Fontana L. Exogenous nucleosides stimulate proliferation of fetal rat hepatocytes. **J Nutr** 2004; 134(6): 1309-13.
- Sancar A., Lindsey-Boltz L. A., Unsal-Kacmaz K., Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. **Annu Rev Biochem** 2004; 73: 39-85.
- Sanchez-Pozo A., Gil A. Nucleotides as semiessential nutritional components. **Br J Nutr** 2002; 87 Suppl 1: S135-7.
- Sancho E., Batlle E., Clevers H. Live and let die in the intestinal epithelium. **Curr Opin Cell Biol** 2003; 15(6): 763-70.
- Sancho E., Batlle E., Clevers H. Signaling pathways in intestinal development and cancer. **Annu Rev Cell Dev Biol** 2004; 20: 695-723.
- Sanderson I. R., He Y. Nucleotide uptake and metabolism by intestinal epithelial cells. **J Nutr** 1994; 124(1 Suppl): 131S-137S.
- Sato N., Kawakami H., Idota A. Nucleotide and nucleoside supplementation may morphologically promote the differentiation of human caco-2 cells. **J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)** 2000; 46(4): 175-9.
- Sato N., Nakano T., Kawakami H., Idota T. In vitro and in vivo effects of exogenous nucleotides on the proliferation and maturation of intestinal epithelial cells. **J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)** 1999; 45(1): 107-18.
- Schonhoff S. E., Giel-Moloney M., Leiter A. B. Minireview: Development and differentiation of gut endocrine cells. **Endocrinology** 2004; 145(6): 2639-44.
- Servin A. L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. **FEMS Microbiol Rev** 2004; 28(4): 405-40.
- Shields H. M., Bates M. L., Yedlin S. T., Best C. J. Distribution of immunoreactive alkaline phosphatase in the adult rat ileum by immunoperoxidase staining at the light microscopic level. **Gastroenterology** 1984; 87(4): 827-35.
- Shiozaki H., Yoshioka M., Miura S., Imaeda H., Morita A., Asakura H., Tsuchiya M., Ishii H. Conjugated bile salts regulate turnover of rat intestinal brush border membrane hydrolases. **Dig Dis Sci** 1995; 40(6): 1193-8.

- Shryock J. C., Belardinelli L. Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: biochemistry, physiology, and pharmacology. **Am J Cardiol** 1997; 79(12A): 2-10.
- Sonoda T., Tatibana M. Metabolic fate of pyrimidines and purines in dietary nucleic acids ingested by mice. **Biochim Biophys Acta** 1978; 521(1): 55-66.
- 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(1): G89-97.
- Soubeyran P., Andre F., Lissitzky J. C., Mallo G. V., Moucadel V., Roccabianca M., Rechreche H., Marvaldi J., Dikic I., Dagorn J. C., Iovanna J. L. Cdx1 promotes differentiation in a rat intestinal epithelial cell line. **Gastroenterology** 1999; 117(6): 1326-38.
- Stappenbeck T. S., Gordon J. I. Rac1 mutations produce aberrant epithelial differentiation in the developing and adult mouse small intestine. **Development** 2000; 127(12): 2629-42.
- Stryer L. (1995). Bioquímica. Barcelona.
- Sturm A., Sudermann T., Schulte K. M., Goebell H., Dignass A. U. Modulation of intestinal epithelial wound healing in vitro and in vivo by lysophosphatidic acid. **Gastroenterology** 1999; 117(2): 368-77.
- Sugawara M., Sato N., Nakano T., Idota T., Nakajima I. Profile of nucleotides and nucleosides of human milk. **J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)** 1995; 41(4): 409-18.
- Suh E., Traber P. G. An intestine-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation. **Mol Cell Biol** 1996; 16(2): 619-25.
- Tabel G., Hoa N. T., Tarnawski A., Chen J., Domek M., Ma T. Y. Helicobacter pylori infection inhibits healing of the wounded duodenal epithelium in vitro. **J Lab Clin Med** 2003; 142(6): 421-30.
- Tartakover Matalon S., Ornoy A., Fishman A., Drucker L., Lishner M. The effect of 6-mercaptopurine on early human placental explants. **Hum Reprod** 2005.
- Thoreux K., Senegas-Balas F., Bernard-Perrone F., Giannarelli S., Denariáz G., Bouley C., Balas D. Modulation of proliferation, second messenger levels, and morphotype expression of the rat intestinal epithelial cell line IEC-6 by fermented milk. **J Dairy Sci** 1996; 79(1): 33-43.
- Torres-Lopez M. I., Fernandez I., Fontana L., Gil A., Rios A. Influence of dietary nucleotides on liver structural recovery and hepatocyte binuclearity in cirrhosis induced by thioacetamide. **Gut** 1996; 38(2): 260-4.

- Torres M. I. (1994). Influencia de los nucleótidos de la dieta en la regeneración hepática tras cirrosis inducida por tioacetamida: estudio a microscopía óptica y electrónica. Departamento de Biología Celular. Granada, Universidad de Granada.
- Torres M. I., Fernandez M. I., Gil A., Rios A. Effect of dietary nucleotides on degree of fibrosis and steatosis induced by oral intake of thioacetamide. **Dig Dis Sci** 1997; 42(6): 1322-8.
- Torres M. I., Fernandez M. I., Gil A., Rios A. Dietary nucleotides have cytoprotective properties in rat liver damaged by thioacetamide. **Life Sci** 1998; 62(1): 13-22.
- Tressler R. L., Ramstack M. B., White N. R., Molitor B. E., Chen N. R., Alarcon P., Masor M. L. Determination of total potentially available nucleosides in human milk from Asian women. **Nutrition** 2003; 19(1): 16-20.
- Tsujinaka T., Iijima S., Kido Y., Homma T., Ebisui C., Kan K., Imamura I., Fukui H., Mori T. Role of nucleosides and nucleotide mixture in intestinal mucosal growth under total parenteral nutrition. **Nutrition** 1993; 9(6): 532-5.
- Tsujinaka T., Kishibuchi M., Iijima S., Yano M., Monden M. Nucleotides and intestine. **JPEN J Parenter Enteral Nutr** 1999; 23(5 Suppl): S74-7.
- Tuhacek L. M., Mackey A. D., Li N., DeMarco V. G., Stevens G., Neu J. Substitutes for glutamine in proliferation of rat intestinal epithelial cells. **Nutrition** 2004; 20(3): 292-7.
- Uauy R., Stringel G., Thomas R., Quan R. Effect of dietary nucleosides on growth and maturation of the developing gut in the rat. **J Pediatr Gastroenterol Nutr** 1990; 10(4): 497-503.
- Upperman J. S., Potoka D. A., Zhang X. R., Wong K., Zamora R., Ford H. R. Mechanism of intestinal-derived fungal sepsis by gliotoxin, a fungal metabolite. **J Pediatr Surg** 2003; 38(6): 966-70.
- Valdes R., Ortega M. A., Casado F. J., Felipe A., Gil A., Sanchez-Pozo A., Pastor-Anglada M. Nutritional regulation of nucleoside transporter expression in rat small intestine. **Gastroenterology** 2000; 119(6): 1623-30.
- Van Buren C. T., Rudolph F. Dietary nucleotides: a conditional requirement. **Nutrition** 1997; 13(5): 470-2.
- van de Wetering M., Sancho E., Verweij C., de Lau W., Oving I., Hurlstone A., van der Horn K., Batlle E., Coudreuse D., Haramis A. P., Tjon-Pon-Fong M., Moerer P., van den Born M., Soete G., Pals S., Eilers M., Medema R., Clevers H. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. **Cell** 2002; 111(2): 241-50.

- van der Wilt C. L., Backus H. H., Smid K., Comijn L., Veerman G., Wouters D., Voorn D. A., Priest D. G., Bunni M. A., Mitchell F., Jackman A. L., Jansen G., Peters G. J. Modulation of both endogenous folates and thymidine enhance the therapeutic efficacy of thymidylate synthase inhibitors. **Cancer Res** 2001; 61(9): 3675-81.
- van der Wilt C. L., Marinelli A., Pinedo H. M., Cloos J., Smid K., van de Velde C. J., Peters G. J. The effect of different routes of administration of 5-fluorouracil on thymidylate synthase inhibition in the rat. **Eur J Cancer** 1995; 31A(5): 754-60.
- van Noort M., Meeldijk J., van der Zee R., Destree O., Clevers H. Wnt signaling controls the phosphorylation status of beta-catenin. **J Biol Chem** 2002; 277(20): 17901-5.
- Vaux D. L. Toward an understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1993; 90(3): 786-9.
- Vazquez Gallego J. M., Jehad Feddah M., Gomez Bosque P., Collantes Perez J. [Effect of 5-fluorouracil on the kinetic proliferation of intestinal epithelium in the rat]. **Rev Esp Enferm Apar Dig** 1984; 65(6): 499-502.
- Ventura M., van Sinderen D., Fitzgerald G. F., Zink R. Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek** 2004; 86(3): 205-23.
- Wada H., Yagami I., Niwa N., Hayakawa T., Tsuge H. Distribution and properties of rat intestinal alkaline phosphatase isoenzymes. **Exp Anim** 2001; 50(2): 153-8.
- Walsh M. J., Sanchez-Pozo A., Leleiko N. S. A regulatory element is characterized by purine-mediated and cell-type-specific gene transcription. **Mol Cell Biol** 1990; 10(8): 4356-64.
- Walters J. R. Recent findings in the cell and molecular biology of the small intestine. **Curr Opin Gastroenterol** 2005; 21(2): 135-40.
- Wang Z., Chen W. W., Li R. L., Wen B., Sun J. B. Effect of gastrin on differentiation of rat intestinal epithelial cells in vitro. **World J Gastroenterol** 2003; 9(8): 1786-90.
- Wolpert S., Wong M. L., Bass B. L. Matrix alters the proliferative response of enterocytes to growth factors. **Am J Surg** 1996; 171(1): 109-12.
- Wong Y. W., Low M. G. Phospholipase resistance of the glycosylphosphatidylinositol membrane anchor on human alkaline phosphatase. **Clin Chem** 1992; 38(12): 2517-25.
- Wood S. R., Zhao Q., Smith L. H., Daniels C. K. Altered morphology in cultured rat intestinal epithelial IEC-6 cells is associated with alkaline phosphatase expression. **Tissue Cell** 2003; 35(1): 47-58.

- Worthy T. E., Grobner W., Kelley W. N. Hereditary orotic aciduria: evidence for a structural gene mutation. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1974; 71(8): 3031-5.
- Wright N. A. Epithelial stem cell repertoire in the gut: clues to the origin of cell lineages, proliferative units and cancer. **Int J Exp Pathol** 2000; 81(2): 117-143.
- Yang Q., Bermingham N. A., Finegold M. J., Zoghbi H. Y. Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. **Science** 2001; 294(5549): 2155-8.
- Zhang H. M., Rao J. N., Guo X., Liu L., Zou T., Turner D. J., Wang J. Y. Akt kinase activation blocks apoptosis in intestinal epithelial cells by inhibiting caspase-3 after polyamine depletion. **J Biol Chem** 2004; 279(21): 22539-47.
- Zweibaum A. [Differentiation of human colon cancer cells: a new approach to colon cancer]. **Bull Acad Natl Med** 1993; 177(1): 63-71; discussion 71-3.
- Zweibaum A., Hauri H. P., 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(5): 591-8.