



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado

Receptores de reconocimiento de la microbiota intestinal en
situaciones fisiopatológicas del epitelio intestinal.

Alteraciones del sistema serotoninérgico.

Autor/es

Lucía HERNÁNDEZ CORRAL

Director/es

José Emilio Mesonero Gutiérrez

Ana Isabel Alcalde Herrero

Facultad de Veterinaria

2014

ÍNDICE

Nº Página

1. Identificación del Trabajo Fin de Grado	1
2. Resumen / Abstract	2
3. Introducción	4
3.1. La enfermedad inflamatoria intestinal	4
3.2. El tracto gastrointestinal: estructura y función	6
3.3. El sistema serotoninérgico intestinal	7
3.4. El sistema intestinal y las patologías inflamatorias crónicas	9
4. Justificación y Objetivos	13
5. Material y Métodos	14
5.1. Modelo experimental: la línea celular Caco-2	14
5.2. Cultivo de la línea celular Caco-2/TC7. Material y medios de cultivo	16
5.3. Cultivo de la línea celular Caco-2/TC7	19
5.4. Estudios de transporte de 5-HT en células Caco2/TC7	22
5.5. Cuantificación de proteínas. Método de Bradford	25
5.6. Análisis estadístico	26
6. Resultados	27
6.1. Estudio del crecimiento de células en cultivo. Línea celular Caco-2/TC7...	27
6.2. Estudio del efecto de diferentes moléculas implicadas en procesos inflamatorios intestinales sobre el transporte de 5-HT en células Caco2/TC7.....	33
7. Conclusiones	36
8. Bibliografía	37

1. IDENTIFICACIÓN DEL TRABAJO FIN DE GRADO

1.1 DATOS PERSONALES DEL ALUMNO

Apellidos: Hernández Corral

Nombre: Lucía

DNI: 16621073-P

Dirección: C/ Jesús nº 9, 26142 Villamediana de Iregua, La Rioja

Teléfono: 610067461

Correo electrónico: luciaherco@hotmail.com

Grado: Ciencia y Tecnología de los alimentos

Centro: Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza.

1.2 DATOS DE LOS TUTORES

Apellidos: Mesonero Gutiérrez

Nombre: José Emilio

Cargo: Profesor Titular de Universidad

Departamento: Farmacología y Fisiología

Centro: Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza.

Apellidos: Alcalde Herrero

Nombre: Ana Isabel

Cargo: Catedrático de Universidad

Departamento: Farmacología y Fisiología

Centro: Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza.

2. RESUMEN

El sistema serotoninérgico intestinal es un modulador fundamental de la fisiología gastrointestinal, incluida su función inmunológica de barrera que desarrolla el epitelio. Dentro de la inmunidad innata, el sistema de reconocimiento de patógenos mediante receptores tipo Toll (TLR) es crucial, y recientes resultados han demostrado la activación de estos TLR inhiben el transportador de serotonina (SERT). Asimismo, en las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) crónicas, como la colitis ulcerosa o la enfermedad de Crohn, donde el sistema inmune innato está implicado, también se encuentra alterado el sistema serotoninérgico, con un incremento de los niveles de serotonina (5-HT), y una disminución de la actividad y la expresión de SERT. Por ello, se planteó como objetivo el estudio del posible efecto, e interacción entre sí, de varios agentes implicados en los procesos inflamatorios sobre la función transportadora de SERT, como elemento clave de la actividad serotoninérgica.

Para la realización de este estudio se utilizó la línea celular Caco-2/TC7, que desarrolla una diferenciación morfológica y funcional de tipo enterocitario, y además expresa SERT constitutivamente, lo que la convierte en excelente modelo “in vitro” para estudios sobre células epiteliales intestinales. Las células fueron tratadas durante 24 h con LPS 30 µg/ml (activador de TLR4), melatonina 0,1 mM, IL-10 25 ng/ml, o bien conjuntamente con LPS+ melatonina o LPS+IL-10. Finalmente, se midió el transporte tras 6 minutos de incubación con 5-HT.

Los resultados muestran que el LPS y la melatonina inhiben el transportador SERT (aunque no significativamente), mientras que la IL-10 no afecta al transporte de 5-HT. Por otro lado, los tratamientos aditivos (LPS+ Melatonina y LPS+IL-10) no muestran ninguna modificación respecto al efecto previamente observado del LPS, sugiriendo que no se produce interacción entre ellas, ni para aumentar ni revertir dicho efecto.

Palabras clave: serotonina, SERT, TLRs, células Caco-2, LPS, melatonina, IL-10

ABSTRACT

Intestinal serotonergic system is an essential modulator of gastrointestinal physiology, including its epithelial immune function barrier. Within the innate immunity, the pathogen recognition system by Toll-like receptors (TLRs) is crucial, and recent results have demonstrated that the activation of these TLR inhibits serotonin transporter (SERT). Furthermore, in chronic inflammatory bowel diseases (IBD) such as ulcerative colitis or Crohn's disease, where the innate immune system is involved, the serotonergic system is also affected, increasing intestinal serotonin (5-HT) levels and decreasing SERT expression and activity. Therefore, the aim of this work was to study the possible effect and interaction between several molecules involved in inflammatory processes on the SERT transporter function, as a key element of the serotonergic activity.

Caco-2/TC7 cell line was used to carry out the study. These cells develop a morphological and functional enterocyte-like differentiation, and also express constitutively SERT, which makes of this cell line an excellent "in vitro" model to study epithelial intestinal cells. Cells were treated for 24 h with LPS 30 µg / ml (TLR4 activator), melatonin 0.1 mM, IL-10 25 ng / ml or LPS + melatonin or LPS + IL-10. Finally, 5-HT transport was measured after a 6 minutes incubation with 5-HT.

The results show that LPS and melatonin inhibit SERT transporter (but not significantly), while IL-10 does not affect the 5-HT transport. Furthermore, treatment additives (LPS + Melatonin and LPS + IL-10) did not modify the inhibition previously observed by LPS treatment, suggesting no interaction between these molecules, neither to increase nor reverse the inhibitory effect.

Keywords: serotonin, SERT, TLRs, Caco-2 cells, LPS, melatonin, IL-10

3. INTRODUCCIÓN

3.1. La enfermedad inflamatoria intestinal

La “enfermedad inflamatoria intestinal” engloba a un grupo de enfermedades crónicas del tubo digestivo, de etiología desconocida, y que fundamentalmente se refiere a la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y colitis indeterminada. Se ha sugerido un origen inmuno-genético, pero con importante aportación en su etiopatogenia de factores ambientales que continúan siendo motivo de controversia. La incidencia en España parece haberse incrementado en los últimos años, variando de unas regiones a otras. Así, la colitis ulcerosa en España oscila entre 0,6 y 8 casos/100.000 habitantes/año, con una media de 3,8. Las cifras correspondientes para la enfermedad de Crohn varían entre 0,4 y 5,5 casos/100.000 habitantes/año, con un valor medio de 1,9. La prevalencia de la enfermedad inflamatoria intestinal en España, aunque es muy difícil de establecer, se estima alrededor de 87-110 casos/100.000 habitantes/año (Soc. Española Reumatología, 2014).

Aunque las patologías intestinales tienen un origen multifactorial y un difícil enfoque terapéutico, hay tres factores cuya participación en la génesis y/o prevalencia de estas enfermedades están siendo ampliamente estudiados: las alteraciones de la inmunidad intestinal innata, la liberación desproporcionada de mediadores inflamatorios y la pérdida de la defensa antiinflamatoria.

Respecto a la inmunidad innata intestinal, la mucosa intestinal está continuamente expuesta a una amplia variedad de antígenos de origen microbiano y alimentario, frente a los que se han desarrollado mecanismos para su reconocimiento y defensa, y así controla la inflamación. Se sabe que estas patologías inflamatorias se caracterizan por la inflamación crónica y desregulada, donde las bacterias pueden ser un estímulo para estas respuestas inflamatorias.

El control de la inflamación es posible gracias a unos receptores específicos que identifican fragmentos de los microorganismos patógenos y no patógenos (PAMPs). Éstos incluyen componentes de la pared bacteriana como el lipopolisacárido (LPS), peptidoglicanos o ácidos teicoicos, así como componentes de hongos, levaduras, virus y protozoos.

Los receptores que reconocen los PAMPs se denominan receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) y dentro de ellos es especialmente importante el papel de los receptores tipo Toll (TLRs). Los TLRs son receptores transmembrana que forman parte

del sistema inmune innato intestinal, para establecer el mecanismo de barrera del epitelio. Los TLRs se ubican en la membrana celular (TLR 1, 2, 4, 5 y 6) o en endosomas intracelulares (TLR 3, 7, 8 y 9), y participan el reconocimiento de antígenos y en la regulación de la homeostasis intestinal (Yamamoto y Takeda, 2010).

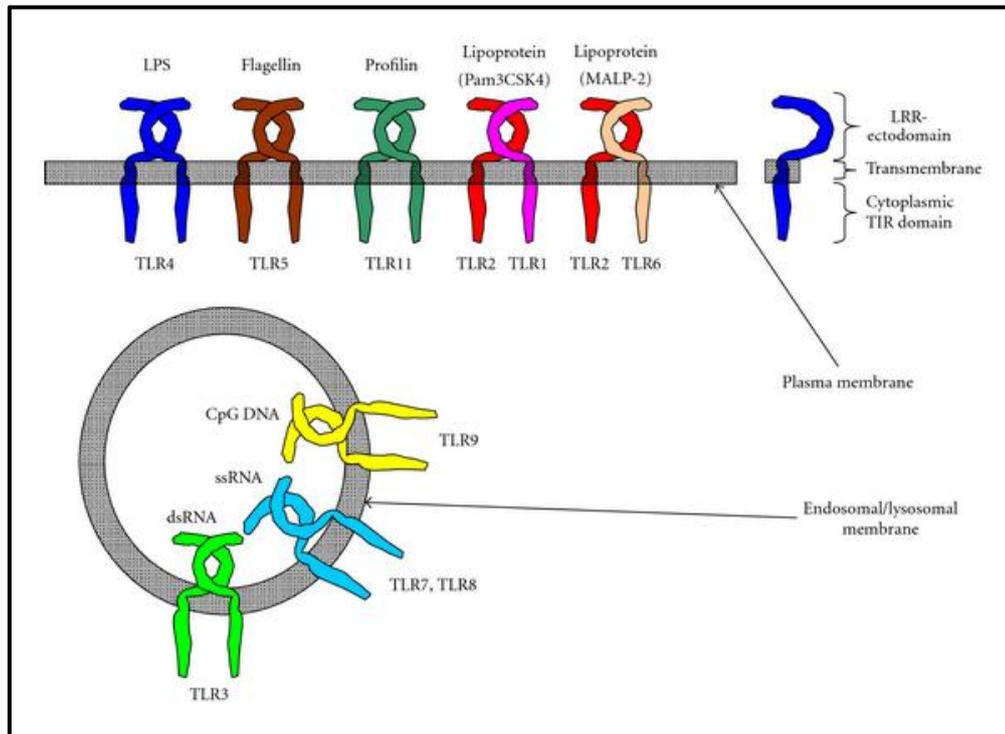


Figura 3.1: Localización de TLRs en la célula, con indicación de los ligandos (PAMPs) que los activan (Yamamoto y Takeda, 2010)

TLR4 fue el primer miembro identificado en mamíferos de la familia de receptores tipo Toll y también el mejor caracterizado. Se encuentra anclado en la membrana plasmática celular y es capaz de reconocer el LPS, que es un componente fundamental de la membrana celular externa de las bacterias Gram negativas. El LPS se une al TLR4 en su porción externa, induciendo al dominio TIR a unirse y activar la proteína adaptadora MyD88, activando entonces toda una cascada intracelular (Hoshino y cols, 1999).

La alteración de la actividad de los TLRs se ha descrito como un factor importante que contribuye al desarrollo de las enfermedades inflamatorias intestinales, ya que su activación conduce a la producción de citosinas y otros factores proinflamatorios (Zhou y cols, 2009). A pesar de que el origen de las enfermedades inflamatorias intestinales es desconocido, se apunta a una inadecuada respuesta de los TLRs frente a microorganismos comensales, provocando una pérdida de la tolerancia y una respuesta inflamatoria innecesaria y desmesurada (De Jager y cols, 2007). Así, por ejemplo, se ha observado que en individuos

sanos, la mucosa intestinal expresa bajos niveles de proteína TLR2 y TLR4. Sin embargo, en las enfermedades inflamatorias intestinales, el nivel de expresión de TLR4 aumenta significativamente en células epiteliales intestinales y monocucleares.

3.2. El tracto gastrointestinal: estructura y función

El tracto gastrointestinal (GI) tiene una estructura tisular compleja que le permite el desarrollo de una gran diversidad de procesos fisiológicos, como la digestión, absorción de nutrientes y secreción de agua y electrolitos, así como funciones motoras para el mezclado y propulsión de los contenidos gastrointestinales y una amplia actividad inmunológica. Histológicamente, existe una estructura común similar para todo el tracto GI, formada por cuatro capas concéntricas, desde el exterior hasta el lumen intestinal:

- La serosa es la capa más externa, formada por células epiteliales del mesotelio con una capa de tejido conectivo elástico.
- Una muscular formada por una capa externa, más gruesa de fibras longitudinales, y una capa interna, más fina, de fibras circulares. La muscular es la responsable de las contracciones y ondas peristálticas que permiten el mezclado y avance del contenido.
- La submucosa, formada por tejido conectivo, donde se localizan diferentes glándulas de secreción, vasos sanguíneos y linfáticos, así como células inmunitarias.
- La mucosa es la capa que se encuentra en contacto con la luz intestinal, y presenta pliegues circulares, vellosidades y microvellosidades para aumentar su superficie de contacto. La mucosa está formada por tres capas concéntricas: la muscular de la mucosa, una lámina propia, y un epitelio, siendo este último el que se encuentra en contacto directo con el lumen. El epitelio es de tipo cilíndrico, con diferentes tipos celulares: enterocitos o células absortivas, células enteroendocrinas, células de Paneth y células caliciformes, además de células madres presentes en la profundidad de las criptas intestinales.

Todas las funciones que desarrolla el tracto GI requieren una fina regulación y para ello existen mecanismos específicos tanto nerviosos como endocrinos. Entre estos sistemas reguladores destaca el sistema serotoninérgico, que contribuye a la respuesta fisiológica del intestino y a su regulación. (Latorre y cols, 2013-A)

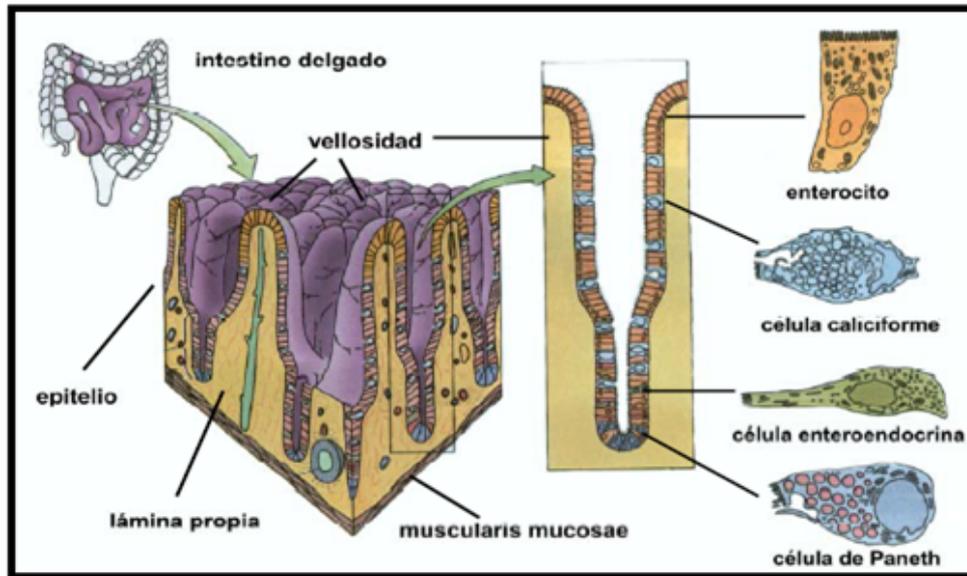


Figura 3.2: Esquema de la mucosa intestinal (Adaptado de Garther y Hiatt, 2002)

3.3. El sistema serotoninérgico intestinal

La serotonina (5-HT; hidroxitriptamina) actúa como molécula transdutora de información desde la luz al intestino, y es liberada en dirección a la lámina propia o hacia la luz intestinal cuando se produce estimulación tanto mecánica como química. Una vez liberada, la 5-HT desarrolla sus efectos tras unirse a alguno de los 14 tipos diferentes de receptores específicos, lo cual desencadenará respuestas intracelulares de distinta índole. Estos receptores se encuentran ampliamente distribuidos en el organismo y especialmente en el tejido intestinal. Para que la unión 5-HT-receptor sea posible debe existir disponibilidad extracelular de 5-HT y ello depende en parte de la actividad del transportador de serotonina (SERT) que recapta e internaliza 5-HT al interior celular. SERT se expresa en los enterocitos, tanto en la membrana apical como en la basolateral, y es molecular y funcionalmente idéntico al que se expresa en el SNC (Mesonero y cols, 2012).

El intestino es el principal órgano de síntesis y almacenaje de 5-HT. Alrededor del 95% de la serotonina del organismo se localiza en el tracto GI, lo que da una idea de la elevada importancia de este sistema regulador intestinal (Camilleri, 2009).

Dentro del tracto GI, en el epitelio, están las células enterocromafines (CE) que son las responsables de la síntesis de 5-HT. Esta amina se encuentra en las células enteroendocrinas de la mucosa y en neuronas del sistema nervioso entérico. Esta localización

dual podría sugerir que la 5-HT puede funcionar como un neurotransmisor (Gershon, 1985), además de un importante mediador intestinal de las interacciones entre los sistemas nervioso e inmune.

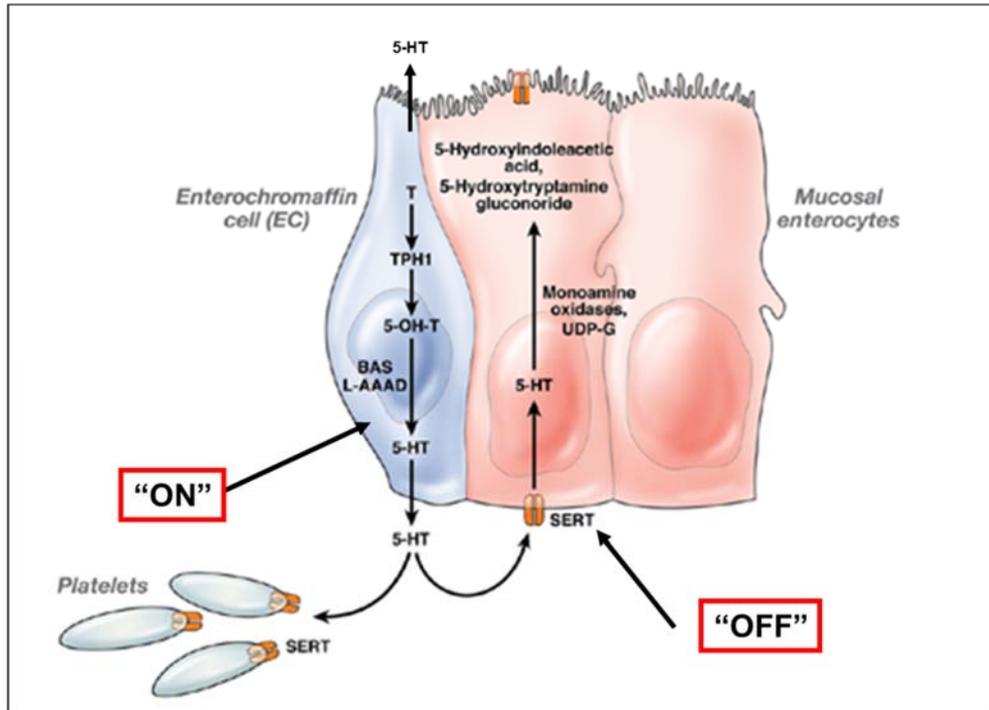


Figura 3.3: Síntesis, liberación y recaptación de serotonina en el epitelio intestinal. El triptófano es convertido en 5-HT en las células entrocromafines por la acción de dos enzimas, la TPH1 y la L-AAAD. La serotonina liberada es recaptada por transportadores localizados en los enterocitos, y el exceso pasa a la sangre donde es capturada y concentrada en las plaquetas que la liberan por estimulación. En los enterocitos, la 5-HT es metabolizada por la MAO y glucoronil transferasas para dar lugar a metabolitos inactivos, que son finalmente excretados por el riñón (Modificada de Margolis y Pothoulakis, 2009)

La mayor o menor actividad intestinal de 5-HT viene dada por su disponibilidad extracelular, la cual depende tanto del grado de síntesis como del control de su recaptación celular (Bertrand y Bertrand, 2010). La recaptación depende de la expresión y actividad funcional del transportador de serotonina (SERT) en la membrana celular.

SERT es una proteína integral de membrana que pertenece a la familia de transportadores dependientes de $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ y se expresa en neuronas, enterocitos y plaquetas. En el tracto intestinal, SERT está expresado en las neuronas serotoninérgicas entéricas y en las membranas apical y basolateral de las células epiteliales. Una de las causas del incremento en la concentración de serotonina, es la alteración en la funcionalidad de SERT, por ello está siendo objeto de estudio en profundidad como diana farmacológica para el control de la serotonina (Mesonero y cols, 2012).

La actividad del tracto GI incluye funciones donde la serotonina ejerce un papel regulador y/o estimulador. De esta manera, se ha observado la implicación de la serotonina en la regulación de la función absortiva, modulando el transporte transepitelial de sustratos como aminoácidos y glúcidos, y en la función motora intestinal (Salvador y cols, 2000). También la 5-HT ha sido descrita como un potente secretagogo, es decir, aumenta la secreción de electrolitos y agua a la luz intestinal (Hansen y Jaffe, 1994).

La serotonina presenta una gran diversidad de efectos que son mediados por su unión a diversos receptores específicos de membrana. Tanto la serotonina como sus receptores están presentes en el sistema nervioso central y en el sistema nervioso periférico, así como en numerosos tejidos no nerviosos del intestino, sistema cardiovascular y en células sanguíneas. Tras la liberación de 5-HT, ésta se une a su extensa red de receptores, hasta el momento, se han identificado hasta 14 tipos diferentes agrupados en 7 familias, ampliamente distribuidos por todo el tracto GI (Gershon, 2013). Estos receptores pertenecen a la gran familia de receptores acoplados a proteínas G, excepto el 5-HT₃, que se comporta como un canal iónico. Además, se caracterizan por participar en un gran número de procesos fisiológicos, y las proteínas G responden a gran variedad de estímulos, incluyendo señales sensoriales, hormonas y neurotransmisores, y son las responsables en muchos casos del control de la actividad enzimática, de los canales iónicos y del transporte vesicular.

3.4. El sistema serotoninérgico intestinal y las patologías inflamatorias crónicas

El sistema serotoninérgico intestinal contribuye a la respuesta fisiológica del intestino y a su regulación, por ello, la disfunción de su actividad ha sido manifiesta en diversos trastornos crónicos del tracto GI, como el síndrome del intestino irritable o las enfermedades inflamatorias crónicas intestinales (Costedio y col, 2007), donde se ha descrito su implicación en los trastornos motores y sensoriales presentes en ellas (Coates y col, 2006; Spiller, 2008).

Éstas enfermedades inflamatorias intestinales se caracterizan por dolor abdominal y alteraciones en el tránsito intestinal o distensión abdominal, con periodos de estreñimiento y diarrea, a los que se asocian niveles elevados de 5-HT durante las fases de diarrea y niveles bajos durante los periodos de constipación (Latorre et al, 2013-A).

Se han realizado estudios en humanos en los cuales se observa un incremento de células enterocromafines y de los niveles postprandiales de 5-HT en pacientes con enfermedades inflamatorias intestinales, sugiriendo que en condiciones inflamatorias la disponibilidad de 5-HT extracelular se encuentra incrementada, y en consecuencia la 5-HT podría contribuir al estado inflamatorio, actuando como una sustancia proinflamatoria (Spiller y Garsed, 2009). Por lo tanto 5-HT sería un potente estimulador de la inflamación que puede jugar un papel clave en la patogénesis de las enfermedades inflamatorias intestinales (Bischoff y cols, 2009). Así, la inhibición o supresión de SERT, tanto en su expresión como en su actividad, potenciaría los efectos proinflamatorios de 5-HT en el intestino (Latorre y cols, 2013-A).

El sistema serotoninérgico está implicado en las alteraciones de la inmunidad innata, la liberación desbordada de mediadores inflamatorios y en ausencia de la defensa antiinflamatoria intestinal, por lo que parece que estaría claramente relacionado con los procesos patológicos crónicos intestinales. En este sentido, la alteración de la actividad de los TLRs se ha descrito como un factor importante que contribuye al desarrollo de las enfermedades inflamatorias intestinales (Zhou y col, 2009), y a la alteración de la actividad serotoninérgica intestinal (Kidd y cols, 2009; Spiller, 2007). En concreto, recientemente se ha demostrado que la activación de TLR4 y TLR3 inhiben la captación de 5-HT mediada por SERT, mediante la activación de las vías intracelulares de la PKC y de la p38 MAPK, respectivamente (Mendoza y cols, 2009; Mendoza y cols, 2012).

Más específicamente se ha observado que la serotonina promueve la activación de linfocitos T y la secreción de citocinas proinflamatorias (Young y Matthews, 1995). Por lo tanto, parece claro que existe una interrelación entre la inmunidad innata intestinal y el sistema serotoninérgico.

En lo que se refiere a los mediadores inflamatorios, se ha descrito en las enfermedades inflamatorias intestinales una liberación desmesurada de dichos mediadores inflamatorios, tales como IFN y TNF α , los cuales pueden reducir la expresión y función de SERT (Foley y col, 2007). Asimismo, otras moléculas como la adenosina y melatonina, sintetizadas en el epitelio intestinal en condiciones fisiológicas, y que sin embargo sufren un aumento en los procesos inflamatorios intestinales, también son capaces de modular SERT. Estudios realizados con elevadas concentraciones de adenosina y melatonina en la línea celular Caco-2 han mostrado la inhibición de la actividad transportadora de SERT por

diferentes mecanismos, siendo este efecto reversible tras la retirada del tratamiento (Matheus y cols, 2009; Matheus y cols, 2010).

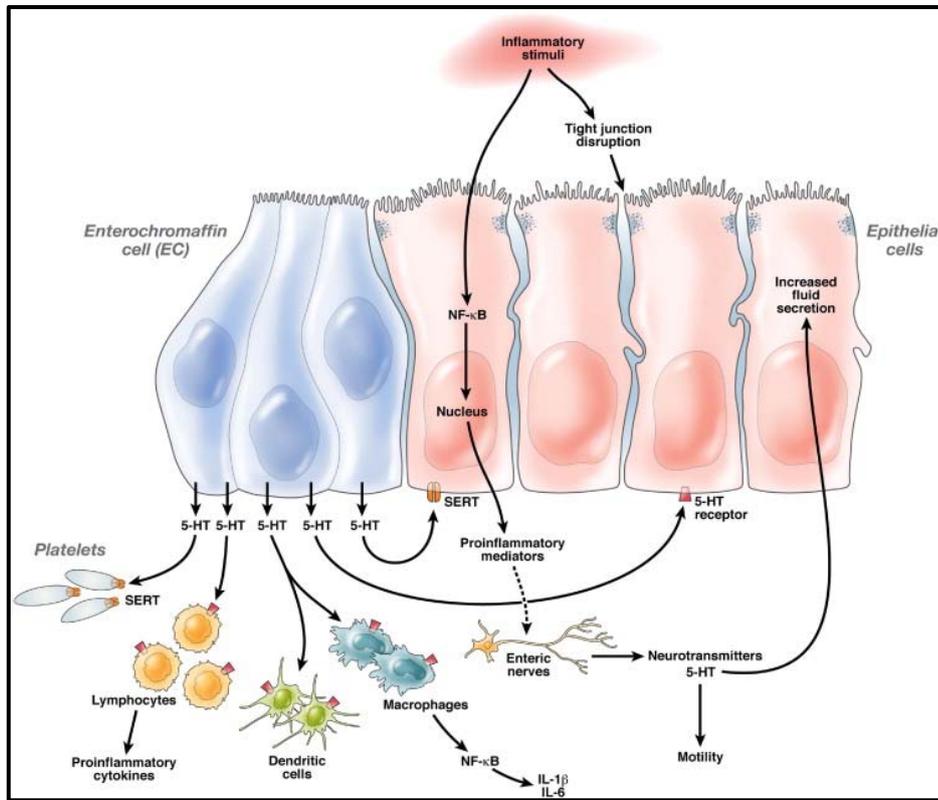


Figura 3.4: La serotonina y los mediadores de la inflamación intestinal. Estímulos en la luz intestinal producen hiperplasia y activación de las células enterocromafines (EC), incrementándose la liberación de 5-HT. El exceso de 5-HT actúa sobre células epiteliales, así como macrófagos, células dendríticas, linfocitos y nervios entéricos uniéndose a receptores específicos. Estas uniones provocan la liberación de citosinas y mediadores proinflamatorios que perpetúan el estado inflamatorio. Al mismo tiempo, estas citocinas y otros neurotransmisores actúan sobre el epitelio intestinal, alterando la permeabilidad e incrementando la secreción de líquidos, y provocando alteraciones en la motilidad intestinal asociadas con las condiciones inflamatorias intestinales. (Margolis y Pothoulakis, 2009)

Por lo tanto, nuevamente estos resultados indican que mediadores proinflamatorios generan también una disminución de la actividad de SERT, y por lo tanto de forma directa, un incremento de los niveles de 5-HT, que potenciarán y amplificarán la señal inflamatoria.

Otro de los factores estudiados es la defensa antiinflamatoria, en condiciones de inflamación crónica las señales antiinflamatorias están disminuidas, lo que se traduce en bajos niveles de determinadas moléculas como la IL-10 (Sánchez-Muñoz y col, 2008), factor con actividad inmunomoduladora e inmunosupresora, que participa en la tolerancia a antígenos propios y de la mucosa, hecho fundamental en el desarrollo de las enfermedades inflamatorias

intestinales (Groux y cols, 1997). La IL-10 es una citocina antiinflamatoria que también contribuye a la homeostasis de la mucosa intestinal. Se ha observado que IL-10 aumenta significativamente la captación de 5-HT en células epiteliales intestinales, debido a la activación de la vía intracelular PI3K que facilita la translocación del transportador SERT a la membrana y por lo tanto una mayor disponibilidad de SERT en la membrana apical para facilitar la recaptación extracelular de 5-HT (Latorre y cols, 2013-B).

Todo lo expuesto anteriormente reafirma la acción proinflamatoria de la serotonina, ya que moléculas proinflamatorias inducen una inhibición de la actividad y expresión de SERT, mientras que por otro lado, moléculas antiinflamatorias inducen un incremento de la actividad de SERT, provocando en este caso una disminución en los niveles extracelulares de 5-HT mediante su recaptación celular, eliminando un factor proinflamatorio, y actuando así contra la inflamación (Latorre y cols, 2013-B).

La serotonina y la melatonina son dos neuromoduladores muy relacionados, sintetizados en las células enterocromafines del epitelio intestinal, e implicadas en la fisiopatología del tracto GI. La melatonina es eficaz en la prevención de proceso patológicos agudos, como la sepsis, y en estados crónicos como en el caso de enfermedades metabólicas y neurodegenerativas, cáncer, inflamación y envejecimiento, y en gran parte los efectos beneficiosos de la melatonina pueden ser explicados por sus propiedades como potente agente estimulador de las funciones inmunes y una potente molécula antioxidante.

En este sentido, recientes resultados sobre el estudio de la oxidación proteica y lipídica en células Caco-2 han mostrado que sustancias proinflamatorias, entre las que se incluye a la melatonina a elevadas dosis, inducen un daño oxidativo que puede ser revertido por la IL-10. El efecto de la IL-10 parece ser debido en gran medida a la recuperación de la actividad de enzimas antioxidantes, que previamente había sido disminuida por las sustancias proinflamatorias. Curiosamente, la melatonina, a pesar de inducir daño oxidativo, parece no alterar la actividad de los enzimas antioxidantes analizados; incluso es capaz de incrementar su actividad cuando es asociada con la IL-10 (Latorre y cols, 2014).

4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La actividad serotoninérgica intestinal es está implicada en la regulación de todas las funciones intestinales, desde la absorción de nutrientes hasta su función inmunológica.

Por otro lado, en las enfermedades inflamatorias intestinales, donde actúa el sistema inmune innato en función de los estímulos que recibe tanto del exterior como del interior del propio órgano, el sistema serotoninérgico también se encuentra alterado. Como consecuencia de esto, y de otros procesos concomitantes, se produce la liberación de una gran cantidad de moléculas proinflamatorias, pero también de agentes anti-inflamatorios, que interactúan entre sí para modular la respuesta inflamatoria.

Dentro del sistema serotoninérgico, el transportador de 5-HT, responsable de la regulación de la disponibilidad extracelular de serotonina, es quizás el elemento más importante, lo que ha hecho que sea una importante diana farmacológica para el tratamiento de patologías crónicas en las que se encuentra implicada la serotonina.

Teniendo en cuenta estas circunstancias previas, el objetivo general de este trabajo se focalizado en estudiar el posible efecto de varios agentes implicados en los procesos inflamatorios sobre la función transportadora de SERT, como elemento clave de la actividad serotoninérgica intestinal.

Para lograr este objetivo se han planteado los siguientes objetivos parciales:

- Conocer las técnicas y metodologías de un laboratorio de investigación en fisiología y biología celular y molecular y practicarlas con autonomía.
- Dominar las bases del cultivo de células y conocer las características específicas de la línea celular Caco-2, como modelo in vitro para el estudio de proteínas enterocitarias.
- Estudiar el efecto de la activación de TLR4, mediante LPS, y de las moléculas IL-10 y melatonina sobre la función de SERT.
- Analizar la posible interacción del LPS con la melatonina o la IL-10 sobre la función de SERT.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Modelo experimental: La línea celular Caco-2

Para realizar nuestro trabajo, hemos utilizado la línea celular enterocitaria humana Caco-2, como modelo experimental “in vitro”.

La línea celular Caco-2 fue establecida en 1974 a partir de un adenocarcinoma de colon humano (Fogh y cols, 1975). Ésta es la única línea celular capaz de desarrollar, de forma espontánea, una diferenciación morfológica y funcional de tipo enterocitario en las condiciones estándar de cultivo (Meunier y cols, 1995; Pinto y cols, 1983; Rousset, 1986). Estas células son indiferenciadas durante toda la fase de crecimiento exponencial, y su diferenciación sólo ocurre tras alcanzar la confluencia celular, durante su fase estacionaria. Las células diferenciadas forman una monocapa de células polarizadas, presentando microvellosidades en su parte apical y separándose del dominio basolateral por fuertes uniones estrechas, estado de diferenciación mantenido en el tiempo. Además, estas células expresan hidrolasas, transportadores de hexosas y otras proteínas enterocitarias (Iceta y col, 2008), todo lo cual aumenta su interés como modelo experimental para estudios del funcionamiento de la célula enterocitaria absorptiva, a pesar de su origen cólico (Zweibaum, 1991).

Para la realización de los experimentos de este trabajo se utilizó el clon TC7, derivado de la línea parental Caco-2 (Chantret y cols, 1994), debido a su elevado grado de diferenciación, morfológica y funcional, de tipo enterocitario (Grés y cols, 1998), y también porque previamente en el laboratorio se había puesto en evidencia y caracterizado la expresión del transportador SERT en éstas células (Iceta y cols, 2006). Este clon exhibe las características de células epiteliales de íleon, una gran actividad enzimática en relación con la glucuronidación de 1-naphthol y una mayor expresión de la hidrolasa sacarasa-isomaltasa en el borde del cepillo (Chantret y cols, 1994). Estas características diferenciadas hacen del clon TC-7 una herramienta ideal para el desarrollo de estudios in vitro a nivel intestinal, no solo para estudios de transporte a través de la barrera intestinal, sino también para evaluar el papel del intestino en la biotransformación de los fármacos. (Caro y cols, 1995). Estas células fueron cedidas gratuitamente por la Dra. Edith Brot-Laroche (Unité Mixte de Recherche, UMR S872, INSERM, Centre de Recherche des Cordeliers, París, Francia).

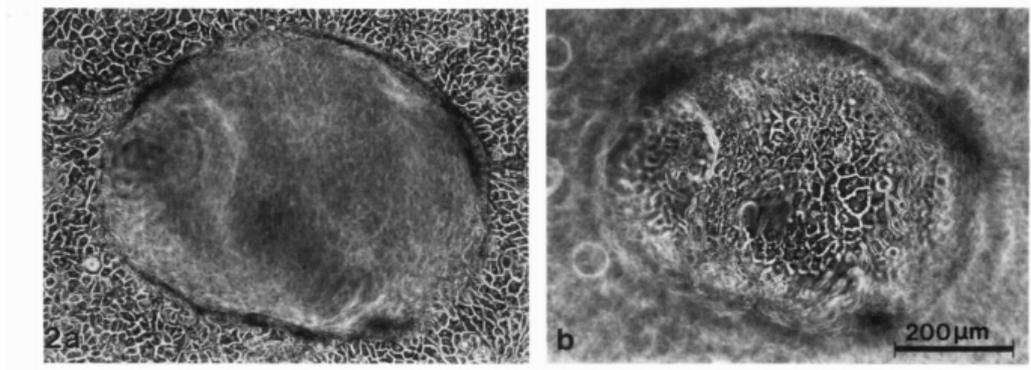


Figura 5.1: Micrografía de contraste de fase de una cúpula formada en la monocapa de células Caco-2 confluentes (día 14) (imagen izqda.). Centrado en la monocapa; (imagen dcha.) Centrado en la parte superior de la cúpula

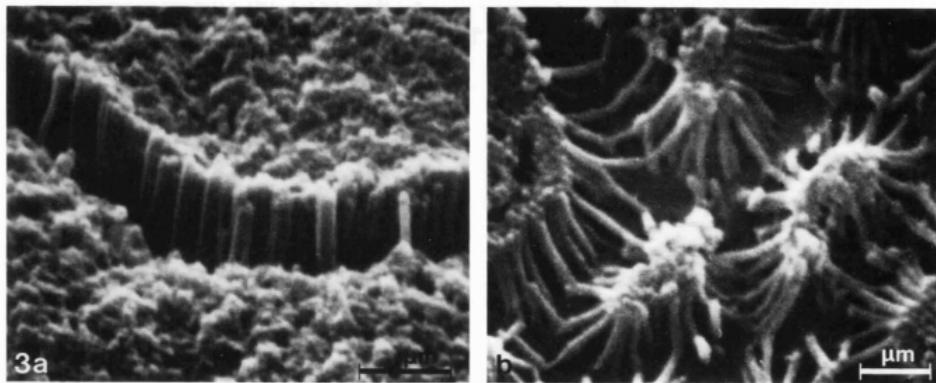


Figura 5.2: Micrografía electrónica de barrido de una monocapa de células Caco-2 después de 14 días en cultivo que muestra los dos patrones diferentes de organización del borde en cepillo: (imagen izqda.) Patrón alfombra gruesa (x17000), (imagen dcha.) flor-como patrón (x13500)

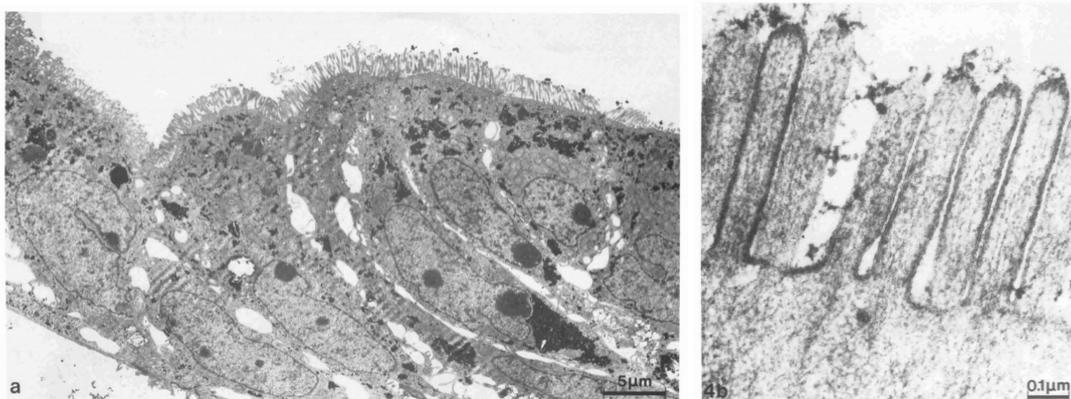


Figura 5.3: Micrografía electrónica de transmisión de una monocapa de células Caco-2 después de 14 días en cultivo. Sección transversal que muestra las microvellosidades del borde en cepillo en la superficie apical de las células en contacto con el medio: se nota la asimetría de las células y la presencia de glucógeno (imagen izda.) (x3400). Micrografía electrónica de transmisión de una monocapa de células Caco-2 después de 14 días en cultivo. Sección transversal de las microvellosidades del borde del cepillo: en cuenta las dos capas de la membrana plasmática y el núcleo de microfilamentos que se extienden en el citoplasma (imagen dcha.) (x110000).

5.2. Cultivo de la línea celular Caco-2/TC7. Material y medios de cultivo.

Para realizar estudios con cultivos celulares hay que disponer de los equipos y el material de cultivo necesario correctamente preparados para su utilización.

Se ha utilizado una cabina de flujo laminar recirculante vertical de clase II (Telstar AV-100). Este tipo de cabinas ofrecen protección al operario y la esterilidad necesaria para la manipulación de los cultivos celulares. Antes de comenzar el trabajo, se esterilizaba la cabina con luz ultravioleta durante 30 minutos y posteriormente se limpiaba la superficie con etanol al 70%. También se activaba el flujo de aire para que fuera estable al comienzo de la manipulación y así asegurar las condiciones de esterilidad.



Figura 5.4: Imagen de la cabina de flujo laminar recirculante (imagen izqda), utilizada para la manipulación celular; del microscopio de luz invertida (imagen centro) utilizado para el examen visual y recuento de las células; y de la estufa de incubación (imagen dcha).

Asimismo, se dispuso de un microscopio de luz invertida (Olympus CK2) para visualizar y examinar, en contraste de fases, el tapiz celular de las cajas de cultivo, y para realizar el recuento de las células en suspensión antes de una nueva siembra. Se utilizó también una estufa de CO₂ (Haeraeus BB 16) para mantener las células en cultivo a 37°C y una atmósfera humidificada con un 95% de aire y un 5% de CO₂.

Además, se utilizó una centrífuga (Centrifuge 5810R, Eppendorf) con el rotor para tubos cónicos, con la función de centrifugar la muestra celular una vez tratada con tripsina y poder recoger el precipitado de células. Las condiciones para este caso en concreto fueron 900 g (3000 rpm) / 5 minutos. Para atemperar los medios, previamente al comienzo del experimento, se utilizaba un baño termostático de agua (Digiterm 100 Selecta), que

incrementaba la temperatura hasta 37°C, una vez sacados de la nevera donde se conservan, para evitar el choque térmico sobre las células.



Figura 5.5: Centrífuga (imagen izqda) para separar la muestra del medio y baño de agua (imagen dcha) utilizado para atemperar los medios.

La conservación de cada uno de los medios necesarios para el desarrollo del experimento, se realizó en una nevera doméstica (Corberó) entre 0-4°C.

Se utilizaron a lo largo de todo el experimento pipetas, una electrónica (Powerpipette plus) y otras micropipetas manuales de 100 y 200 μ l (Finnpipette).

Por último, se utilizó la cámara de Neubauer, para realizar el recuento de células en el medio, este utensilio tiene dos espacios diferentes para la colocación de muestra, con una cuadrícula cada uno, una vez hecho el recuento de cuadrante central, y conociendo el volumen añadido, se realizan las operaciones oportunas para calcular los volúmenes necesarios de suspensión celular para realizar la siembra de células en nuevas cajas.

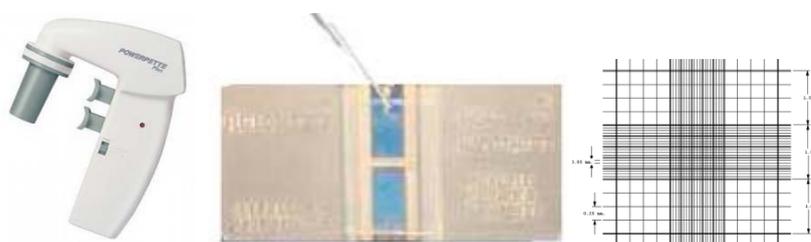


Figura 5.6: Pipeta electrónica (imagen izqda) utilizada para el traspaso de medio durante el cultivo celular y Cámara Neubauer (imágenes centro y dcha) utilizada para el conteo de células

El medio de cultivo utilizado fue el Medio Esencial Mínimo Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM) que contenía 25 mM de glucosa, suplementado con un 20% de suero fetal bovino (SFB), previamente descomplementado durante 30 minutos a 56°C. Además, el medio de cultivo fue completado con: 1% de Penicilina (10000 UI/ml) - Estreptomicina (10

mg/ml); 1% de aminoácidos no esenciales 10 mM; y 2% de L-glutamina 200 mM. El medio de cultivo así preparado se conserva en frigorífico a 4°C. Previamente a su uso es precalentado a 37°C en un baño termostático, para evitar un choque térmico sobre las células.

Medios líquidos: Las soluciones stock para la preparación de los medios de cultivo y otras soluciones y suplementos fueron suministrados por LifeTechnologies.

Producto	Denominación técnica	Descripción
Medio de cultivo 	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Medio de cultivo ampliamente utilizado para el crecimiento de células de mamíferos.
L- Glutamina 	L-Glutamine(200 mM)	Aminoácido que actúa como suplemento para el crecimiento celular.
Aminoácidos no esenciales 	MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100X)	Solución aminoacídica como suplemento para el incremento del crecimiento y la viabilidad celular
Antibiótico 	Penicillin-Streptomycin (10.000 U/mL)	Antibióticos utilizados para prevenir la contaminación bacteriana.
Suero Fetal Bobino 	Fetal Bovine Serum, qualified, E.U.-approved, south America origin	El suero fetal bovino (SFB) es fundamental para aportar factores de crecimiento y de diferenciación a las células.
D-PBS 	D-PBS, no calcium, no magnesium	Solución salina que se utiliza para hacer un lavado celular previo a la disociación
Azul de tripan 	Trypan Blue Solution, 0.4%	Colorante utilizado para teñir las células no viables con alteraciones en la membrana
Tripsina 	Trypsin (2.5%), no phenol red	Se utiliza para la disociación celular

Tabla 5.1: Medios líquidos utilizados en el experimento y su descripción.

Medios plásticos: todo el material plástico utilizado, fue material estéril de un único uso, suministrado por Sarstedt.

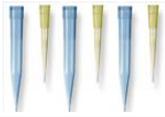
<i>Denominación</i>	<i>Imagen</i>	<i>Descripción y uso</i>
Caja de 25 cm ²		Soporte para el cultivo celular, con superficie para identificación de muestras y faldón antivuelco para evitar la contaminación e incrementar la seguridad del cultivo
Placas de cultivo de 24 pocillos		Soporte para cultivo celular, con superficie de 2 cm ² , En ellas se cultivan las células para experimentos de transporte y acumulación
Tubos de 15 y 50 ml		Se utilizan para hacer las preparaciones de las muestras celulares en la siembra, preparar diluciones, etc.
Pipetas estériles de diferentes volúmenes		Estas pipetas se utilizan para la manipulación de líquidos en el cultivo celular de forma estéril, con la ayuda de una pipeta electrónica
Puntas de pipeta estériles		Se utilizan para pipetear pequeños volúmenes de manera precisa y estéril, ayudados de micropipetas de calibre variable.
Tubos eppendorf		Para la toma de muestras y guardar alícuotas.

Tabla 5.2: Materiales plásticos utilizados en los experimentos de cultivo celular y su descripción.

5.3. Cultivo de la línea celular Caco-2/TC7.

Las células fueron cultivadas en cajas de plástico de 25 cm² de superficie y placas de 24 pocillos de 2 cm² de superficie cada pocillo. Éstas últimas fueron utilizadas para los experimentos de medida de transporte y las primeras para el mantenimiento de la línea.

El volumen de medio de cultivo adicionado al cultivo celular fue de 0,2 ml/cm² de superficie, correspondiendo por lo tanto a 5 ml para las cajas de 25 cm². En las placas de 24 pocillos se añadió un volumen de 1 ml para contrarrestar el efecto de la tensión superficial de las paredes próximas al pocillo. El cultivo se mantenía en estufa de CO₂ a una temperatura de 37°C, en una atmósfera humidificada de 95% de aire y 5% de CO₂, siendo mantenidos y controlados todos estos parámetros por el propio incubador.

Para iniciar el cultivo de las células, se parte de un vial congelado y conservado en nitrógeno líquido, que contiene $1-3 \times 10^6$ células, en un volumen de 1,5 ml de medio de cultivo con un 30% de SFB y un 10% de glicerol. Las células se descongelan lentamente introduciendo el vial en agua caliente a 37°C. Una vez que el vial está descongelado, las células son diluidas en 5 ml de medio de cultivo y centrifugadas a 3000 rpm / 5 minutos. Una vez eliminado el sobrenadante las células son resuspendidas en 5 ml de medio de cultivo y depositadas en una caja de 25 cm².

Para que las células viables hayan tenido tiempo suficiente para adherirse a la superficie de plástico de nuestra caja de cultivo, el medio se cambia 72 horas después de la siembra, y posteriormente una vez cada dos días debido al alto consumo de glucosa de estas células. Tras una descongelación, las células son previamente pasajeadas dos veces antes de ser utilizadas para la realización de experimentos.

Es muy importante estandarizar las condiciones de diferenciación celular a las cuales se trabaja con las células en expresión funcional. En nuestro caso, los experimentos han sido realizados con células en el estadio de diferenciación correspondiente al noveno día post-confluencia (día 14 desde la siembra) y entre los pasajes 19 y 35.

Mantenimiento de la línea celular Caco2

Para el mantenimiento de la línea celular Caco-2 se utilizaron cajas de 25 cm², que eran tripsinizadas semanalmente. Una vez que hayan llegado al 80-90% de confluencia, las células adherentes se separan de la superficie de la caja de cultivo y se individualizan, utilizando una solución de tripsina-EDTA (0.25% tripsina-1mM EDTA) en solución PBS. Así, la tripsina actúa produciendo la digestión de las proteínas de adherencia y el EDTA se encarga de secuestrar los cationes divalentes libres inhibiendo la actividad de proteínas de adhesión calcio-dependientes.

Tripsinización y siembra de las células

Antes de comenzar el proceso, se atempera a 37°C el medio de cultivo, el PBS y la tripsina. Se enciende el flujo máximo de la cabina 30 minutos antes de iniciar las manipulaciones.

El protocolo seguido para la realización de este proceso en una caja de 25 cm² es el siguiente:

- Retirar el medio de cultivo mediante aspiración y lavar las células dos veces con 5 ml de PBS en cada caso.
- Retirar los 5 ml de PBS y añadir 1 ml de una solución de tripsina/EDTA e introducir la caja en la estufa a 37°C, durante 5 minutos, y el tapón cerrado.
- Para levantar las células del soporte plástico, se dan unos pequeños golpes en los laterales de la caja, y se añaden 5 ml de medio de cultivo para inactivar la tripsina y se realiza la homogeneización mecánica para conseguir una individualización celular, y facilitar recuento y posterior siembra.
- Las células en suspensión son recuperadas en un tubo cónico estéril de 15 ml y centrifugadas a 3.000 rpm durante 5 minutos, a temperatura ambiente.
- Se elimina el sobrenadante y se ponen de nuevo las células en suspensión añadiendo 5 ml de medio de cultivo estándar.
- Se toman 50 µl de la suspensión celular y se añaden 100µl de azul de tripán en un tubo ependorff (dilución 1/3). Con la dilución se rellena la cámara de Neubauer.
- La cámara de Neubauer se coloca en el microscopio de luz invertida y se cuentan todas las células contenidas en una superficie de 1 mm², correspondiente a las cuadrículas de los extremos de la cámara.
- Se hace una media entre las células contadas en las cuatro cuadrículas y se multiplica por 10.000 (para extrapolar las células contadas en el volumen de 0,1 mm³ hasta el volumen total de 1 ml, es decir, 1 cm³) y por 3 (factor dilución). De esta manera se obtiene el número de células por mililitro y después se calcula el volumen de muestra que hay que tomar para sembrar cada caja de 25 cm² (en total dos) con 200.000 células, adicionando el volumen necesario de medio de cultivo hasta completar los 5 ml necesarios por caja de cultivo.
- Se añaden los 5 mililitros finales de la muestra a cada caja de 25 cm² y se observa al microscopio que se ha realizado la siembra correctamente y que hay células en flotación.
- Tras ello, se introducen las cajas a la estufa donde permanecerán a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de aire
- El proceso se repite cada 6-7 días habiendo cambiado el medio a los 3 días

La toma de imágenes de los cultivos celulares se realizó en la unidad de Toxicología de la Facultad de Veterinaria, con un microscopio electrónico ZeissAxiovert 200M acoplado a una cámara AxioCam HRC, de la casa comercial Zeiss. El programa de tratamiento de imágenes fue AxioVision 4.1 de Zeiss.

5.4. Estudios de transporte de 5-HT en células Caco-2/TC7.

El objetivo de estos estudios es determinar el transporte de serotonina mediado por SERT, y sus alteraciones por los tratamientos realizados sobre las células.

Se cultivaron las células en placas de 24 pocillos, cuya siembra se realizaba el mismo día que se tripsinizaba las cajas de mantenimiento. El volumen final de medio es de 1 ml por cada pocillo y fue cambiando el medio a las 72 horas. Antes de comenzar el experimento de transporte, se incubaban las células durante 24 horas en medio de cultivo DMEM sin SFB (para evitar interferencias con las sustancias en estudio), tiempo durante el cual se aplicaba el tratamiento correspondiente.

En estos estudios se utilizaron 3 tampones diferentes (I, II y III). El tampón I se preparaba según la tabla contigua para un volumen final de 1 litro, a partir de una serie de soluciones madre preparadas previamente.

	Concentración Solución madre	Volumen solución madre (ml)	Concentración final (mM)
NaCl	1M	137	137
KCl	1M	4,7	4,7
KH ₂ PO ₄	0,5M	2,4	1,2
MgSO ₄	0,2M	6	1,2
CaCl ₂	100mM	25	2,5
Hepes-Tris. pH 7,2	100mM	100	10
H ₂ O destilada	-	Hasta completar (1000 ml)	

Tabla 5.3: Composición de tampón I

Los tampones II y III se separan a partir del tampón I. El volumen a preparar depende del requerido por el experimento, necesitando 0,5 ml/pocillo del tampón II y 2 ml/pocillo del tampón III.

Al volumen requerido del tampón I para la preparación del resto de tampones, se le agrega: glutamina 4 mM (2,6 ml para dos placas), BSA 0,1 mg/ml, (0,013 g para dos placas) y ácido ascórbico 1 mM (1,3 ml para dos placas). En este punto, se preparan los volúmenes necesarios para el tampón II y III. Al tampón III se le agrega 5-HT a una concentración final de 20 μ M, en cambio al tampón II se le agrega 5-HT pero a una concentración menor, 0,2 μ M. Para finalizar se le agrega al tampón II la radiactividad, 1,5 μ Ci/ml. El tampón II se mantiene a 37°C y el tampón III se enfría a 4°C.

Es este trabajo se han planteado 6 condiciones experimentales diferentes, que han sido las siguientes y que se muestran gráficamente en la siguiente figura:

- Control: células sin tratamiento, per mantenidas 24 en medio sin SFB.
- Melatonina, 0,1 mM
- IL-10, 25 ng/ml
- LPS, LPS 30 μ g/ml
- LPS 30 μ g/ml + Melatonina 0,1 mM
- LPS 30 μ g/ml + IL-10, 25 ng/ml

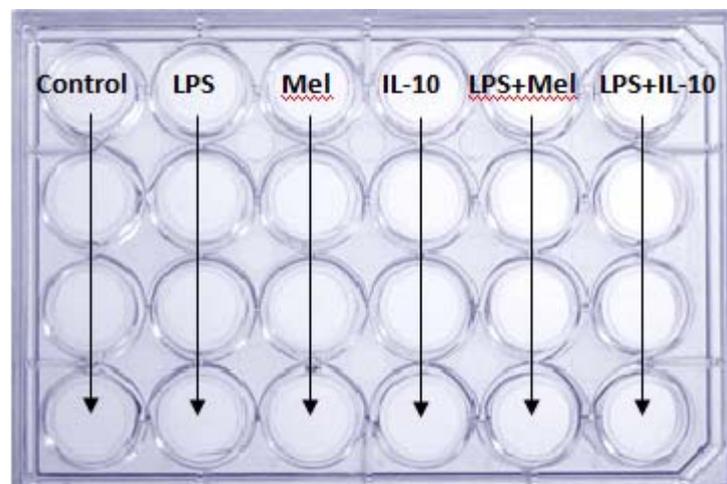


Figura 5.7: Representación gráfica del experimento con la ordenación de la placa de 24 pocillos y las condiciones

El tampón II contenía igualmente la sustancia de tratamiento correspondiente. De cada una de las condiciones del tampón II se toman muestras de 5 μ l por triplicado (en total 18), que serán nuestros estándares que contienen el sustrato de transporte radioactivo.

Tras 24 horas de incubación en ausencia de SFB, las células se incuban con el tampón I, que además contiene el tratamiento correspondiente a cada pocillo, durante 30 minutos, tiempo tras el cual las células son lavadas de nuevo con tampón I.

A continuación se añaden 0,5 ml de tampón II, a 37°C, en el que son mantenidas las células durante 6 minutos, el tiempo de medida de transporte. Transcurrido este tiempo, las células son lavadas dos veces con 1 ml/pocillo de tampón III, que es la solución stop fría.

Tras el último lavado, el tapiz celular es incubado con 0,5 ml/pocillo de NaOH 0,1 N durante 24 horas a 4°C, para romper la membrana celular. Posteriormente, se homogeneiza el tapiz celular con la solución de NaOH, y se toman muestras de 200 µl para la medida de la radiactividad incorporada a las células durante el tiempo de transporte, así como para calcular la concentración proteica mediante el método de Bradford.

Para medir los valores de radiactividad de partida, se cogen los estándares anteriormente citados, y también 200 µl del homogenado celular obtenido con el NaOH respectivamente. Sobre estas muestras radiactivas, se añadió 1,5 ml de líquido de centelleo (GE Healthcare), y posteriormente se procedió a la lectura de los cpm de [³H] en un contador beta (Beckman).

El cálculo de sustrato acumulado durante los 6 minutos de incubación con el medio de transporte en las placas de 24 pocillos, se realizó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{pmol 5-HT/mg proteína} = \frac{\text{cpmC} \times V_m \times [5\text{-HT}]}{\text{cpmM} \times \text{mg proteína}}$$

Donde:

- cpmC: cpm de los 200 µl del homogenado celular.
- V_m: volumen del medio de incubación radioactivo (5 µl).
- [5-HT]: concentración del sustrato en µM (0,2 µM).
- cpmM: cpm de los 5 µl del medio de incubación.
- mg proteína: mg de proteína de los 200 µl de nuestro homogenado celular.

5.5. Cuantificación de proteína. Método de Bradford.

La determinación de la concentración proteica se realizó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Este método, es colorimétrico de valoración cuantitativa de proteínas. A las muestras se les añade un reactivo, que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad del color de la disolución resultante proporcional a su concentración, según la ley de Lambert-Beer.

Este ensayo está basado en el cambio de color que se produce cuando, el azul brillante de Coomassie G250 en solución ácida se une a las proteínas. La forma protonada del colorante Azul Coomassie tiene un color marrón rojizo. El colorante se une fuertemente a las proteínas, interactúa con los grupos hidrofóbicos y los cargados positivamente, de manera que, en aquellas zonas de las proteínas donde se encuentran los residuos cargados positivamente, el colorante Azul Coomassie se desprotoniza, produciendo un color azul intenso.

La intensidad de color genera absorbancia a una longitud de onda de 595 nm, que puede ser medida con la ayuda de un espectrofotómetro. La medida de absorbancia obtenida será proporcional a la concentración de proteínas en la muestra (ley de Lambert-Beer). La relación existente entre absorbancia y la concentración de proteínas se establece experimentalmente mediante el análisis de distintas concentraciones conocidas y crecientes de una proteína de referencia (recta patrón), en nuestro caso la albúmina sérica bovina (BSA, 1mg/ml), a las que se les aplica, de forma paralela a las muestras problema, el mismo método analítico. Tras la adición del colorante, se mantienen los tubos en reposo durante 5 minutos, a continuación se lee la absorbancia de las mismas en un espectrofotómetro a 595 nm de longitud de onda.

Técnica del método Bradford

En primer lugar, se preparan 5 tubos (por duplicado) para realizar una recta patrón, con cantidades de proteínas conocidas de albúmina sérica bovina (BSA) y obtener la correspondiente ecuación, con los siguientes volúmenes:

BSA 1 mg/ml (μ l)	0	2	5	10	15
NaOH 0,1 N (μ l)	15	13	10	5	0

Para medir la proteína de nuestra suspensión celular, se extraen 20 μ l de cada pocillo. Se adiciona 1 ml del reactivo de Bradford (Bio-Rad) y se mezcla inmediatamente con un agitador de tubos. Se dejan reaccionar 5 minutos a temperatura ambiente, y se realiza la lectura. Mediante la regresión lineal de la ecuación de la recta, obtenida a partir de la recta patrón, y sobre las absorbancias de las muestras se obtiene la cantidad de proteína presente en el homogenado celular.

5.6. Análisis estadístico.

Los resultados de la medida de transporte se procesaron según las correspondientes ecuaciones especificadas en su apartado. El análisis estadístico entre los resultados obtenidos en las diferentes condiciones ensayadas fue realizado mediante ANOVA de una vía, seguido del post-test de Bonferroni, considerando un 95 % de grado de significación ($p < 0,05$). Los resultados han sido expresados como porcentaje respecto del valor control, y se muestran como la media \pm el error estándar medio de los resultados obtenidos.

Todos los análisis se han realizado mediante el programa informático GraphPadPrism versión 4.

6. RESULTADOS

6.1 Estudio del crecimiento de células en cultivo. Línea celular Caco-2/TC7.

La noción de diferenciación, aplicada a células cancerosas cólicas humanas, parte de observaciones realizadas en diferentes laboratorios sobre líneas celulares en cultivo. Podemos definir la diferenciación de las células como la capacidad de organizarse según las mismas características morfológicas ultraestructurales que las células epiteliales absortivas, y expresando proteínas asociadas su la diferenciación funcional (Chantret y cols, 1994). Se trata pues de una noción de diferenciación celular, que debe distinguirse de las anatomopatológicas, donde la diferenciación concierne esencialmente a la organización tisular de las células.

La diferenciación de las células Caco-2 es de tipo enterocitario, y se trata de un sistema extremadamente complejo. Esta diferenciación solo se produce después de la confluencia, momento en el cual las células expresan sus características de diferenciación específicas.

Las células Caco-2 son el ejemplo más llamativo que existe de diferenciación celular. Su diferenciación de tipo enterocitario se caracteriza por la organización de las células en una monocapa celular, con la presencia de uniones estrechas en la parte apical de los espacios intercelulares, y un borde en cepillo con un citoesqueleto compuesto de filamentos de actina asociados a proteínas específicas como la vilina. Este borde en cepillo de las células expresan hidrolasas intestinales y transportadores de glucosa y aminoácidos.

Para realizar nuestro trabajo hemos utilizado la línea celular Caco-2/TC7, que realmente es un clon procedente de la línea parental Caco-2 obtenido con el sistema de “dilución límite”, donde una sola célula es sembrada en un pocillo y a partir de ella se obtiene una población celular mucho más homogénea (Chantret y cols, 1994).

La siembra de las células se inició a partir de un vial congelado en nitrógeno líquido (-196°C), de fecha octubre de 2010, siguiendo el protocolo indicado en el apartado de material y métodos. Las células sembradas en una caja de 25 cm² fueron introducidas en la estufa de cultivo con el tapón semi-abierto para permitir la entrada de oxígeno.

La viabilidad de las células fue realizada por observación al microscopio en contraste de fase. La primera observación se realizó a las 24 h después de la siembra. Como se puede observar en la figura 6.1, muchas células muestran todavía una morfología redondeada y con un halo refringente, indicativo que todavía no se han adherido al plástico de cultivo. Sin embargo, también se observan células completamente adheridas y otras que se encuentran en proceso de adhesión.

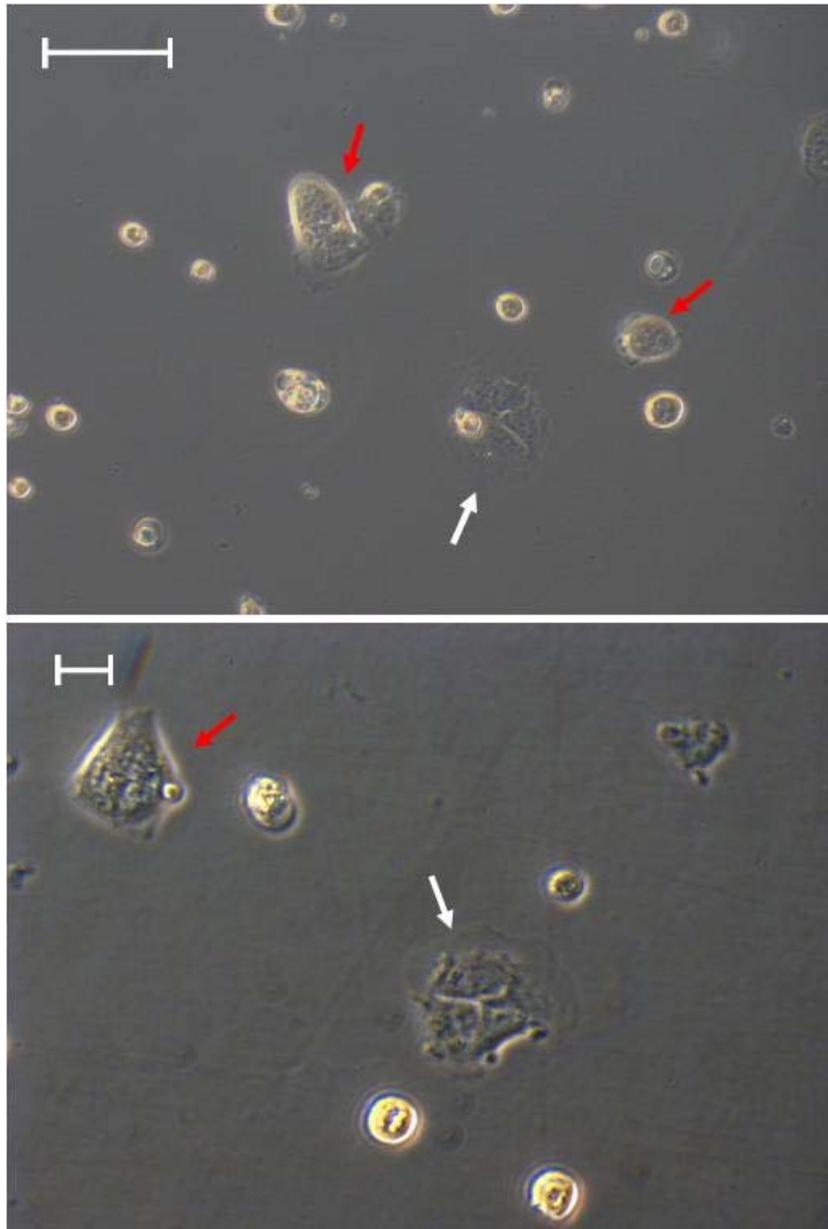


Figura 6.1: Crecimiento de células Caco-2/TC7. Día 1 de cultivo. Nótese la diferente morfología en función de su adhesión al plástico de cultivo: en proceso de adhesión (flecha roja) y completamente adherida (flecha blanca). Micrografía con microscopio de contraste de fase, 20x (superior) y 40 x (inferior). Barra: 100 μm (superior) y 20 μm (inferior).

Después de 48 horas de cultivo, las células fueron observadas de nuevo, apreciándose numerosas células adheridas que han iniciado la división celular, y donde ya se pueden observar grupos de 8-10 células como resultado de estas primeras divisiones (Figura 6.2). Todavía se puede observar algunas células redondeadas y refringentes, las cuales son células no viables y que retiraremos del cultivo en el momento del cambio del medio de cultivo. Estas observaciones son indicativas que la mayoría de las células descongeladas han sido viables y nuestro cultivo es correcto.

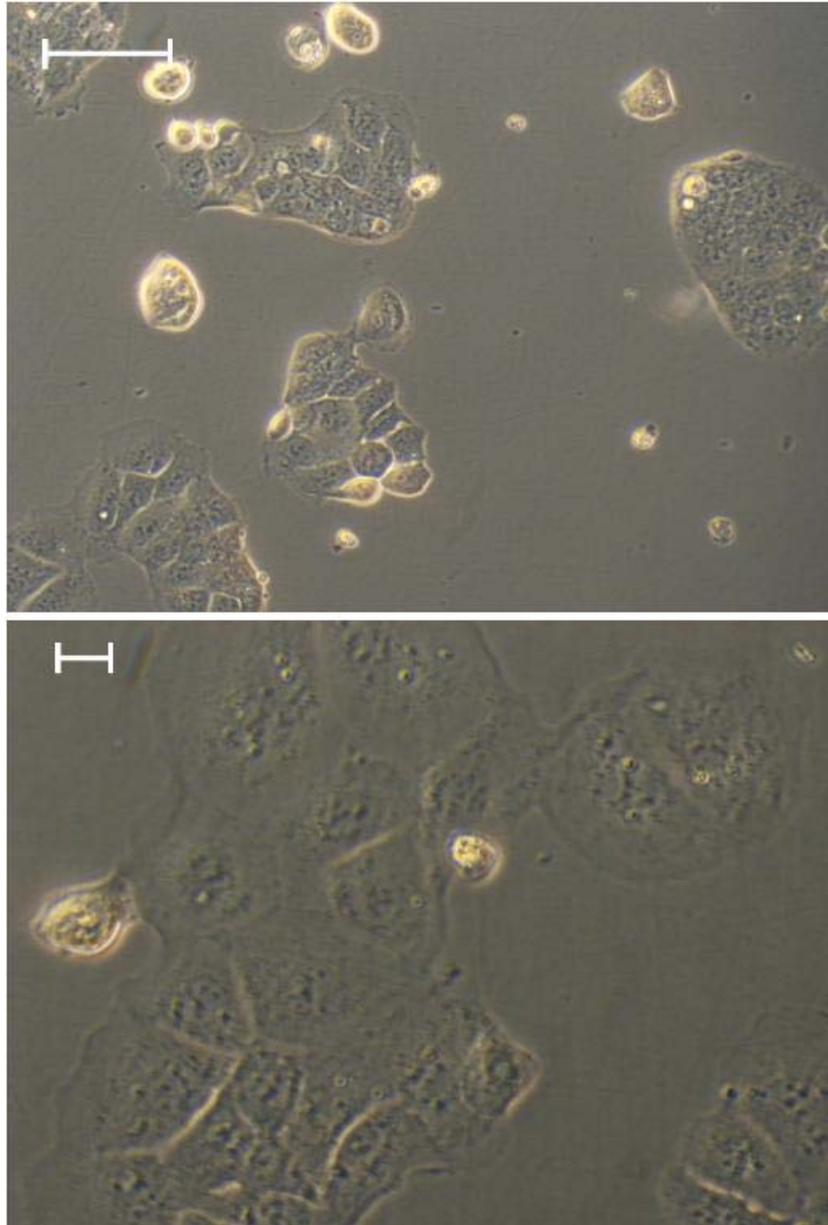


Figura 6.2. Crecimiento de células Caco-2/TC7. Día 2 de cultivo. Nótese todavía la diferente morfología en función de su adhesión al plástico de cultivo. Las células redondeadas y refringentes no se han adherido y no serán viables. Micrografía con microscopio de contraste de fase, 20x (superior) y 40 x (inferior). Barra: 100 μm (superior) y 20 μm (inferior).

El cultivo de las células continuó, renovando el medio de cultivo cada 48 h, y realizando observaciones diarias de su evolución (Figuras 6.3 y 6.4).

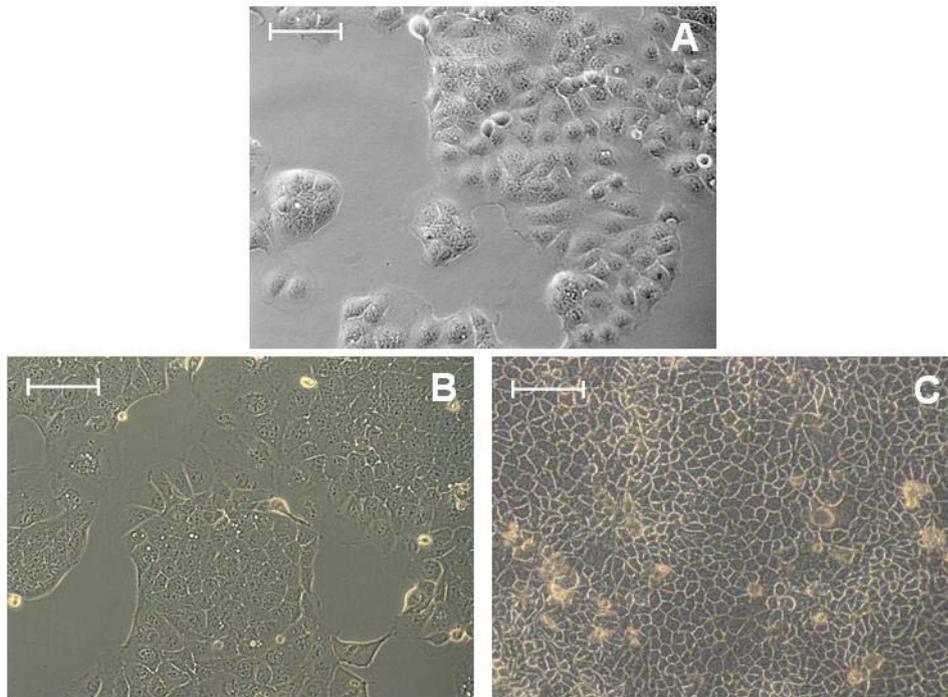


Figura 6.3. Crecimiento de células Caco-2/TC7. Día 3 (A), día 4 (B) y día 6 (C) de cultivo. Nótese el cambio en la morfología y tamaño celular conforme toda la superficie del plástico es ocupada por las células. Micrografía con microscopio de contraste de fase, 20x. Barra: 100 μ m.

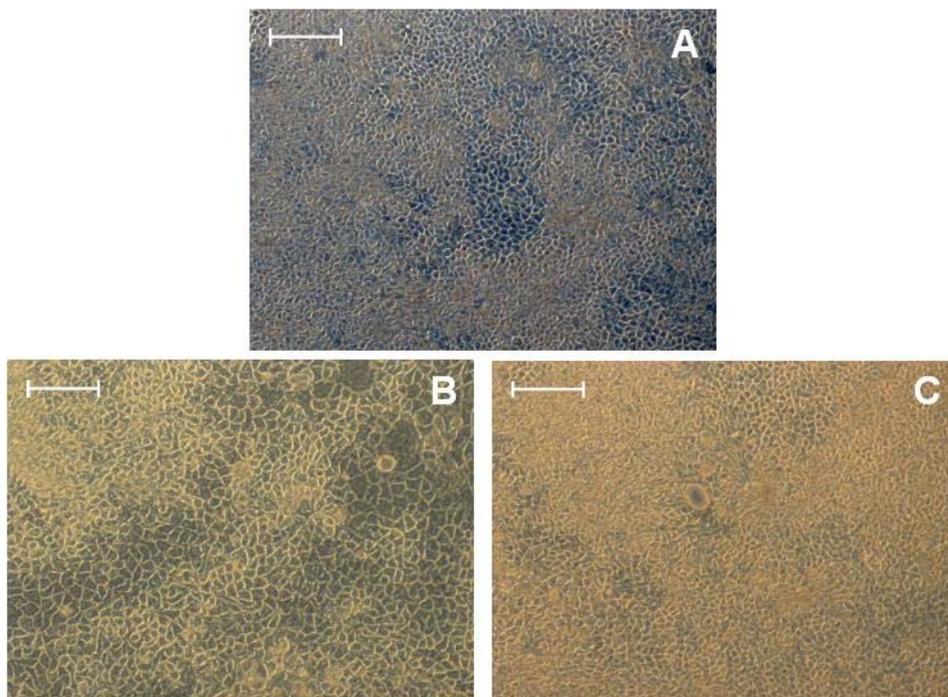


Figura 6.4. Crecimiento de células Caco-2/TC7. Día 8 (A), día 9 (B) y día 10 (C) de cultivo. Fase estacionaria. Micrografía con microscopio de contraste de fase, 20x. Barra: 100 μ m.

Durante la fase de crecimiento activo, las células crecían en grupo con forma poligonal y semi-esférica, diferenciándose claramente las células del interior del grupo respecto de las células de la periferia. Estas últimas presentaban un aspecto más plano y de tipo fibroblástico (Figura 6.3).

Alcanzada la confluencia, entre los días 6 y 7 de cultivo, todas las células adquirían un aspecto poligonal, y poco a poco se va reduciendo su tamaño. Al mismo tiempo, se va produciendo un alargamiento de las células, por lo que es un poco más dificultosa su observación al microscopio, al tener que atravesar la luz todo el espacio de su altura. Esta fase se corresponde con el inicio de la diferenciación morfológica de las células hacia un tipo enterocitario, que en microscopía electrónica permite ver el desarrollo de las microvellosidades y la formación de fuertes uniones intercelulares que hace que la resistencia transepitelial de estas células sea muy superior a resistencia que presenta un epitelio intestinal normal.

Entre los días 7-9, aunque toda la superficie del plástico de cultivo de la caja está cubierta de células, no se ha detenido su crecimiento. Continúan dividiéndose hasta se alcanza el número máximo de células por unidad de superficie. Es la fase estacionaria. En la figura 6.4 se pueden apreciar las ligeras diferencias en el tamaño de las células, desde el día 8 (Fig. 6.4A), pasando por el día 9 (Fig. 6.4B), y hasta llegar al día 10 de cultivo (Fig. 6.4C), momento en el cual se alcanza la fase estacionaria y las células dejan de dividirse. A partir de este momento, y según la bibliografía, es cuando se acelera el proceso de diferenciación funcional de estas células.

Un aspecto muy característico de estas células durante la fase estacionaria, es decir entre los días 10-15 de cultivo, es la aparición de “cúpulas” o “dumas”, las cuales son unas formaciones en las que la monocapa de células se levanta del plástico de cultivo debido al acúmulo de líquido que se produce debajo de ellas como consecuencia del incremento de transporte electrolítico en determinadas zonas. En el clon Caco-2/TC7 se puede apreciar un número relativamente reducido de este tipo de formaciones, si se compara con otros clones, o con la línea celular parental. En la figura 6.5 podemos apreciar esta formación en la que las células de la “cúpula” aparecen desenfocadas. A partir del día 15-16, estas formaciones disminuyen su número, hasta desaparecer completamente.

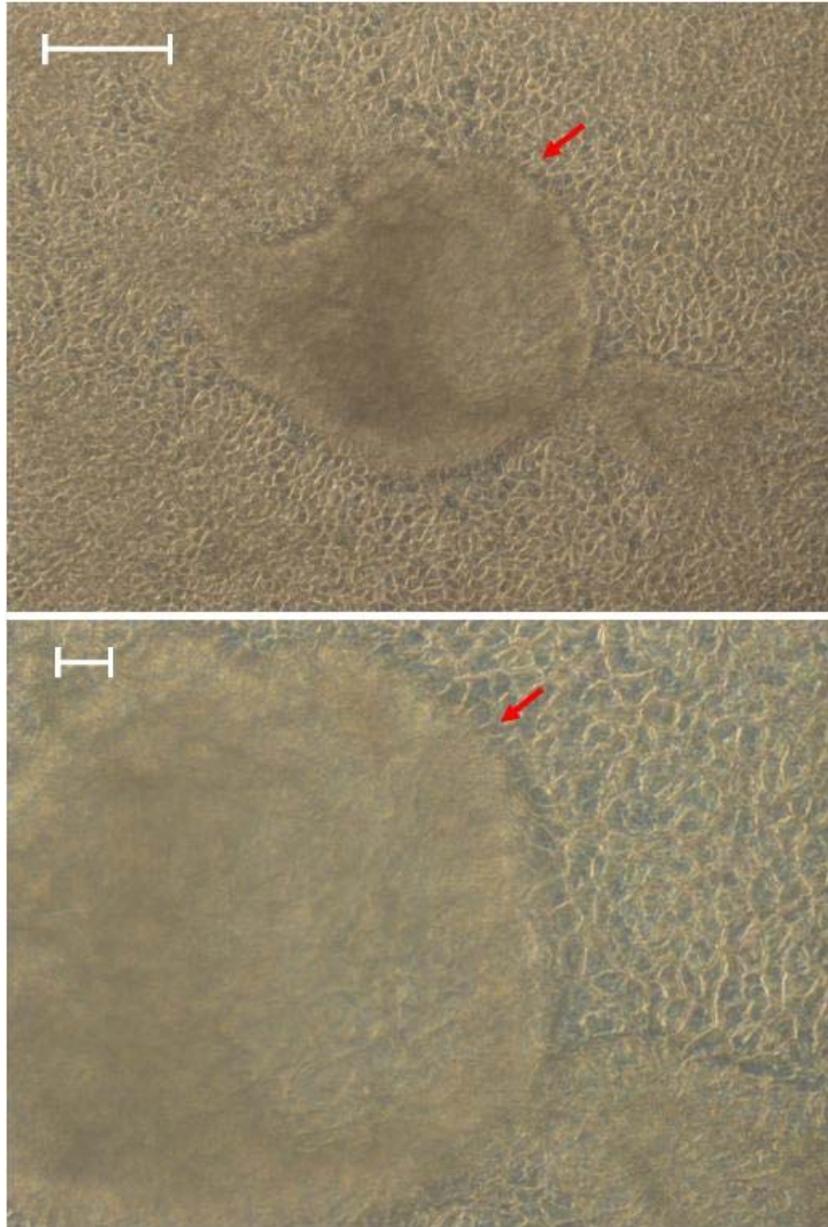


Figura 6.5. Imagen de células Caco-2/TC7 en día 15 de cultivo. Crecimiento de células Caco-2/TC7. Obsérvese la formación de una “cúpula” de aproximadamente 300-400 μm de diámetro, resultante del acúmulo de líquidos entre el tapiz celular y el plástico de la caja de cultivo. Micrografía con microscopio de contraste de fase, 20x (superior) y 40 x (inferior). Barra: 100 μm (superior) y 20 μm (inferior).

Con esta parte del trabajo sobre el cultivo de las células Caco2/TC7 se han cumplido los dos primeros objetivos parciales. Por un lado, conocer las técnicas y metodologías de un laboratorio de biología celular y molecular, y por otro dominar las bases del cultivo de células y conocer las características específicas de la línea celular Caco-2, como modelo in vitro para el estudio de proteínas enterocitarias.

6.2 Estudio del efecto de diferentes moléculas implicadas en procesos inflamatorios intestinales sobre el transporte de 5-HT en células Caco2/TC7

Previos estudios han demostrado que el LPS (activador de TLR4) y la melatonina disminuyen el transporte de serotonina a través de SERT por diferentes mecanismos. El LPS inhibe la actividad de SERT al disminuir la expresión de la proteína SERT en la membrana celular, en parte debido a una activación de la vía intracelular mediada por la PKC (Mendoza y cols, 2009). Sin embargo, la melatonina inhibe la actividad de SERT al provocar un efecto catalítico en el sitio alostérico de SERT sensible al citalopram, demostrando así la retroalimentación existente entre la melatonina y el sistema serotoninérgico (Matheus y cols, 2010).

Por otro lado, la IL-10, conocida molécula anti-inflamatoria induce un doble efecto en la actividad de SERT (Latorre y cols, 2013-B). Así, tras 6h de tratamiento a bajas concentraciones (0,01 ng/ml) inhibe el transporte de serotonina por inhibición competitiva de SERT; mientras que altas concentraciones de IL-10 (25 ng/ml) estimulan el transporte de 5-HT, al incrementar la expresión de la proteína SERT en la membrana por un mecanismo mediado por los receptores de IL-10 y la activación de la vía intracelular de la PI3K (Latorre y cols, 2013-B).

Teniendo en cuenta los conocimientos previos de los efectos de estas sustancias implicadas en los procesos inflamatorios crónicos intestinales, se planteó la hipótesis de una posible interacción de estas sustancias entre sí. Esta hipótesis parte también de otras observaciones previas, como por ejemplo del hecho que la melatonina ha demostrado efectos antiinflamatorios estimulando la síntesis de IL-10; o bien que los efectos pro- o anti-inflamatorios de IL-10 han sido observados en función de las condiciones patológicas previas del tejido (ver: Latorre y cols, 2013-B; Latorre y cols, 2014).

Para intentar demostrar la hipótesis de partida, se planificaron experimentos de medida de transporte de serotonina determinando la acumulación de este sustrato en células Caco-2/TC7 cultivadas en soporte plástico. Para ello las células fueron cultivadas en condiciones estándar en placas de 24 pocillos. El día 14 de cultivo, las células fueron sometidas a tratamiento (repetiendo en cada placa, 4 pocillos para una misma condición) con las sustancias objeto de estudio durante 24 horas, en medio de cultivo sin SFB, dando lugar a seis condiciones experimentales diferentes, que se enumeran a continuación:

- Control: células sin tratamiento, per mantenidas 24 en medio sin SFB.
- Melatonina, 0,1 mM
- IL-10, 25 ng/ml
- LPS, LPS 30 µg/ml
- LPS 30 µg/ml + Melatonina 0,1 mM
- LPS 30 µg/ml + IL-10, 25 ng/ml

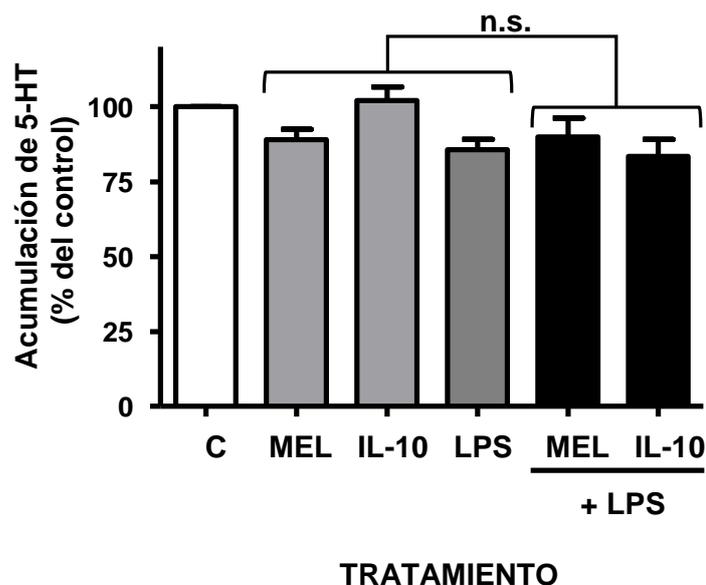


Figura 6.6: Efecto de diferentes tratamientos sobre el transporte de 5-HT. Las células se trataron con melatonina 0,1 mM, IL-10 25 ng/ml, LPS 30 µg/ml, o con LPS + melatonina y LPS+ IL-10 a las mismas concentraciones indicadas anteriormente. Cada tratamiento se aplicó 24 horas y durante los 6 minutos de medida del transporte. El control corresponde a las células que no reciben tratamiento. Los resultados están expresados en porcentaje respecto al control y se muestra el error estándar medio de cada condición.

Los resultados obtenidos y su análisis muestran que no existen diferencias significativas entre las diferentes condiciones de cultivo ensayadas (ver Figura 6.6 y Tabla 6.1). Seguramente esto es debido en parte al reducido número de experimentos realizados. Sin embargo, sí que se observa una clara tendencia de los mismos. Así, por ejemplo las células tratadas con melatonina y con LPS muestran una disminución de la acumulación de 5-HT (10-15 %), mientras que la administración de IL-10 al medio de cultivo no parece modificar el transporte de 5-HT respecto al control.

También podemos observar que los tratamientos aditivos (melatonina + LPS e IL-10 + LPS) no presentan ningún tipo de tendencia. Esto sugiere que la melatonina y el LPS no presentan un efecto sinérgico sobre la inhibición del transporte de 5-HT, a pesar de que su efecto inhibitorio, visto de forma individual, se realiza por mecanismos completamente

distintos (Mendoza y cols, 2009; Matheus y cols., 2010). Tampoco parece que la melatonina pueda revertir la inhibición provocada por el LPS. En la misma línea, el tratamiento aditivo de LPS e IL-10 tampoco parece revertir el efecto inhibitorio del LPS sobre el transporte de SERT, quizás explicable por las concentraciones utilizadas y los tiempos estudiados.

Condiciones	Media ± SEM	N
Control	100,01 ± 0,01	7
Melatonina	89,08 ± 3,60	7
IL-10	102,20 ± 4,50	6
LPS	85,77 ± 3,45	3
LPS + Melatonina	90,06 ± 6,27	5
LPS + IL-10	83,55 ± 5,55	7

Tabla 6.1: Datos numéricos correspondientes a la media aritmética ± error estándar medio (SEM) y el número de experimentos realizados (N), del efecto de diferentes tratamientos sobre el transporte de 5-HT. Las células se trataron con melatonina 0,1 mM, IL-10 25 ng/ml, LPS 30 µg/ml, o con LPS + melatonina y LPS+ IL-10 a las mismas concentraciones indicadas anteriormente. Cada tratamiento se aplicó 24 horas y durante los 6 minutos de medida del transporte. El control corresponde a las células que no reciben tratamiento. Los resultados están expresados en porcentaje respecto al control.

En resumen, los resultados obtenidos en el trabajo nos permitirían deducir que nuestra hipótesis de partida es falsa, y que no se produce una rápida interacción de diferentes sustancias pro y anti-inflamatorias sobre la actividad de SERT, prevaleciendo siempre el efecto ejercido por la activación de TLR4 por el LPS. Esto explicaría en parte que cuando se instaura un proceso inflamatorio crónico en el intestino, su resolución completa suele ser muy complicada.

Con este segundo apartado, se han logrado alcanzar los objetivos tercero y cuarto planteados en este trabajo.

7. CONCLUSIONES

Como resultado final de este trabajo podemos extraer las siguientes conclusiones:

- En este trabajo fin de grado he podido adquirir los conocimientos básicos para desarrollar habilidades en técnicas habituales de un laboratorio de investigación en fisiología y biología celular y molecular, y de esta manera poder ejecutarlas con autonomía.
- Las técnicas de cultivo celular son fundamentales para que un tipo celular o una línea celular previamente establecida pueda ser utilizada con éxito como modelo experimental “in vitro”.
- La metodología utilizada para el cultivo de la línea celular Caco-2/TC7 demanda de un conocimiento y aprendizaje previo. El hecho de tener que cultivar las células durante 15 días para poder disponer de un modelo celular diferenciado hace que la rigurosidad en su manipulación deba extremarse. Esto también supone una consideración respecto al tiempo necesario para llevar a cabo un determinado experimento, el cual será mayor que utilizando otros modelos.
- Situaciones proinflamatorias, como la activación de TLR4 por LPS o la administración de melatonina en el medio de cultivo de las células parecen inducir una disminución (aunque no significativa) del transporte de 5-HT en células Caco-2/TC7.
- Situaciones anti-inflamatorias, simuladas por la adición de IL-10 en el medio de cultivo de las células, no parece mostrar ningún tipo de alteración sobre el transporte de SERT.
- El cotratamiento con LPS e IL-10 no parece mostrar ningún tipo de reversión del efecto inhibitorio inducido por el LPS.
- El cotratamiento con LPS y melatonina no incrementa la inhibición del transporte de 5-HT. Tampoco parece reducir la inhibición observada inicialmente por el LPS, aunque a la melatonina se le han descrito acciones antiinflamatorias.

8. BIBLIOGRAFÍA

Artursson P. Epithelial transport of drugs in cell culture. I. A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive Caco-2 cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 1990; 79: 476-482.

Bertrand PP, Bertrand RL. Serotonin release and uptake in the gastrointestinal tract. *Autonomic Neuroscience*, 2010; 153:47-57.

Bischoff SC, Mailer R, Pabst O, Weier G, Sedlik W, Li Z, Chen JJ, Murphy DL, Gershon MD. Role of serotonin in intestinal inflammation: knockout of serotonin reuptake transporter exacerbates 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid colitis in mice. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* 2009; 296: G685-g695.

Button LA, Roberts SE, GoldacreMJ, Akbari A, Rodgers SE, Williams JG. Hospitalized prevalence and 5-year mortality for IBD: record linkage study. *World Journal of Gastroenterology* 2010; 16(4): 431-438.

Camilleri M. Serotonin in the Gastrointestinal Tract. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity* 2009; 16(1):53-59.

Caro I, Boulenc X, Rousset M, Meunier V, Bourrié M, Julian B, Joyeux H, Roques C, Berger Y, Zweibaum A, Fabre G. Characterization of a newly isolated Caco-2 clone (TC-7), as a model of transport processes and biotransformation of drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 1995; 116: 147-158.

Chantret I, Barbat A, Dussaulx E, Brattain MG, Zweibaum A. Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines. *Cancer Research*, 1988; 48(7): 1936-1942.

Chantret I., Rodolose A., Barbat A., Dussaulx E., Brot-Larroche E., Zweibaum A., Rousset M. Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: evidence for glucose-dependent negative regulation. *Journal of Cell Science* 1994; 107(1): 213-225.

Coates MD, Johnson AC, Greenwood-Van Meerveld B, Mawe GM. Effects of serotonin transporter inhibition on gastrointestinal motility and colonic sensibility in the mouse. *Neurogastroenterology and Motility*, 2006; 18: 464-471.

Costedio MM, Hyman N, Mawe GM. Serotonin and its role in colonic function and in gastrointestinal disorders. *Diseases of Colon and Rectum*, 2007; 50: 376-388.

De Jager PL, Franchimont D, Waliszewska A, Bitton A, Cohen A, Langelier D, Belaiche J, Vermeire S, Farwell L, Goris A, Libioulle C, Jani N, Dassopoulos T, Bromfield GP, Dubois B, Cho JH, Brant SR, Duerr RH, Yang H, Rotter JI, Silverberg MS, Steinhart AH, Daly MJ, Podolsky DK, Louis E, Hafler DA, Rioux JD. The role of the Toll receptor pathway in susceptibility to inflammatory bowel diseases. *Genes and Immunity*, 2007; 8:387-397.

Fogh J, Trempe G. New human tumor cell lines. In *Human Tumor Cells in vitro*. J Fogh editor. Plenum Publishing Corporation, New York, 1975; 115-141.

Foley KF, Pantano C, Ciolino A, Mawe GM. IFN- γ and TNF- α decrease serotonin transporter function and expression in Caco-2 cells. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2007; 292:G779-G784.

- Grés MC, Julian B, Bourrié M, Meunier V, Roques C, Berger M, Boulenc X, Berger Y, Fabre G. Correlation between oral drug absorption in humans, and apparent drug permeability in TC-7 cells, a human epithelial intestinal cell line: comparison with the parental Caco-2 cell line. *Pharmaceutical Research*, 1998; 15:726-733.
- Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. A CD4 + T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*, 1997; 389:737-742.
- Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *Journal of Immunology*. 1999; 162(7):3749-3752.
- Kidd M, Gustafsson BI, Drozdov I, Modlin LM. IL-1 β -and LPS-induced serotonin secretion is increased in EC cells derived from Crohn's disease. *Neurogastroenterology and Motility*, 2009; 21:439-450.
- Latorre E, Matheus N, Layunta E, Alcalde AI, Mesonero JE. IL-10 Counteracts Proinflammatory Mediator Evoked Oxidative Stress in Caco-2 Cells. *Mediators of Inflammation*, 2014; 2014:982639.
- Latorre E, Alcalde AI, Mesonero JE. Implicación del transportador de serotonina (SERT) en las patologías inflamatorias intestinales. *Fisiología (Revista de la SECF)*, 2013-A; 16(2): 5-8.
- Latorre E, Mendoza C, Matheus N, Castro M, Grasa L, Mesonero JE. IL-10 modulates serotonin transporter activity and molecular expression in intestinal epithelial cells. *Cytokine*, 2013-B; 61: 778-784.
- Mahraqui L, Rodolosse A, Barbat A, Dussaulx E, Zweibaum A, Rousset M, Brto-Laroche E. Presence and differential expression of SGLT1, GLUT1, GLUT2, GLUT3 and GLUT5 hexose-transporter mRNAs in Caco-2 cell clones in relation to cell growth and glucose consumption. *Biochemical Journal*, 1994; 298: 629-633.
- Matheus N, Mendoza C, Iceta R, Mesonero JE, Alcalce AI. Melatonin inhibits serotonin transporter activity in intestinal epithelial cells. *Journal of Pineal Research*, 2010; 48: 332-339
- Matheus N, Mendoza C, Iceta R, Mesonero JE, Alcalce AI. Regulation of serotonin transporter activity by adenosine in intestinal epithelial cells. *Biochemical Pharmacology*, 2009; 78:1198-1204.
- Margolis KG, Pothoulakis C. Serotonin has a critical role in the pathogenesis of experimental colitis. *Gastroenterology*, 2009; 137(5):1562-1566.
- Mendoza C, Matheus N, Latorre E, Castro M, Mesonero JE, Alcalde AI. Toll-like receptor 3 activation affects serotonin transporter activity and expression in human enterocyte-like Caco-2 cells. *Cell Physiology and Biochemistry*, 2012; 30:187-198.
- Mendoza C, Matheus N, Iceta R, Mesonero JE, Alcalde AI. Lipopolysaccharide induces alteration of serotonin transporter in human intestinal epithelial cells. *Innate Immunity*, 2009; 15: 243-250.
- Mesonero JE, Latorre E, Mendoza C, Matheus N, Alcalde AI. Papel del sistema serotoninérgico en la fisiopatología intestinal. *Gaceta de Ciencias Veterinarias*, 2010; 15(2): 72-79.
- Meunier V, Bourré M, Berger Y, Fabre G. The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. *Cell Biology and Toxicology*, 1995; 11: 187-194.
- Pinto M, Robine-Leon S, Appay M-D, Kedinger M, Triadou N, Dussaulx, E, Lacroix B, Simon-Assmann ., Haffen K, Forgh J, Zweibaum, A. Enterocyte-like Differentiation and Polarization of the Human Colon Carcinoma Cell Line Caco-2 in Culture. *Journal of Cell Biology*, 1983; 47: 323-330.

Rousset M. The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2; two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie*, 1986; 68(9): 1935-1940.

Sánchez-Muñoz F, Domínguez-Lopez A, Yamamoto-Furusho JK. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 2008; 14:4280-4288.

Salvador MT, Murillo MD, Rodríguez-Yoldi MC, Alcalde AI, Mesonero JE, Rodríguez-Yoldi MJ. Effects of serotonin on the physiology of the rabbit small intestine. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 2000; 78(5):359-366.

Spiller R, Garsed K. Infection, inflammation, and the irritable bowel syndrome. *Digestive and Liver Disease*, 2009; 41: 844-849.

Spiller RC. Role of infection in irritable bowel syndrome. *Journal of Gastroenterology*, 2007; 42:41-47.

Yamamoto M, Takeda K. Current views of toll-like receptor signaling pathways. *Gastroenterology Research and Practice*, 2010; 2010: 240365.

Young MR, Matthews JP. Serotonin regulation of T-cell subpopulations and of macrophage accessory function. *Immunology*, 1995; 84:148-152.

Zhou R, Wei H, Sun R, Zhang J, Tian Z. NKG2D recognition mediates Toll-like receptor 3 signaling-induced breakdown of epithelial homeostasis in the small intestines of mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2007; 104: 7512-7515.

Zucco F, Batto A-F, Bises G, Chambaz J, Chiusolo A, Consalvo R, Cross H, Dal Negro G, De Angelis I, Fabre G, Guillou F, Hoffman S, Laplanche L, Morel E, Pinçon-Raymond M, Prieto P, Turco L, Ranaldi G, Rousset M, Sambuy Y, Scarino ML, Torreilles F, Stammati A. An Inter-laboratory Study to Evaluate the Effects of Medium Composition on the Differentiation and Barrier Function of Caco-2 Cell Lines. *Alternative to Laboratory Animals (ATLA)*, 2005; 33: 603-618.

Zweibaum A, Laburthe M, Grasset E, Louvard D. Use of cultured cell lines in studies of intestinal cell differentiation and function. IN: *Handbook of physiology. The Gastrointestinal System. Vol. IV: Intestinal Absorption and Secretion*. American Physiology Society, 1991; pp. 223-255.

Direcciones url consultadas:

Confederación de asociaciones de enfermos de Crohn y colitis ulcerosa de España, 2014. (<http://www.accuesp.com>)

European Crohn's and Colitis Organisation, 2014 (www.ecco-ibd.eu)

European Federation of Crohn's and Ulcerative Colitis Association, 2014 (www.efcca.org)

Sociedad Española de Reumatología, 2014. (<http://www.ser.es>)