



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

Tesis de Doctorado

**“REGULACIÓN AGUDA DE LA LOCALIZACIÓN Y
ACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA ASOCIADA A
RESISTENCIA A MULTIDROGAS 2 (MRP2)
INTESTINAL POR NUTRIENTES”**

Presentada por:

Bioq. Guillermo Nicolás Tocchetti

Rosario, Argentina

2019

“REGULACIÓN AGUDA DE LA LOCALIZACIÓN Y ACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA ASOCIADA A RESISTENCIA A MULTIDROGAS 2 (MRP2) INTESTINAL POR NUTRIENTES”

Guillermo Nicolás Tocchetti

Bioquímico egresado de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y
Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Fisiología Experimental, dependiente de CONICET y de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario, durante el período comprendido entre el 1 de abril de 2014 y el 1 de diciembre de 2018, bajo la dirección del Dr. Aldo Domingo Mottino y la codirección de la Dra. Silvina Stella Maris Villanueva.

ÍNDICE

DIVULGACIÓN	- 6 -
RESUMEN	- 7 -
CAPÍTULO 1 – INTRODUCCIÓN GENERAL AL TEMA DE LA TESIS Y PRESENTACIÓN DE LA HIPÓTESIS DE TRABAJO.	- 8 -
1.1. Introducción	- 8 -
1.1.1. Anatomía del intestino delgado.	- 8 -
1.1.2. Permeabilidad intestinal y barrera bioquímica	- 11 -
1.1.3. Eliminación intestinal: metabolismo + transporte	- 13 -
1.1.4. Proteína asociada a resistencia a multidrogas 2 (MRP2)	- 16 -
1.1.4.1. Características generales y sustratos	- 16 -
1.1.4.2. MRP2 intestinal. Localización y función	- 20 -
1.1.4.3. MRP2 intestinal. Regulación de su actividad	- 21 -
1.1.5. Péptido tipo glucagon-2 (GLP-2)	- 23 -
1.1.5.1. Generalidades	- 23 -
1.1.5.2. Funciones biológicas	- 24 -
1.2. Hipótesis	- 27 -
CAPÍTULO 2 – LA ACTIVIDAD DE MRP2 EN INTESTINO DE RATA PUEDE REGULARSE DE FORMA AGUDA A TRAVÉS DE CAMBIOS DE LOCALIZACIÓN ENTRE DOMINIOS APICALES Y DOMINIOS INTRACELULARES.	- 28 -
2.1. Objetivo	- 28 -
2.2. Introducción	- 28 -
2.3. Materiales y métodos	- 31 -
2.3.1. Reactivos	- 31 -
2.3.2. Animales y recolección de muestras	- 31 -
2.3.3. Estudios de actividad de MRP2	- 32 -
2.3.4. Inmunomarcación seguida de microscopía confocal	- 35 -
2.3.5. Determinación de la distribución de MRP2 entre fracciones enriquecidas en BBM y en membranas intracelulares (MI).	- 38 -
2.3.6. Estudios de western blot	- 40 -
2.3.7. Análisis estadístico	- 42 -
2.4. Resultados	- 42 -
2.4.1. Modulación de la actividad de MRP2 en sacos intestinales de rata	- 42 -
2.4.2. Detección de cambios en la localización de MRP2 por microscopía confocal cuantitativa	- 45 -
2.4.3. Detección de cambios en localización de MRP2 por fraccionamiento de membranas seguido de western blot	- 47 -
2.5. Conclusión	- 50 -
CAPÍTULO 3 – LA ACTIVIDAD Y LOCALIZACIÓN DE MRP2 EN INTESTINO DE RATA SON REGULABLES <i>IN VIVO</i> Y DE FORMA AGUDA POR	

NUTRIENTES, SIENDO GLP-2 UN MEDIADOR INVOLUCRADO EN ESTE EFECTO.	- 51 -
3.1. Objetivo	- 51 -
3.2. Introducción	- 51 -
3.2.1. Secreción bifásica de GLP-2 en respuesta a nutrientes	- 51 -
3.2.2. Receptor de GLP-2 (GLP-2R)	- 54 -
3.2.3. IGF-1 y adenosina como mediadores de la acción de GLP-2	- 55 -
3.3. Materiales y métodos	- 59 -
3.3.1. Reactivos	- 59 -
3.3.2. Modelo <i>in vivo</i>	- 59 -
3.3.2.1. Tratamientos por vía endovenosa o intraluminal	- 60 -
3.3.2.2. Pretratamientos	- 61 -
3.3.2.3. Estudios de actividad de MRP2	- 61 -
3.3.2.4. Estudios de localización de MRP2	- 63 -
3.3.3. Análisis estadístico	- 63 -
3.4. Resultados	- 64 -
3.4.1. Validación del modelo <i>in vivo</i>	- 64 -
3.4.2. Efecto de agentes liberadores de GLP-2 sobre la actividad de MRP2 <i>in vivo</i>	- 64 -
3.4.3. Participación de GLP-2 en el efecto del ácido oleico	- 65 -
3.4.4. Participación de mediadores cascada abajo de GLP-2	- 66 -
3.4.5. Efecto del seccionamiento del yeyuno	- 68 -
3.4.6. Localización de MRP2	- 68 -
3.5. Conclusión	- 70 -
CAPÍTULO 4 – LA ACTIVIDAD Y LOCALIZACIÓN DE MRP2 SON REGULABLES DE FORMA AGUDA EN CÉLULAS INTESTINALES DE ORIGEN HUMANO CACO-2. UTILIZACIÓN DE ESTE MODELO PARA LA EVALUACIÓN DEL MECANISMO SUBCELULAR.	- 72 -
4.1. Objetivo	- 72 -
4.2. Introducción	- 72 -
4.2.1. Células Caco-2 como modelo de enterocitos humanos	- 72 -
4.2.2. Receptores de adenosina	- 73 -
4.3. Materiales y métodos	- 74 -
4.3.1. Reactivos	- 74 -
4.3.2. Cultivo de células Caco-2	- 74 -
4.3.1. Estudios de actividad de MRP2	- 75 -
4.3.2. Determinación de la distribución de MRP2 entre fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas (MP) y en membranas intracelulares (MI)	- 77 -
4.3.3. Western blot	- 78 -
4.3.4. Inmunomarcación seguida de microscopía confocal	- 78 -
4.3.5. Cuantificación de cAMP intracelular	- 79 -
4.3.6. Análisis estadístico	- 79 -
4.4. Resultados	- 80 -

4.4.1. Demostración de la regulación aguda de MRP2 en células Caco-2 por acción de dbcAMP y E ₂ 17G	- 80 -
4.4.1.1. Modulación de la actividad de MRP2 en células Caco-2	- 80 -
4.4.1.2. Detección de cambios en la localización de MRP2 por microscopía confocal cuantitativa	- 81 -
4.4.1.3. Detección de cambios en la localización de MRP2 por fraccionamiento de membranas seguido de western blot	- 83 -
4.4.2. Mecanismo molecular cascada abajo de la adenosina	- 86 -
4.4.2.1. Modulación de la actividad de MRP2	- 86 -
4.4.2.2. Modulación de la localización de MRP2	- 88 -
4.4.2.3. Cuantificación de cAMP intracelular	- 89 -
4.5. Conclusión	- 90 -
DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN FINAL	- 92 -
REFERENCIAS	- 104 -

DIVULGACIÓN

Los resultados presentados en este trabajo han sido dados a conocer en una publicación y en dos reuniones científicas:

A. PUBLICACIÓN

1. "Acute regulation of multidrug resistance-associated protein 2 localization and activity by cAMP and estradiol-17 β -D-glucuronide in rat intestine and Caco-2 cells." Guillermo Nicolás Tocchetti, Agostina Arias, Maite Rocío Arana, Juan Pablo Rigalli, Camila Juliana Domínguez, Felipe Zecchinati, María Laura Ruiz, Silvina Stella Maris Villanueva, Aldo Domingo Mottino. *Archives of Toxicology* 92 (2018) 777–788.

B. PRESENTACIONES EN REUNIONES CIENTÍFICAS

1. "Regulación postraduccional de la expresión y actividad del transportador de xenobióticos MRP2 en células intestinales de origen humano Caco-2". Guillermo Nicolás Tocchetti, Agostina Arias, Maite Rocío Arana, Virginia Perdomo, María Laura Ruiz, Juan Pablo Rigalli, Marcelo Gabriel Luquita, Silvina Stella Maris Villanueva, Aldo Domingo Mottino. LIX Reunión de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. 19-22 de noviembre de 2014, Mar del Plata (Buenos Aires), Argentina.
2. "Acute modulation of intestinal MRP2 activity by nutrients. Involvement of GLP-2". Guillermo Nicolás Tocchetti, Camila Juliana Domínguez, Felipe Zecchinati, Maite Rocío Arana, Juan Pablo Rigalli, María Laura Ruiz, Silvina Stella Maris Villanueva, Aldo Domingo Mottino. LXIII Reunión de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. 14-17 de noviembre de 2018, Mar del Plata (Buenos Aires), Argentina.

RESUMEN

La proteína asociada a resistencia a multidroga 2 (MRP2) es una bomba de eflujo perteneciente a la superfamilia de transportadores ABC. En el intestino, se localiza en la membrana apical del enterocito y tiene un rol clave limitando la absorción de xenobióticos. La regulación aguda de su actividad a través de cambios en la localización subcelular nunca fue estudiada. En este trabajo hipotetizamos que ciertos nutrientes, una vez que alcanzan la luz intestinal, son capaces de incrementar la densidad de MRP2 en la membrana apical (y por ende su actividad protectora) a través de un mecanismo mediado por la hormona intestinotrófica GLP-2. En la primera parte del trabajo demostramos que la localización y la actividad de MRP2 en sacos intestinales de rata son regulables de forma aguda. Para eso utilizamos estradiol-17 β -D-glucuronido y dibutiril-AMP cíclico, dos agentes conocidos por producir internalización e inserción de MRP2 en modelos hepáticos. En la segunda parte del trabajo utilizamos un novedoso modelo *in vivo* para demostrar que la administración intrayeyunal de ácido oleico es capaz de inducir una inserción de MRP2 en la membrana apical y aumentar su actividad de transporte. Además, mediante diferentes estrategias experimentales, demostramos que GLP-2 es un mediador de ambos efectos, disparando una señal que viaja a través de la pared intestinal y culmina con un aumento en la producción extracelular de adenosina mediada por CD73. En la última parte del trabajo y utilizando la línea celular intestinal Caco-2 demostramos que MRP2 de origen humano también es susceptible de regulación aguda y que el tratamiento agudo con adenosina puede producir inserción y aumento de actividad de MRP2 en este modelo, en un proceso probablemente mediado por el eje A_{2B}AR/cAMP/PKA. En conjunto, estos hallazgos representan un mecanismo fisiológico novedoso orientado a protegernos contra la absorción de tóxicos en períodos absorptivos.

CAPÍTULO 1 – Introducción general al tema de la tesis y presentación de la hipótesis de trabajo.

1.1. Introducción

1.1.1. Anatomía del intestino delgado.

El intestino delgado es el órgano digestivo y absorbivo por excelencia. Se extiende desde el píloro hasta la válvula ileocecal, alcanzando una longitud total de entre 2,7 y 4,5 m (Gondolesi y col., 2012). Anatómicamente se divide en tres segmentos o regiones: duodeno, yeyuno e íleon. El duodeno, de unos 25 cm de longitud, es el segmento más corto, comenzando luego del píloro y extendiéndose hasta el nivel del ligamento de Treitz (ángulo duodenoyeyunal). A nivel de este segmento desembocan el colédoco y el conducto pancreático principal (generalmente unidos previo a la desembocadura formando la ampolla hepatopancreática), los cuales vierten al duodeno la bilis y el jugo pancreático, respectivamente. La segunda porción del intestino delgado, el yeyuno, mide entre 1,0 y 1,7 m, representando el 40% del intestino delgado posduodenal. En esta región se lleva a cabo la mayor parte de la digestión y absorción, es por esto que la irrigación sanguínea es muy abundante y los pliegues son grandes y altos. Finalmente, el íleon, de 1,6 a 2,7 m de longitud, representa el 60% restante del intestino delgado posduodenal y se une con el intestino grueso mediante la válvula ileocecal. En comparación con el yeyuno, está menos irrigado y sus pliegues son más pequeños.

En cuanto a su anatomía microscópica, el intestino delgado cuenta con las cuatro capas que están presentes en la mayor parte del tubo digestivo: mucosa, submucosa, muscular y serosa (Figura 1.1). La **mucosa** está compuesta por un epitelio cilíndrico simple en contacto directo con el contenido luminal, la lámina propia (tejido conectivo laxo y tejido linfoide asociado a mucosa [o MALT, del inglés *Mucosal-Associated Lymphoid Tissue*]) y la *muscularis mucosae* (capa de músculo liso). El epitelio de la mucosa contiene diversos tipos celulares especializados: enterocitos (los cuales representan alrededor del 80% de las células del epitelio), células caliciformes, células enteroendocrinas y células de Paneth. Más adelante nos enfocaremos en algunos tipos celulares de interés en este trabajo. Por su parte, la **submucosa** es rica en capilares sanguíneos y linfáticos que absorben la mayor parte de los nutrientes. Además, en ella se encuentra el plexo de Meissner, consistente en una red neuronal cuya función principal es regular las secreciones a nivel del tubo digestivo. La **muscular** consiste en dos capas de músculo liso: la interna, más fina, conteniendo fibras circulares y la externa, más gruesa, conteniendo fibras longitudinales. Entre ambas capas se encuentra el plexo de Auerbach, otra red neuronal que contribuye principalmente a coordinar las contracciones y movimientos peristálticos. Los plexos de Meissner y de Auerbach agrupan las neuronas que constituyen el sistema nervioso entérico. Finalmente, el yeyuno y el íleon, por su localización intraperitoneal, están cubiertos por una **serosa** que es continua con el mesenterio. La mayor parte del duodeno, de localización retroperitoneal, sólo cuenta con una serosa en su superficie anterior; el resto de sus superficies están cubiertas por adventicia.

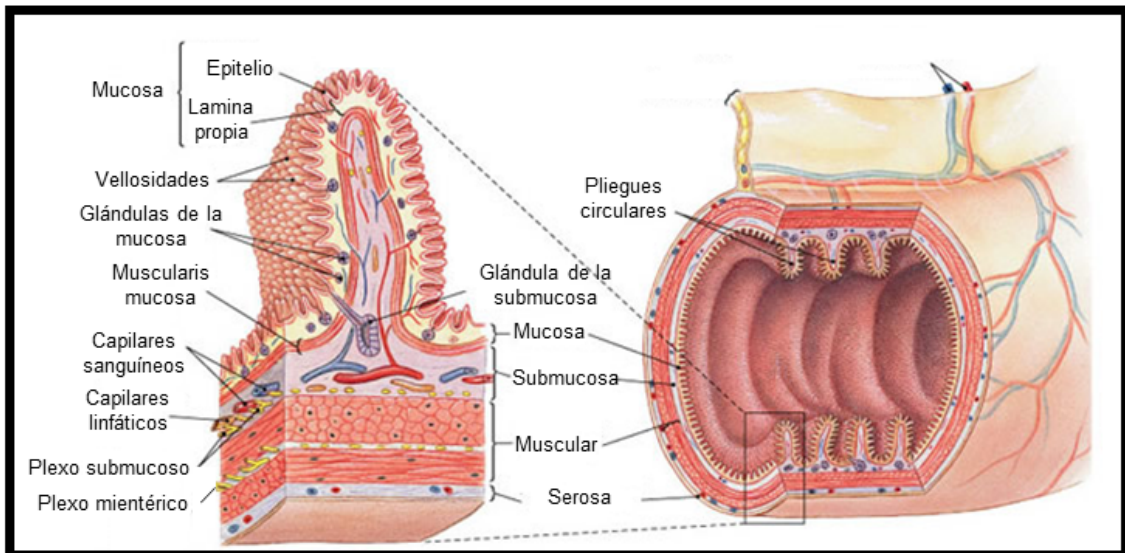


Figura 1.1. Características histológicas del intestino delgado. Adaptado de una imagen de Pearson Education Inc.

Además de estas características comunes a todo el tracto gastrointestinal, el intestino delgado presenta características estructurales especiales que le permiten contar con una amplísima superficie interna, favoreciendo su función digestiva y absorbiva. Además de su gran longitud, este órgano cuenta con tres tipos de extensiones: los pliegues circulares, las vellosidades y las microvellosidades, que incrementan la superficie luminal en un factor de 1,57, 6,5 y 13, respectivamente. Utilizando estos valores, puede estimarse la superficie total del intestino delgado en 30 m² (Helander y Fändriks, 2014). Los **pliegues circulares** (o pliegues de Kerckring) son pliegues transversales de la mucosa y la submucosa de altura máxima 10 mm y de tipo permanente. Además de aumentar la superficie total, ralentizan el movimiento del contenido intestinal promoviendo su mezcla y absorción. Por su parte, las **vellosidades** son proyecciones digitiformes de la mucosa de 0,5 a 1 mm de alto que le otorgan al interior del intestino su aspecto aterciopelado o de toalla de felpa. Debido a su

alta densidad (20-40 por mm²), las vellosidades aumentan apreciablemente la superficie de absorción. Entre sus bases existen numerosos poros o invaginaciones del epitelio que llegan hasta la *muscularis mucosae* denominadas criptas de Lieberkühn. En estas regiones el epitelio está formado principalmente por células de carácter no absorptivo como células de Paneth y células madre intestinales. Finalmente, las **microvellosidades** son proyecciones de hasta 1 µm de longitud de la membrana apical de los enterocitos aumentando notablemente el cociente entre superficie y volumen luminal. Por su aspecto al microscopio óptico, las microvellosidades también se denominan en conjunto borde o ribete en cepillo (o BBM, del inglés *Brush Border Membrane*) y en su enorme superficie contienen enzimas digestivas y transportadores de membrana, los cuales presentaremos más adelante.

1.1.2. Permeabilidad intestinal y barrera bioquímica

¿Cuál es el camino que puede seguir un compuesto para absorberse? Desde el punto de vista conceptual, existen dos rutas por las cuales una molécula puede atravesar el epitelio intestinal: entre células adyacentes – denominada **vía paracelular** – y a través de las propias células – denominada **vía transcelular**. La difusión de moléculas por la **vía paracelular** está restringida tanto por tamaño como por carga debido a la presencia de complejos proteicos que mantienen la proximidad y adhesión entre enterocitos conocidos como uniones intercelulares, entre los que se incluyen uniones estrechas, uniones de anclaje, uniones gap y desmosomas (Salvo-Romero y col., 2015). El agua y los compuestos pequeños e hidrofílicos pueden permear a través de estas uniones, a la vez que los compuestos catiónicos las atraviesan más fácilmente que los neutros o aniónicos

(Sugano, 2007). Por su parte, el transporte de una molécula por la **vía transcelular** implica atravesar tanto la membrana apical como la membrana basolateral del enterocito y puede darse por difusión simple (transporte de tipo inespecífico, exclusivo para moléculas pequeñas y anfipáticas) o con mediación de transportadores de membrana (transporte de tipo específico). Este último tipo de transporte puede dividirse en transporte facilitado y transporte activo. Mientras que el transporte de tipo facilitado permite el pasaje de solutos a favor de su gradiente electroquímico y sin gasto de energía, el transporte activo permite el pasaje de solutos en contra de su gradiente electroquímico con gasto de energía, siendo ésta proveniente de la hidrólisis del ATP (transporte activo primario) o de la disipación de un gradiente previamente generado por bombas iónicas (transporte activo secundario). Ambos tipos de transporte transepitelial están ilustrados en la Figura 1.2.

Como mencionamos, la extensa superficie del intestino ofrece una ventaja desde el punto de vista de la capacidad absorbente. Sin embargo, esta singularidad trae aparejada un elevado riesgo de absorber compuestos potencialmente nocivos presentes en la dieta. En este contexto trasciende el rol clave del epitelio intestinal como **barrera bioquímica**, limitando el ingreso de xenobióticos a la circulación sistémica no sólo a través de las peculiaridades anatómicas descritas en el párrafo anterior, sino también por acción de un eficiente sistema intracelular de eliminación que le permite metabolizar y excretar compuestos de vuelta a la luz intestinal.

1.1.3. Eliminación intestinal: metabolismo + transporte

En términos generales, la eliminación intestinal de xenobióticos y endobióticos tiene lugar en tres fases, casi siempre secuenciales: las fases I y II consisten en la biotransformación enzimática del compuesto parental, mientras que la fase III consiste en el transporte de los metabolitos hacia la luz intestinal por parte de bombas de eflujo.

Las reacciones de **fase I** son reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis que crean o liberan nuevos grupos funcionales en el sustrato con el objetivo de aumentar la polaridad de la molécula. Los citocromos P-450 (CYP) son monooxigenasas presentes en el retículo endoplasmático que catalizan la gran mayoría de las reacciones de fase I, con las subfamilias CYP3A y CYP2C representando el 80% y el 18% de los CYP de la mucosa intestinal, respectivamente (Thelen y Dressman, 2009).

Las reacciones de **fase II** son reacciones de conjugación en las cuales el metabolito procedente de la fase I se acopla a un sustrato endógeno formando productos con menor reactividad química, más grandes e hidrofílicos. Las enzimas de fase II más relevantes en el intestino son las UDP-glucuroniltransferasas (UGT), glutatión-S-transferasas (GST), sulfotransferasas y aciltransferasas (Shin y col., 2009). Si bien lo más frecuente es que exista un acoplamiento entre reacciones de fase I y fase II, también es posible que los compuestos sufran una única reacción de biotransformación.

La **fase III** hace referencia a la exportación de los compuestos provenientes de las fases I y II (aunque también pueden entrar a fase III compuestos sin

metabolizar) hacia la luz intestinal. Esta exportación es llevada a cabo por bombas de eflujo pertenecientes a la superfamilia de transportadores ABC (del inglés *ATP-Binding Cassette*) (Döring y Petzinger, 2014). Los transportadores que cumplen con esta función en la membrana apical del enterocito son la proteína asociada a resistencia a multidroga 2 (MRP2, del inglés *Multidrug Resistance-associated Protein 2*), la glicoproteína P (P-gp, del inglés *P-glycoprotein*) y la proteína de resistencia de cáncer de mama (BCRP, del inglés *Breast Cancer Resistance Protein*) (Tucker y col., 2012). En conjunto, estos transportadores pueden expulsar de la célula una amplia variedad de xenobióticos, cumpliendo un rol clave en la biodisponibilidad de aquellos que ingresan por vía oral como fármacos y compuestos tóxicos de la dieta (Estudiante y col., 2013). Asimismo, pueden desempeñar un papel importante en la depuración sistémica tanto de xenobióticos como de productos del metabolismo endógeno que son captados por el enterocito a través de la membrana basolateral (ver Figura 1.2).

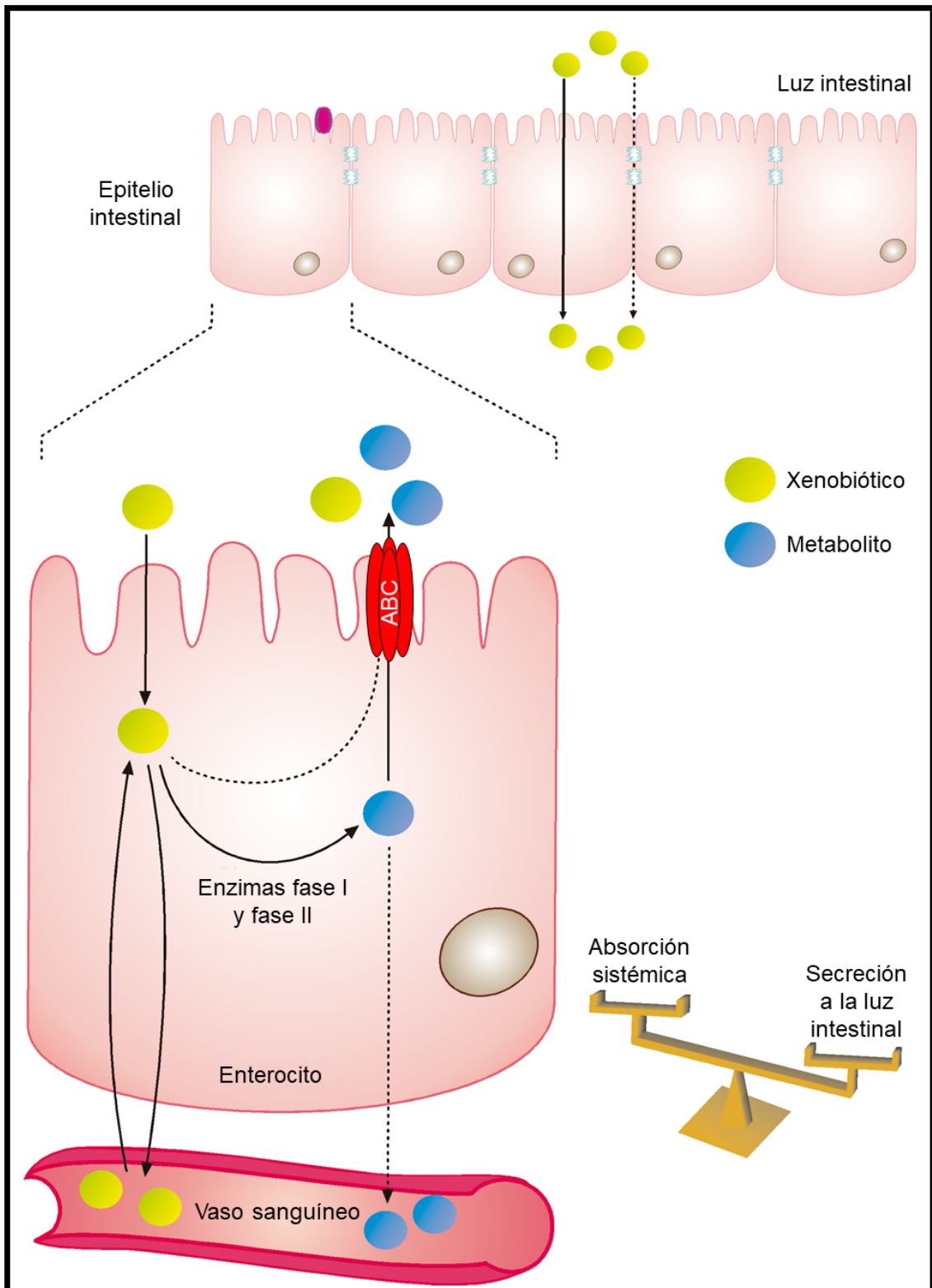


Figura 1.2. Permeabilidad intestinal y barrera bioquímica. Los xenobióticos (esferas amarillas) incorporados luminalmente ingresan al enterocito por difusión simple o a través de procesos mediados por transportadores y luego atraviesan la membrana basolateral para incorporarse a la circulación sistémica (vía transcelular). Dependiendo de su tamaño e hidrofobicidad, los xenobióticos pueden alcanzar la circulación sistémica a través de la vía paracelular. Los

productos generados en el enterocito por acción de enzimas de fase I y fase II, por ejemplo derivados conjugados hidrofílicos (esferas azules), son secretados hacia la luz intestinal por transportadores ABC, entre los que se destaca MRP2 (fase III). Un amplio rango de compuestos anfifílicos pueden ser eventualmente secretados de regreso hacia la luz intestinal sin necesidad de ser metabolizados. El dibujo de la balanza ilustra el concepto de la función de barrera: cuanto mayor es la tasa de secreción de compuestos hacia la luz intestinal, menores son las posibilidades de que los xenobióticos o sus metabolitos sean absorbidos hacia la circulación sistémica. Los transportadores ABC también participan en la depuración sistémica de xenobióticos disponibles desde el lado seroso del enterocito. En ese caso, la captación a través de la membrana basolateral es seguida de la biotransformación por enzimas de fase I y II, resultando finalmente en la extrusión a través del transportador de membrana apical. Figura adaptada de Tocchetti y col. (2016)

1.1.4. Proteína asociada a resistencia a multidroga 2 (MRP2)

1.1.4.1. Características generales y sustratos

Como ya mencionamos, MRP2 pertenece a la superfamilia de transportadores ABC, un conjunto de transportadores activos primarios que bombean sustratos fuera de la célula gracias a un cambio conformacional producido por la hidrólisis del ATP. A su vez, es el segundo miembro de la familia ABCC, también conocida como MRP (Chen y col., 2016). Estructuralmente, MRP2 cuenta con 17 hélices transmembrana agrupadas en 3 dominios transmembrana (MSD1, -2 y -3, del inglés *Membrane-Spanning Domains*), las cuales están conectadas por regiones *linker* (L0 y L1). Además, la molécula contiene dos dominios citosólicos de unión a ATP (NBD1 y -2, del inglés *Nucleotide-Binding Domain*) (Borst y col., 1999) (ver Figura 1.3a).

MRP2 fue inicialmente identificada como un transportador de aniones orgánicos localizado en la membrana canalicular del hepatocito (Jansen y col., 1993). Conocida en ese entonces por otros nombres como cMOAT (del inglés *canalicular Multispecific Organic Anion Transporter*), MRP2 fue clonada y secuenciada por primera vez en 1996 a partir de muestras de hígado de rata

(Büchler y col., 1996). Poco tiempo después, se relacionó la ausencia de su homólogo humano con el síndrome de Dubin-Johnson (Kartenbeck y col., 1996; Paulusma y col., 1997), un desorden de tipo autosómico recesivo reportado décadas atrás y caracterizado por un defecto en la excreción de glucurónidos de bilirrubina y bromosulfoftaleína conjugada desde el hepatocito hacia la bilis, resultando en acumulación plasmática de los mismos (Dubin y Johnson, 1954; Abe y Okuda, 1975). Además de su rol en la secreción biliar, MRP2 está involucrada en la eliminación de aniones orgánicos principalmente en riñón e intestino (Van Aubele y col., 2000; Gotoh y col., 2000), pero también a nivel de la placenta (St-Pierre y col., 2000) y la barrera hematoencefálica (Miller, 2015).

La especificidad de sustratos de MRP2 es amplia, incluyendo principalmente moléculas lipofílicas conjugadas con ácido glucurónico, glutatión y sulfato. Además de conjugados aniónicos, un gran número de aniones anfifílicos no conjugados también son transportados por MRP2 (König y col., 1999). Como se puede ver en la Tabla 1.1, entre estos compuestos se incluyen numerosas drogas de uso terapéutico, metales pesados y toxinas. Varios compuestos endógenos como glutatión reducido y oxidado, conjugados de leucotrienos, prostaglandinas, hepoxilinas, sales biliares y bilirrubina también forman parte de esta lista (de Waart y col., 2006; Chen y col., 2016; Stevens y col., 2018).

Tabla 1.1. Sustratos de MRP2

Categoría	Ejemplos
Antibióticos	Ampicilina, azitromicina, ceftriaxona, grepafloxacina, rifampicina
Anticancerígenos	Ciclofosfamida, cisplatino, clorambucilo, colchicina, doxorubicina, epirubicina, etopósido, irinotecan y su metabolito SN-38, metotrexato y su metabolito 7-hidroximetotrexato, vinblastina
Antihipertensivos	Olmesartán, temocaprilato, valsartán
Antirretrovirales	Adeovir, cidofovir, darunavir, indinavir, lopinavir, nelfinavir, ritonavir, saquinavir
Compuestos naturales	Aluminio y otros metales pesados, conjugados de resveratrol, epicatequina, extracto de Rhei Rhizoma, fenoles, folato reducido, genisteína y otros fitoestrógenos, glucurónido de naringenina y otros flavonoides, ocratoxina A, porfirinas
Otros xenobióticos	2,4-dinitrofenil-S-glutation (DNP-SG), 2-amino-1-metil-6-fenilimidazol[4,5-b]piridina (PhIP), bromosulfoftaleína, etinilestradiol-3-O-glucurónido, ezetimiba, fexofenadina, fosinopril, sulfasalazina
Compuestos endógenos	Estradiol-17β-D-glucurónido (E ₂ 17G), estrona-3-sulfato, epoxilinas, glucurónidos de bilirrubina, glutation, leucotrienos conjugados con glutation, prostaglandinas, sales biliares conjugadas

La información contenida en esta tabla se extrajo de Estudante y col. (2013) y de Chen y col. (2016).

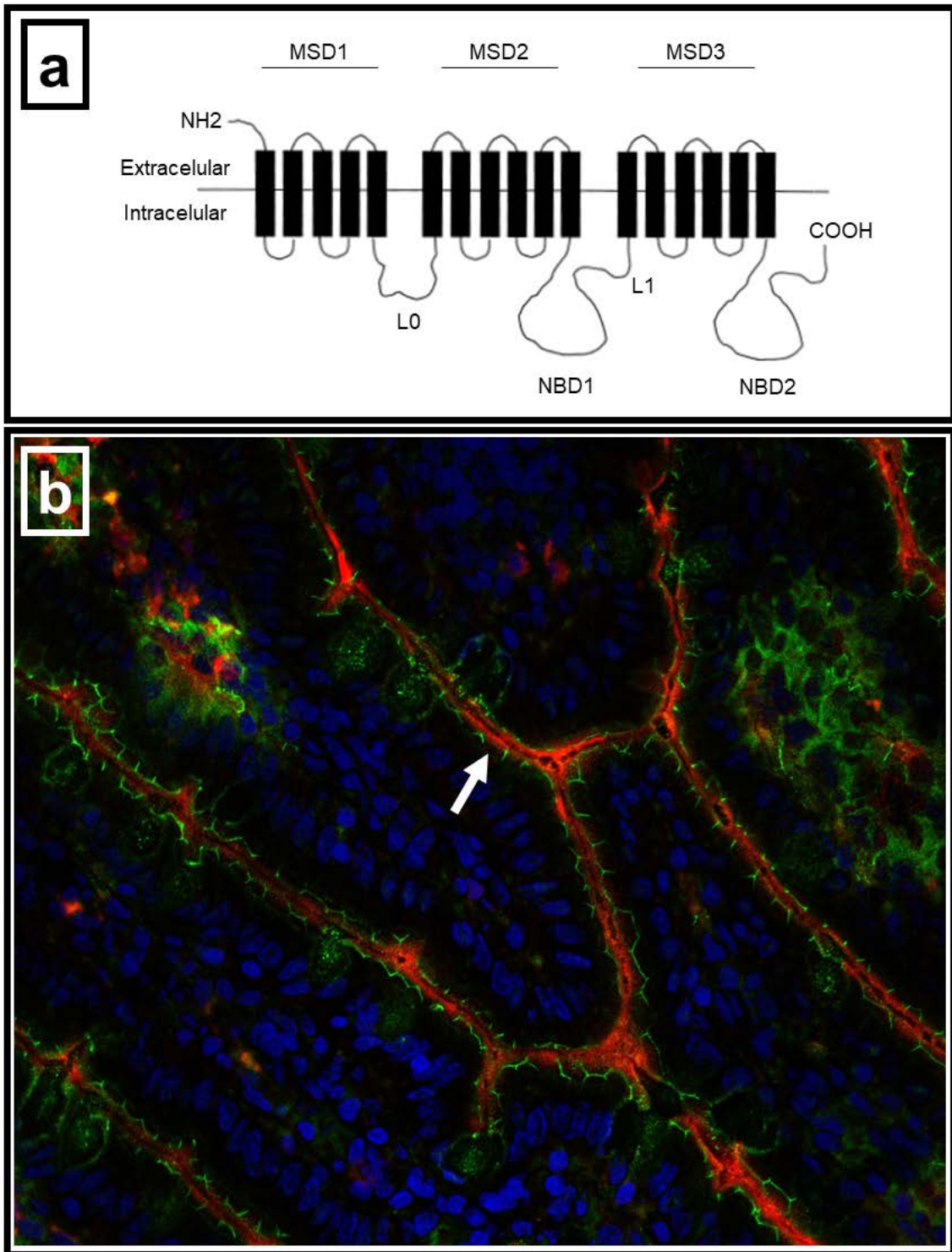


Figura 1.3. Topología y localización de MRP2. a. Dibujo que ilustra los tres dominios transmembrana (MSD1, MSD2 y MSD3), las regiones linker (L0 y L1) que los conectan y los dominios de unión a ATP (NBD1 y NBD2). b. Imagen de yeyuno de rata obtenida por microscopía confocal con marcación de MRP2 en rojo, la proteína de uniones estrechas ZO-1 en verde y los núcleos en azul. MRP2 se detecta preferencialmente en la superficie de la vellosidad (flecha blanca), consistente con su localización en la membrana apical del enterocito.

1.1.4.2. MRP2 intestinal. Localización y función

En lo que respecta a su localización a nivel intestinal, MRP2 se localiza en la membrana apical (conocida como BBM) del enterocito maduro, presentando máxima expresión en las células de la punta de la vellosidad con un patrón decreciente hacia las células de la cripta (ver Figura 1.3b). La expresión a lo largo del tracto intestinal también fue estudiada, observándose máximo contenido de MRP2 en yeyuno proximal, el cual decrece hacia el íleon (Mottino y col., 2000). Si bien estos estudios han sido realizados en rata, posteriormente se demostró que la distribución en humanos sigue un patrón similar (Nakamura y col., 2002; Cao y col., 2006). Las enzimas de fase I y II se distribuyen en forma similar a MRP2, evidenciando una acción coordinada entre las tres fases para eliminar compuestos hacia la luz intestinal (Pinkus y col., 1977; Drozdzik y col., 2018).

La relevancia de MRP2 en la **restricción de la absorción de xenobióticos** desde la luz intestinal hacia la circulación sistémica fue demostrada mediante el uso de ratas TR⁻, congénitamente deficientes en este transportador, las cuales mostraron mayor absorción y acumulación tisular del carcinógeno dietario 2-amino-1-metil-6-fenilimidazol[4,5-b]piridina (PhIP) que ratas Wistar normales (Dietrich y col., 2001). De forma similar, en estudios utilizando células intestinales Caco-2, el uso de inhibidores de MRP2 fue capaz de aumentar la absorción de otro compuesto de relevancia toxicológica como la micotoxina ocratoxina A (Berger y col., 2003; Schrickx y col., 2006). El uso de ratas deficientes en MRP2 también permitió establecer el rol de MRP2 intestinal en la **depuración de xenobióticos incorporados en forma sistémica**. Luego de la administración intravenosa a estos animales de 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB) se observó

una disminución en la excreción intestinal de su metabolito conjugado 2,4-dinitrofenil-S-glutation (DNP-SG) en comparación con ratas normales (Gotoh y col., 2000). Esta función de MRP2 fue verificada en nuestro laboratorio utilizando ratas con expresión de MRP2 aumentada en respuesta a la hormona intestinotrófica GLP-2 (del inglés *Glucagon-Like Peptide-2*, un protagonista clave de este trabajo de tesis que será presentado más adelante en este capítulo). Estos animales exhibieron un incremento en la excreción intestinal de DNP-SG luego de una dosis intravenosa de CDNB comparado con ratas controles, confirmando la capacidad de MRP2 intestinal de eliminar xenobióticos de la circulación general (Villanueva y col., 2012).

1.1.4.3. MRP2 intestinal. Regulación de su actividad

La actividad de MRP2 intestinal (y por consiguiente las funciones que acabamos de describir) puede ser regulada a través de mecanismos que: i) involucran cambios en la expresión proteica; ii) no modifican la cantidad total del transportador. Dentro de la primera categoría se incluyen la modulación de la expresión tanto por mecanismos transcripcionales como por mecanismos postrcripcionales. Los mecanismos transcripcionales implican cambios en la tasa de síntesis de mRNA debido a cambios en la actividad del promotor de MRP2. Por el contrario, los mecanismos postrcripcionales se definen como procesos regulatorios que no implican cambios en la tasa de síntesis de mRNA. Cualquiera de ellos puede activarse por acción de una amplia variedad de xenobióticos así como también por diversos factores fisiológicos y fisiopatológicos (para una revisión detallada sobre este tema ver Tocchetti y col., 2016 y Arana y col., 2016).

Los mecanismos que regulan la actividad de MRP2 intestinal sin modificar su expresión proteica son menos conocidos. Uno de ellos consiste en la interacción directa del agente modulador (por ejemplo, un xenobiótico) con la molécula de MRP2. Según algunos autores, esta molécula presenta dos sitios de unión a ligando: uno desde donde el sustrato es transportado (sitio S) y otro que modula la afinidad del sustrato por el sitio de transporte (sitio M). Un agente modulador puede unirse a cualquiera de estos dos sitios para modificar la actividad de transporte. En el caso de unión al sitio S, se trata de una inhibición competitiva y resulta en una disminución en el transporte del sustrato con menor afinidad (Keppler y König, 1997). De esta manera, un agente modulador de alta afinidad por el sitio S será inhibidor de un sustrato de baja afinidad. Tal es el caso de la indometacina, capaz de inhibir el transporte de colchicina, fluvastatina y sulfosalazina (Lindahl y col., 2004; El-Sheikh y col., 2006; Dahan y col., 2009). En el caso de la unión al sitio M se trata de un efecto no competitivo, pudiendo resultar en aumento o disminución del transporte del sustrato. El ejemplo más conocido e interesante es el del probenecid, ya que dependiendo del sustrato puede actuar como activador (estradiol-17 β -D-glucurónido) o como inhibidor (metotrexato, DNP-SG) de MRP2. Finalmente, la interacción podría tener lugar a nivel de los dominios de unión a ATP afectando la actividad ATPasa del transportador; tal es el caso de compuestos pertenecientes a la gran familia de los flavonoides (Di Pietro y col., 2002). Para un abordaje más profundo sobre esta regulación alostérica se recomienda recurrir al trabajo de Zelcer y col. (2003).

Otro mecanismo capaz de afectar la actividad de MRP2 sin cambios en la expresión total de la proteína consiste en modificaciones en la localización del transportador como consecuencia de un intercambio dinámico entre la membrana apical y compartimientos subapicales (ver Figura 2.1 en el próximo capítulo). Este proceso rápido y reversible ha sido extensamente estudiado en hígado, siendo regulado por diversos factores fisiológicos y fisiopatológicos (Roma y col., 2008; Crocenzi y col., 2012). En intestino, por el contrario, ha sido escasamente estudiado. La información existente se restringe al trabajo de Nakano y col. (2009), quienes utilizando sacos intestinales evertidos demostraron que MRP2 puede ser internalizada en respuesta a la activación de proteinquinasas C de tipo clásicas, conduciendo a una disminución en su actividad de transporte. Este efecto fue asociado a una alteración en el estado de fosforilación de ezrina, una proteína responsable del anclaje de MRP2 al citoesqueleto de actina.

1.1.5. Péptido tipo glucagon-2 (GLP-2)

1.1.5.1. Generalidades

GLP-2 es un péptido de 33 aminoácidos producido en las células L intestinales a partir del clivaje enzimático de su precursor proteico proglucagon. Este precursor de 160 aminoácidos es capaz de dar lugar a diferentes péptidos biológicamente activos a través de un procesamiento postraduccional tejido-específico. En intestino, este clivaje es catalizado por la enzima prohormona convertasa 1/3 dando lugar a GLP-1, GLP-2, péptido interviniente 2 y glicentina

(que a la vez puede convertirse en oxintomodulina y péptido pancreático relacionado a la glicentina) (Dubé y Brubaker, 2004).

Las células L intestinales están localizadas en el epitelio de yeyuno, íleon y colon (Eissele y col., 1992) y secretan GLP-2 en respuesta a la ingesta de nutrientes a través de mecanismos directos e indirectos. El mecanismo indirecto involucra factores endocrinos y activación del nervio vago por parte de los nutrientes a nivel del duodeno, resultando en activación de células L dependiente de receptores muscarínicos (Anini y Brubaker, 2003). Por su parte, el mecanismo directo está mediado por el contacto directo de los nutrientes con las células L desde el lado luminal (Xiao y col., 1999; Jakubov y col., 2011), un efecto dependiente de la composición específica de la dieta, con claras diferencias en la respuesta a carbohidratos, lípidos y proteínas (Dubé y Brubaker, 2004). En conjunto, estas vías contribuyen a la formación de un patrón bifásico de secreción de GLP-2 luego de la ingesta. Tras su liberación, GLP-2 está sujeto a la rápida acción proteolítica de la ubicua dipeptidilpeptidasa IV, resultando su vida media de unos 7 minutos (Hartmann y col., 2000). En el capítulo II abordaremos con mayor detalle aspectos de la secreción bifásica, así como también describiremos al receptor de GLP-2, su expresión altamente localizada y los complejos mecanismos moleculares subyacentes a las acciones que se presentan a continuación.

1.1.5.2. Funciones biológicas

GLP-2 fue inicialmente descrito por sus acciones intestinotróficas. El tratamiento con esta hormona fue capaz de aumentar la proliferación de las células epiteliales intestinales e inhibir su apoptosis, conduciendo a un aumento en la

profundidad de las criptas y en la altura de las vellosidades y, por ende, a un incremento en la superficie de absorción (Drucker y col., 1996; Tsai y col., 1997; Litvak y col., 1998). Interesantemente, estos efectos proliferativos resultaron ser específicos del epitelio intestinal, con ninguna señal de crecimiento sobre la capa muscular u otros órganos (Drucker y col., 1996; Benjamin y col., 2000). En paralelo con la hipertrofia e hiperplasia intestinal, el tratamiento con GLP-2 condujo a una mejora en las funciones de digestión y absorción (Brubaker y col., 1997; Cheeseman, 1997; Kato y col., 1999), así como también en la función de barrera intestinal al reducir la permeabilidad de marcadores de la vía paracelular como Na^+ y Cr-EDTA (Benjamin y col., 2000). Más recientemente se demostró que GLP-2 es capaz de producir un aumento rápido en el flujo sanguíneo intestinal (Guan y col., 2006; Stephens y col., 2006), constituyendo otro mecanismo favorecedor de la absorción.

Estas observaciones llevaron a considerar a GLP-2 un protagonista clave en el crecimiento intestinal adaptativo que ocurre durante o después de condiciones patológicas o iatrogénicas que afectan al órgano. Así, se detectó el rol protector y regenerativo de esta hormona en casos de endotoxemia, resección intestinal, enteritis inducida por antiinflamatorios no esteroideos, quimioterapia, isquemia vascular y síndrome de intestino corto (Jeppesen y col., 2001; Drucker, 2005; Arana y col., 2017). El teduglutide, un análogo de GLP-2 resistente a la degradación, se utiliza actualmente como tratamiento de esta última patología (Jeppesen y col., 2005; Kim y Keam, 2017). Por otra parte, GLP-2 resultó esencial en el crecimiento intestinal adaptativo que ocurre en respuesta a la realimentación por vía enteral luego de un período de privación de nutrientes

caracterizado por hipoplasia o atrofia intestinal (Chance y col., 1997; Shin y col., 2005).

La participación de GLP-2 en la transformación intestinal asociada a ciertas condiciones fisiológicas como el desarrollo o la lactancia también fue demostrada (Jacobs y col., 1981; Lovshin y col., 2000). En este último caso, el intestino delgado de la rata lactante aumenta en longitud, peso y altura de sus vellosidades (Fell y col., 1963; Cripps y Williams, 1975), representando una adaptación a la mayor demanda energética. Además, debido a que el incremento en la ingesta de alimentos trae aparejada una mayor llegada de compuestos potencialmente nocivos a la luz intestinal, se produce un aumento concomitante en la actividad de enzimas de fase II (Luquita y col., 1999) y en la expresión y actividad de MRP2 (Mottino y col., 2001) orientados a minimizar la absorción de tóxicos dietarios. Recientemente hemos probado que la administración subcutánea de GLP-2 a ratas hembra durante 5 días produce un aumento en la expresión y la actividad de MRP2 intestinal (Villanueva y col., 2010). Este trabajo no sólo convierte a GLP-2 en el mediador más probable de la inducción observada en ratas lactantes, sino que además constituye la primera evidencia a favor del rol regulador de esta hormona sobre la función de MRP2. Curiosamente, luego de 2 horas de tratamiento con GLP-2 se observó un incremento en los niveles de AMPc en homogenados de mucosa intestinal. Considerando que el tratamiento con un inhibidor selectivo de adenilato ciclasa previno no sólo dicho aumento sino también la inducción de MRP2 generada por GLP-2, se sugirió al AMPc como mediador de la regulación transcripcional del transportador.

1.2. Hipótesis

La hipótesis del presente trabajo de tesis está sustentada en tres evidencias experimentales: i) luego de la ingesta de ciertos nutrientes (como ácido oleico o glucosa) y por acción directa de los mismos sobre las células L intestinales se produce, tanto en humanos como en otros animales, una liberación de GLP-2 (Dubé y Brubaker, 2004); ii) GLP-2 es capaz de producir un aumento rápido en los niveles intracelulares de cAMP, evaluado en células intestinales de rata (Villanueva y col., 2010); iii) aumentos en los niveles intracelulares de cAMP han sido asociados a la inserción exocítica de MRP2 hacia la membrana apical en diferentes modelos hepáticos de rata (Roelofsen y col., 1998; Mottino y col., 2002; Mottino y col., 2005). Teniendo en cuenta todo lo anterior, hipotetizamos que los nutrientes presentes en la dieta son capaces de, una vez presentes en la luz intestinal, estimular la liberación de GLP-2. Esta hormona es capaz de producir (presumiblemente de forma indirecta) un aumento en los niveles intracelulares de cAMP en el enterocito. Finalmente, cAMP aumenta la inserción exocítica de MRP2, incrementando la densidad de este transportador en la membrana apical y así su actividad de transporte. De verificarse la presente hipótesis, este mecanismo fisiológico, el cual consideramos totalmente novedoso, constituiría un fenómeno de regulación rápida de la barrera transcelular asociada a MRP2 que permitiría protegernos contra la absorción de compuestos tóxicos presentes en la dieta durante períodos de ingesta. Por otra parte, la internalización del transportador durante períodos de ayuno permitiría ahorrar energía y sustratos valiosos para la célula como glutatión y compuestos proinflamatorios.

CAPÍTULO 2 – La actividad de MRP2 en intestino de rata puede regularse de forma aguda a través de cambios de localización entre dominios apicales y dominios intracelulares.

2.1. Objetivo

El primer objetivo del presente trabajo de tesis fue evaluar si la localización y la actividad de MRP2 son regulables de forma rápida en intestino de rata. Para ello utilizamos dos agentes reconocidos por sus efectos agudos y contrapuestos en hígado: estradiol-17 β -D-glucurónido (E₂17G) como agente proendocítico y dibutiril-cAMP (dbcAMP, del inglés *dibuteryl cyclic Adenosine MonoPhosphate*) como agente proinsertor. Adicionalmente, evaluamos la participación de la proteinquinasa C de tipo clásica (cPKC, del inglés *classic Protein Kinase C*) y de la proteinquinasa dependiente de cAMP (PKA, del inglés *cAMP-dependent Protein Kinase*) en los efectos de E₂17G y dbcAMP, respectivamente.

2.2. Introducción

Si bien existen escasos antecedentes en intestino, se sabe que MRP2 puede regularse en hígado a través de un mecanismo fisiológico que implica cambios reversibles y transitorios en su localización subcelular. Estos procesos de internalización e inserción mediados por vesículas e ilustrados en la Figura 2.1 permiten modular rápidamente la densidad de la proteína en la membrana apical y, en última instancia, la capacidad total de esa célula para transportar activamente sustratos de MRP2 (Crocenzi y col., 2012).

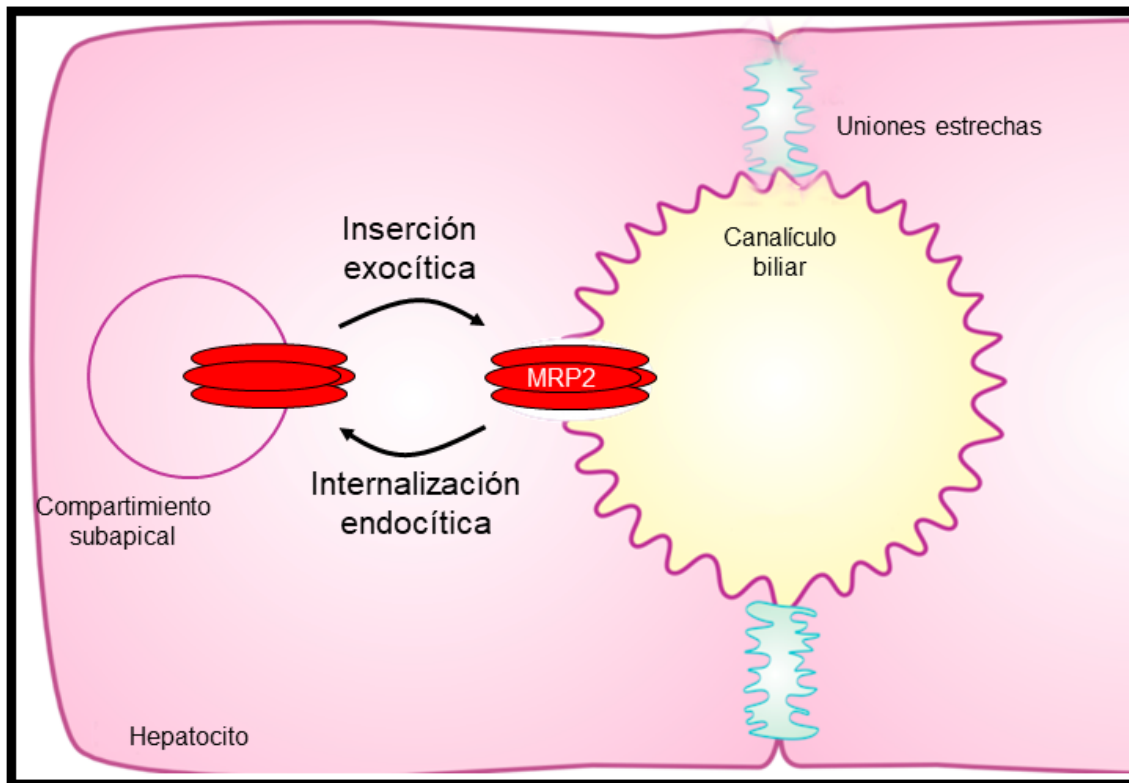


Figura 2.1. Regulación de la actividad de MRP2 a través de cambios en su localización. La densidad de transportador en la membrana apical (y por ende la capacidad para transportar activamente solutos fuera de la célula) está regulada por el balance entre los procesos de inserción/internalización desde/hacia un compartimento subapical, el cual sirve como reservorio de MRP2 disponible a demanda. Este fenómeno altamente regulado ha sido caracterizado en diferentes modelos hepáticos pero al momento no ha sido demostrado en intestino.

Un ejemplo que ilustra la rapidez y reversibilidad de este fenómeno es la colestasis experimental producida por el metabolito endógeno del estradiol E₂17G. Una inyección única de este compuesto es capaz de inducir una caída rápida y dosis-dependiente del flujo biliar, el cual alcanza un valor mínimo a los 20 minutos. A partir de ese momento, el flujo biliar comienza a recuperarse espontáneamente alcanzando niveles normales a los 120 minutos. La primera fase, colestásica, está asociada a internalización endocítica de MRP2, efecto demostrado tanto en hígado (Mottino y col., 2002) como en duplas aisladas de hepatocitos de rata, modelo en el cual se confirmó la mediación de cPKC

(Crocenzi y col., 2008). La segunda fase, de recuperación, está asociada a la reinsertión del transportador en la membrana apical, proceso mediado por cAMP.

Tanto cAMP como su análogo permeable dbcAMP fueron los primeros agentes reportados capaces de estimular la inserción exocítica de MRP2. Este proceso fue descrito en duplas de hepatocitos y estuvo acompañado de un aumento en la actividad de transporte (Roelofsen y col., 1998). Además, dbcAMP actuó como agente preventivo de la endocitosis de MRP2 inducida por E₂17G (Mottino y col., 2002), taurolitocolato (Miszczuk y col., 2015) y estrés oxidativo. En este último caso, el efecto fue mediado por PKA (Sekine y col., 2008).

La existencia de este intercambio dinámico de MRP2 entre BBM y compartimientos subapicales a nivel intestinal nunca ha sido demostrada. El uso de E₂17G y dbcAMP, de eficacia probada en nuestro laboratorio como promotores de internalización e inserción de MRP2 hepática, será crucial para dilucidar si este proceso ocurre también en intestino y si, además, la actividad de transporte está condicionada por esta regulación. Adicionalmente, evaluaremos el rol de cPKC y PKA. Para estos objetivos utilizamos el modelo de sacos intestinales de rata, administrando E₂17G del lado luminal y dbcAMP del lado seroso para simular la situación *in vivo* en la que el E₂17G es excretado por vía biliar a la luz intestinal y en la que el cAMP interviene como mediador de la acción de hormonas actuando desde el polo basolateral.

2.3. Materiales y métodos

2.3.1. Reactivos

E₂17G, dbcAMP, MK571, Gö6976, H89, CDNB, leupeptina, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), pepstatina A y dimetilsulfóxido (DMSO) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Missouri, Estados Unidos). KT5720 se adquirió en Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Estados Unidos). DNP-SG fue sintetizado utilizando 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno y glutation según Sokolovsky y col. (1964). Los restantes reactivos fueron del máximo grado analítico disponible comercialmente.

2.3.2. Animales y recolección de muestras

Se utilizaron ratas Wistar macho adultas (310-330 g) provistas por el Centro de Medicina Comparada (UNL-CONICET, Esperanza, Argentina), las cuales fueron mantenidas con dieta estándar y agua corriente *ad libitum* en una habitación con temperatura y humedad controladas y un ciclo 12-12 horas de luz-oscuridad. Las ratas fueron previamente ayunadas durante 12 horas y, al momento de los experimentos, anestesiadas con una mezcla de ketamina y xilazina (ketamina: 100 mg/kg peso corporal; xilazina: 15 mg/kg peso corporal; vía intraperitoneal) y exanguinadas por punción cardíaca. El yeyuno proximal (alrededor de 32 cm de longitud) fue removido, lavado interna y externamente con solución fisiológica helada y dividido en 8 segmentos (aproximadamente de 4 cm cada uno). Para la determinación de localización de MRP2 por fraccionamiento de membranas seguido de western blot (sección 2.3.5) se utilizaron sacos no evertidos, mientras

que para los experimentos de actividad se utilizaron sacos evertidos (sección 2.3.3).

Todos los procedimientos que involucraron animales se realizaron siguiendo tanto la Guía para el Uso y Cuidado de los Animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de la Salud de los Estados Unidos (National Research Council [Estados Unidos], 2011) como el Reglamento sobre uso y manejo de animales de laboratorio aprobado por el Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario (Resol. C.D. N° 267/02). A su vez, los protocolos experimentales han sido aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la mencionada institución.

2.3.3. Estudios de actividad de MRP2

La evaluación de la actividad de MRP2 en sacos intestinales evertidos fue realizada según lo descrito por Mottino y col. (2001) con modificaciones menores. El modelo de sacos intestinales evertidos fue elegido debido a que permite tomar muestras del compartimiento mucoso a diferentes tiempos de incubación (Figura 2.2).

Para estudiar el efecto de dbcAMP sobre la actividad de transporte de MRP2, los sacos intestinales evertidos fueron llenados (compartimiento seroso) con KHB conteniendo dbcAMP 100 μ M e inmersos en el compartimiento mucoso, consistente en 7 mL de KHB. Luego de 30 minutos de incubación a 37 °C, se agregó CDNB (precursor del sustrato de MRP2 DNP-SG) al compartimiento mucoso a una concentración de 100 μ M y se incubó durante otros 15 minutos.

De este mismo compartimiento se tomaron alícuotas a 0, 5, 10 y 15 minutos. A continuación, los sacos intestinales fueron secados y pesados. Además, se realizaron experimentos idénticos pero con el agregado de MK571 20 μM (inhibidor de MRP) junto a CDNB (Lindenmaier y col., 2005).

Para estudiar el efecto de E₂17G sobre la actividad de transporte de MRP2, los sacos intestinales evertidos fueron llenados (compartimiento seroso) con KHB e inmersos en el compartimiento mucoso, consistente en 7 mL de KHB conteniendo E₂17G 400 μM . Luego de 30 minutos de incubación a 37 °C, se agregó CDNB al compartimiento mucoso a una concentración de 100 μM y se incubó durante otros 15 minutos. De este mismo compartimiento se tomaron alícuotas a 0, 5, 10 y 15 minutos. Los experimentos se repitieron pero con el agregado de MK571 20 μM al compartimiento mucoso al mismo momento de la incorporación del CDNB (ver Figura 2.2).

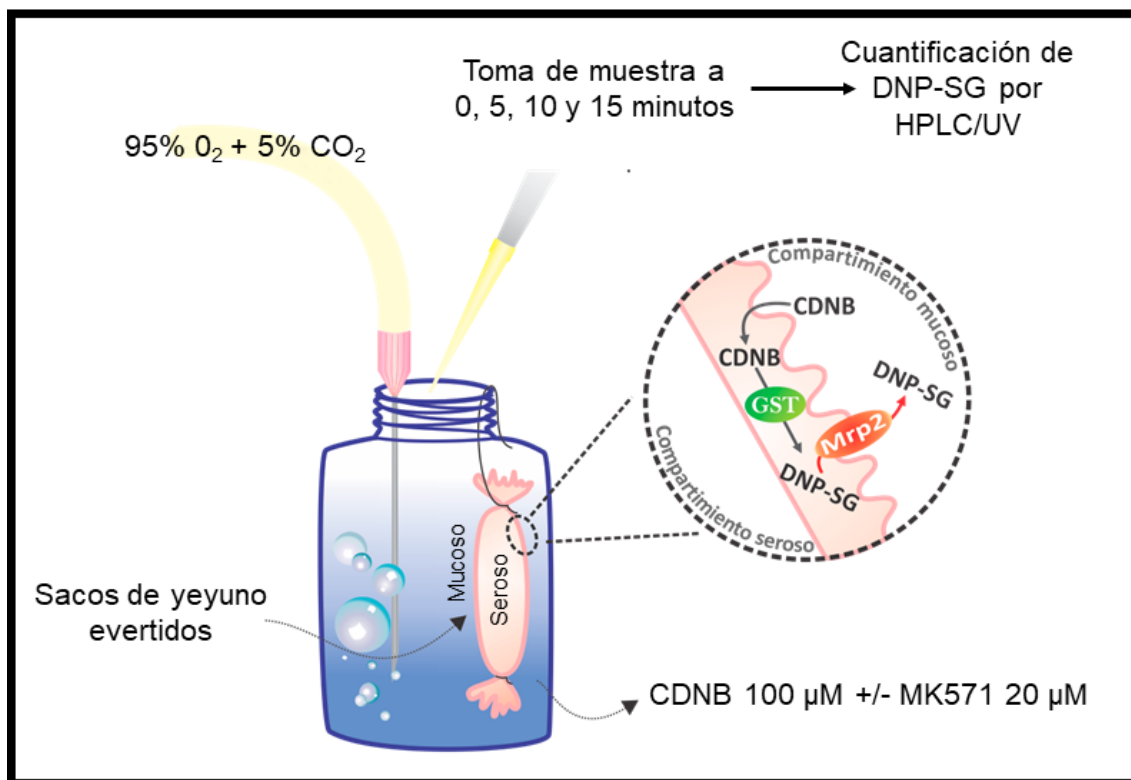


Figura 2.2. Estudios de actividad de MRP2 utilizando sacos intestinales evertidos. Luego de los tratamientos agudos con dbcAMP o E₂17G, los sacos se incubaron en viales de vidrio conteniendo 7 mL de CDNB 100 μM en KHB (compartimiento mucoso), en presencia o ausencia del inhibidor de MRPs MK571. El sustrato de MRP2 DNP-SG se cuantificó en muestras de este mismo compartimento tomadas cada 5 minutos.

Todas las alícuotas recolectadas fueron desproteinizadas y sometidas a cuantificación de DNP-SG y su derivado dinitrofenil-cisteinil glicina (DNP-CG) por HPLC usando un equipo Waters600 (Waters, Milford, Estados Unidos) equipado con una columna C18 (Luna 5 μ, Phenomenex, Torrance, Estados Unidos). La elución isocrática se realizó utilizando una fase móvil de acetonitrilo y ácido ortofosfórico 0,1% V/V (1:3) a un flujo de 1 mL/minuto. La detección se realizó espectrofotométricamente a 365 nm, mientras que la cuantificación se realizó en base al área de los picos (Tocchetti y col., 2018a). DNP-CG es producido por acción de la γ -glutamyltransferasa de la BBM sobre DNP-SG luego de que este

compuesto alcanza el compartimiento mucoso (Hinchman y col., 1991). Por consiguiente, la tasa de excreción de DNP-SG + DNP-CG estima adecuadamente la actividad de MRP2.

2.3.4. Inmunomarcación seguida de microscopía confocal

Para detectar la localización de MRP2, los segmentos de intestino tratados se lavaron cuidadosamente y se congelaron en 1,1,1,2-tetrafluoroetano líquido (Electroquímica DELTA SRL, Buenos Aires, Argentina). Inmediatamente después fueron cortados en láminas de 5 µm de espesor con un micrótopo criostático (HM 500, Microm International GmbH, Walldorf, Alemania), las cuales fueron colocadas en portaobjetos. Para la fijación, los portaobjetos se sumergieron en metanol durante 10 minutos a -20 °C y luego se dejaron secar a temperatura ambiente. Luego de 3 lavados de 5 minutos cada uno con TBS (del inglés *Tris-Buffered Saline*; Tris/HCl 0,1 M pH = 7,60, NaCl 0,15 M) se permeabilizó y bloqueó el preparado en un único paso, incubándolo durante 15 minutos en buffer de permeabilización y bloqueo (albúmina sérica bovina 3% P/V, Tritón X-100 0,1% V/V en TBS). A continuación, se agregó una mezcla de dos anticuerpos primarios: anti-MRP2: M2III-6 (1:100) de Enzo Life Sciences (Farmingdale, Estados Unidos) y anti-ZO-1 policlonal (1:30) de Invitrogen (Illinois, Estados Unidos) y se incubó durante toda la noche en cámara húmeda a 4 °C. Después de lavar 3 veces durante 5 minutos con Tween 20 0,3% V/V en TBS, se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, con agitación constante y al abrigo de la luz con una mezcla de dos anticuerpos secundarios: anti-IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor 488 (1:300) y anti-IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor 555 (1:300), ambos de ThermoScientific (Illinois, Estados Unidos).

Para la marcación de los núcleos, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno y se incubó con Hoechst 33258 (1:400 en TBS) de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Estados Unidos) durante 10 minutos. Finalmente, los preparados se lavaron 3 veces y se montaron con ProLong (ThermoScientific, Illinois, Estados Unidos). Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio invertido Nikon TE2000 combinado a un sistema confocal Nikon C1+ usando el programa EZ-C1 (Nikon Instruments, Melville, Estados Unidos). Se utilizó el objetivo Plan Apo 60x (apertura numérica 1.4).

Una vez obtenidas al menos 8 imágenes por grupo, se realizó un estudio densitométrico utilizando el programa ImageJ (NIH, Bethesda, Estados Unidos) con el objetivo de establecer la distribución de MRP2 con respecto a los núcleos. Para ello se separaron los canales correspondientes a la fluorescencia roja de MRP2 y a la fluorescencia azul de los núcleos celulares y se evaluó para cada uno de ellos la distribución de la intensidad de fluorescencia a lo largo de una línea trazada de forma paralela al eje longitudinal del enterocito (ver Figura 2.3). Esta evaluación se repitió en 20 líneas diferentes por grupo, obteniendo así 20 curvas de intensidad de fluorescencia versus posición para cada canal. Las áreas totales bajo estas curvas se relativizaron a un 100% y se comparó el valor máximo de intensidad de fluorescencia de MRP2 entre los grupos. Los resultados se presentan en forma gráfica (Figura 2.5) luego de alinear a una misma posición los valores máximos de intensidad de fluorescencia de los núcleos, de forma de evidenciar posibles desplazamientos de la posición de MRP2 en respuesta a los tratamientos.

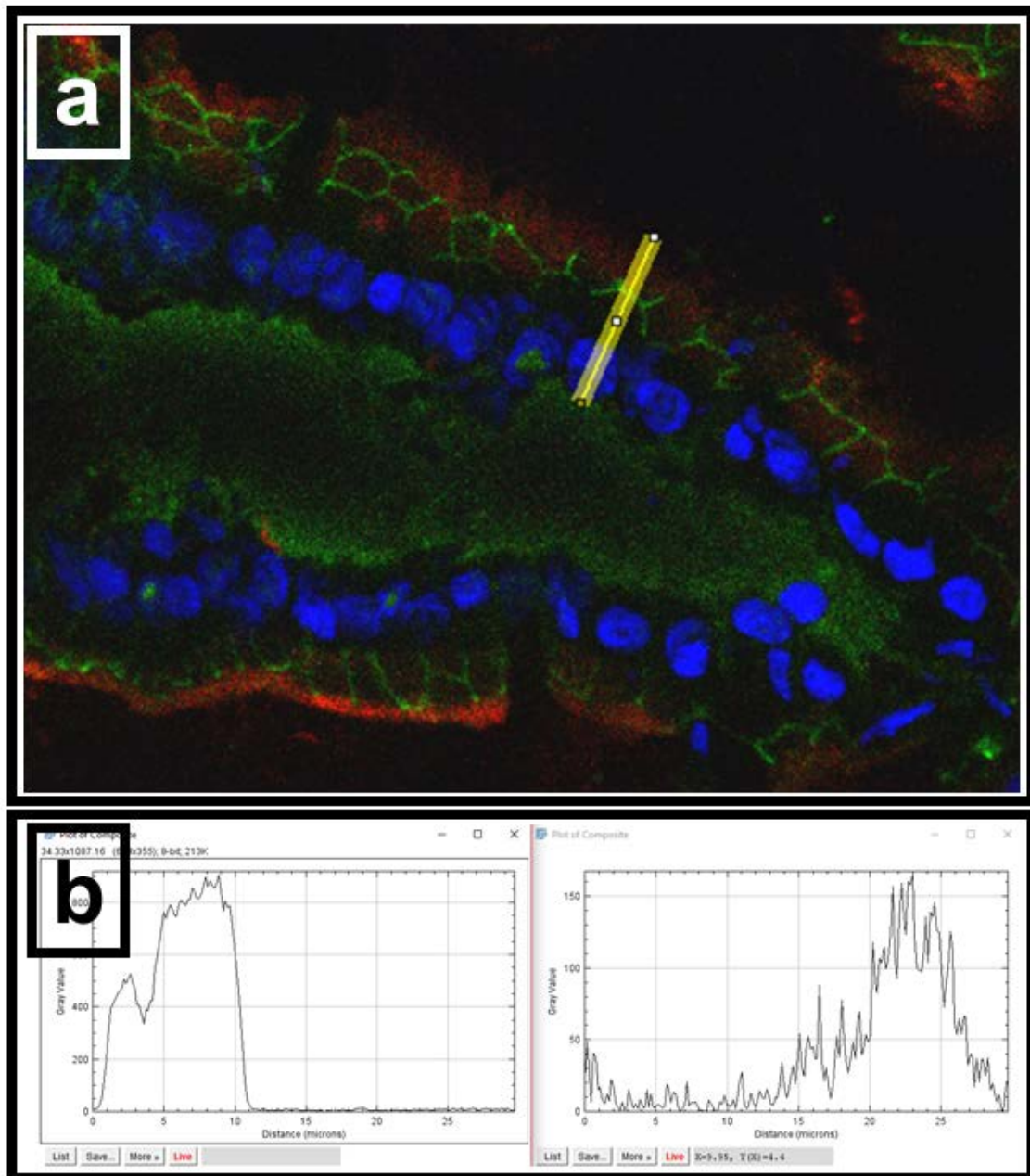


Figura 2.3. Obtención de datos densitométricos a partir de imágenes obtenidas por microscopía confocal utilizando el programa ImageJ. a. La distribución de la intensidad de fluorescencia se evaluó a lo largo de una línea de 30 µm de longitud paralela al eje longitudinal del enterocito. b. A continuación, se separaron y se graficaron los canales correspondientes a los núcleos (gráfica de la izquierda) y a MRP2 (gráfica de la derecha). Este procedimiento se repitió hasta obtener 20 pares de gráficas para cada grupo experimental.

2.3.5. Determinación de la distribución de MRP2 entre fracciones enriquecidas en BBM y en membranas intracelulares (MI).

Los efectos de dbcAMP y E₂17G fueron evaluados en forma individual y en combinación con el inhibidor de PKA KT5720 o el inhibidor de cPKC Gö6976, respectivamente.

Para evaluar el efecto de dbcAMP, segmentos intestinales no evertidos fueron llenados (compartimiento mucoso) con buffer Krebs-Henseleit (KHB; glucosa 40 mM, pH = 7,40) e inmersos en el compartimiento seroso, consistente en 7 mL de KHB solo (grupo control) o 7 mL de KHB conteniendo dbcAMP 100 µM (grupo dbcAMP), KT5720 1 µM (grupo KT) o dbcAMP 100 µM + KT5720 1 µM (grupo dbcAMP + KT). Los sacos intestinales fueron incubados durante 30 minutos a 37 °C. A los compartimientos mucosos correspondientes a los grupos KT y dbcAMP + KT se agregó además KT5720 1 µM. En todos los casos, el compartimiento externo (seroso) fue burbujeado continuamente con 95% O₂/5% CO₂. Se realizaron experimentos preliminares para demostrar la traslocación de MRP2 utilizando dbcAMP 10 y 100 µM. Debido a que la concentración de 10 µM no produjo ningún efecto (datos no mostrados), elegimos la concentración de 100 µM para todos los experimentos posteriores en sacos intestinales de rata. Esta concentración es idéntica a la utilizada en estudios previos demostrando la inserción de MRP2 inducida por cAMP en la membrana canalicular de hepatocitos de rata (Schonhoff y col., 2010).

Para evaluar el efecto de E₂17G, segmentos intestinales no evertidos fueron llenados (compartimiento mucoso) con KHB (glucosa 40 mM, pH = 7,40) solo

(grupo control) o con KHB conteniendo E₂17G 400 µM (grupo E₂17G), Gö6976 1 µM (grupo Gö) o E₂17G 400 µM + Gö6976 1 µM (grupo E₂17G + Gö). Los sacos intestinales fueron inmersos en 7 mL de KHB (compartimiento seroso) e incubados durante 30 minutos a 37 °C. A los compartimientos serosos correspondientes a los grupos Gö y E₂17G + Gö se agregó también Gö6976 1 µM. En todos los casos, el compartimiento externo (seroso) fue burbujeado continuamente con 95% O₂/5% CO₂. Se realizaron experimentos preliminares para demostrar la traslocación de MRP2 utilizando E₂17G 100, 200 y 400 µM. La concentración de 100 µM no produjo ningún efecto, mientras que 200 µM produjo efectos leves que no fueron estadísticamente significativos (datos no mostrados). En consecuencia, elegimos la concentración de 400 µM para todos los experimentos posteriores en sacos intestinales de rata.

Al final de las incubaciones, los sacos intestinales fueron lavados con solución fisiológica helada y abiertos longitudinalmente. Luego de remover cuidadosamente la capa de mucus con papel de filtro, se obtuvo la mucosa por raspado con portaobjetos de vidrio. A partir de las muestras de mucosa se obtuvieron homogenados totales utilizando un buffer manitol 50 mM, Tris 2 mM, pH = 7,10 suplementado con inhibidores de proteasas (leupeptina 25 mg/mL, PMSF 40 mg/mL y pepstatina A 0,5 mg/mL) en una relación 2 mL buffer por cada 100 mg de mucosa, tal como se describió previamente (Mottino y col., 2000). Las fracciones BBM se obtuvieron a partir de los homogenados totales usando un método de precipitación con Ca²⁺ (Kessler y col., 1978) con algunas modificaciones (Mottino y col., 2000). Brevemente, los homogenados totales fueron incubados con CaCl₂ durante 15 minutos y luego sometidos a

centrifugación diferencial (15 minutos a 3000 g, 4 °C y 40 minutos a 27000 g, 4 °C). Para obtener la fracción MI, el último sobrenadante fue centrifugado a 100000 g durante 60 minutos, 4 °C tal como hicieron Kubitz y col. (2005) para preparar MI a partir de tejido hepático. El sedimento (MI) fue resuspendido en volúmenes apropiados de buffer manitol 300 mM, HEPES 10 mM, Tris 10 mM, pH = 7,50 suplementado con inhibidores de proteasas. Las preparaciones fueron sometidas a determinación de concentración de proteínas (Bradford, 1976) y usadas inmediatamente para estudios de western blot.

2.3.6. Estudios de western blot

Una vez preparadas, las fracciones BBM y MI fueron usadas inmediatamente en estudios de western blot. En primer lugar se realizó la separación electroforética de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE, del inglés *Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) según Laemmli (1970). Las composiciones de los geles se detallan en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1: Composición de los geles de separación y de concentración utilizados en SDS-PAGE.

	Gel separación 8%	Gel de concentración
Tris/HCl 1,5M, pH = 8,80	1,05 mL	-
Tris/HCl 0,5M, pH = 6,80	-	0,5 mL
SDS 10%	42 µL	40 µL
Acrilamida/Bis 30%	1,1 mL	0,4 mL
Agua	1,9 mL	2,45 mL
TEMED	2,1 µL	3 µL
Persulfato de amonio 10%	63 µL	60 µL

Las muestras a sembrar se prepararon en un buffer de siembra conteniendo Tris/HCl 1 M pH = 6,80, SDS 10% P/V, azul de bromofenol 0,005% P/V, glicerol

10% P/V y ditiotreitól 10% V/V. Los volúmenes de muestra sembrados correspondieron a 10 µg de proteínas totales.

Los geles se corrieron en buffer Laemmli (Tris 25 mM, glicina 0,2 M, SDS 0,1% P/V) en un equipo Mini-PROTEAN 3 Cell (Bio-Rad, California, Estados Unidos) en condiciones de voltaje constante: 110 V durante los primeros 15 minutos y 150 V hasta completar la corrida. Inmediatamente después, se realizó la transferencia de las proteínas desde el gel a membranas de fluoruro de polivinilideno (Amersham Biosciences, California, Estados Unidos) en buffer de transferencia (Tris 20 mM, glicina 150 mM, SDS 0,03% P/V, metanol 20% V/V) durante 70 minutos a 4°C e intensidad de corriente constante: 0,36 A. Para tal fin se utilizó un equipo MiniTrans-Blot Cell (Bio-Rad, California, Estados Unidos).

Una vez finalizada la transferencia, las membranas se bloquearon durante 1 hora en buffer de bloqueo (albúmina sérica bovina 3% P/V, Tween 20 0,3% V/V en buffer fosfato salino [PBS, del inglés *Phosphate Buffered Saline*]) y se incubaron con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4 °C. A continuación, se realizaron 6 lavados de 5 minutos cada uno con buffer de lavado (Tween 20 0,3% V/V en PBS) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el correspondiente anticuerpo secundario. Luego de 6 lavados de 5 minutos cada uno, las bandas inmunorreactivas fueron detectadas utilizando un kit de quimioluminiscencia (Pierce ECL Western Blotting Substrate, ThermoScientific, Illinois, Estados Unidos) según las instrucciones del fabricante y cuantificadas utilizando el programa ImageJ (NIH, Bethesda, Estados Unidos). La proteína β-actina fue utilizada como control de carga. La uniformidad de carga y transferencia también fue chequeada a través de tinción con Ponceau S. Los

anticuerpos primarios utilizados en esta parte del trabajo fueron los siguientes: anti-MRP2: M2III-6 (1:1000) de Enzo Life Sciences (Farmingdale, Estados Unidos); anti-villina: H-60 (1:1000) de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Estados Unidos) y anti- β -actina: AC-74 (1:5000) de Sigma-Aldrich (Missouri, Estados Unidos). Los anticuerpos secundarios fueron: anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rabanita (1:5000) y anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rabanita (1:5000), ambos de ThermoScientific (Illinois, Estados Unidos).

2.3.7. Análisis estadístico

Todos los resultados se expresaron como promedio \pm desviación estándar. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas a través del test t de Student (dos grupos experimentales) o a través de ANOVA seguido de Tukey (más de dos grupos experimentales). La significación estadística se estableció en $p < 0,05$.

2.4. Resultados

2.4.1. Modulación de la actividad de MRP2 en sacos intestinales de rata

En primer lugar, evaluamos el efecto de E₂17G y dbcAMP sobre la actividad de MRP2 cuantificando el eflujo del sustrato modelo DNP-SG. La Figura 2.4a muestra que el tratamiento con dbcAMP (100 μ M, 30 minutos) condujo a un aumento en la acumulación de DNP-SG en el compartimiento mucoso, el cual alcanzó significancia estadística a los 10 y a los 15 minutos. El aumento fue de un 33% sobre el grupo control cuando se expresa como cantidad de DNP-SG acumulada luego de 15 minutos de incubación (Figura 2.4b). Por el contrario, el tratamiento agudo con E₂17G (400 μ M, 30 minutos) disminuyó significativamente

la acumulación de DNP-SG en el compartimiento mucoso a todos los tiempos evaluados (Figura 2.4a). Esto puede visualizarse claramente luego de analizar la cantidad de DNP-SG acumulada luego de 15 minutos (Figura 2.4b), la cual disminuyó un 38% con respecto al grupo control. La actividad de transporte también fue evaluada en estos mismos grupos en presencia del inhibidor de MRPs MK571. El descenso significativo en la actividad de transporte detectado en todos los grupos con MK571 en comparación con la actividad de transporte en ausencia del inhibidor confirma que una proteína MRP está involucrada en la secreción de DNP-SG en condiciones normales y de tratamiento (Figura 2.4b).

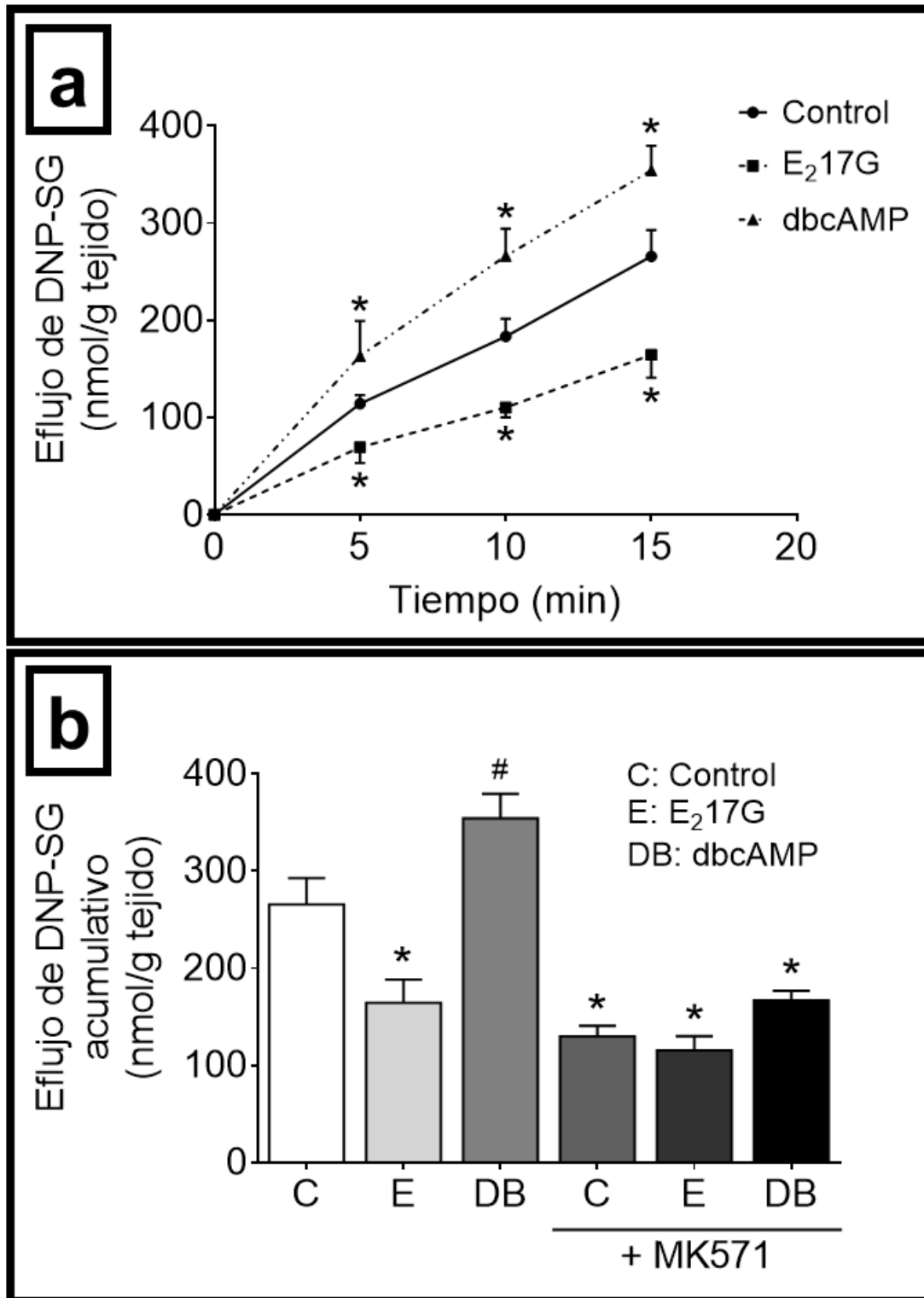


Figura 2.4. Modulación de la actividad de MRP2 por E₂17G y dbcAMP en sacos intestinales aislados de rata. Se muestran tanto el eflujo de DNP-SG hacia el compartimiento mucoso en función del tiempo (a) como su acumulación en el mismo compartimiento luego de 15 minutos de incubación (b). El efecto del inhibidor de MRPs MK571 se muestra en b. Los datos están expresados como promedio \pm desviación estándar ($n = 4$). *Diferente del grupo control, $p < 0,05$. #Diferente de todos los grupos restantes, $p < 0,05$.

2.4.2. Detección de cambios en la localización de MRP2 por microscopía confocal cuantitativa

A continuación, evaluamos la posibilidad de que los cambios en la actividad recientemente descritos estén acompañados de cambios en la localización subcelular de MRP2 entre BBM y membranas intracelulares. Para este objetivo se utilizó la técnica de inmunomarcación seguida de microscopía confocal cuantitativa en cortes de intestino. En la Figura 2.5 (primera fila) se muestran imágenes con detección fluorescente de MRP2 en rojo, ZO-1 en verde y núcleos en azul para los grupos control, E₂17G y dbcAMP. Para mayor claridad, se incluyen además imágenes en escala de grises correspondientes exclusivamente al canal de MRP2 (segunda fila). El análisis densitométrico se presenta en forma de gráficas de intensidad de fluorescencia versus distancia (tercera fila). En los cortes correspondientes al grupo control, podemos observar que MRP2 se localiza tanto en la superficie apical de las células como en regiones intracelulares cercanas a ella. Luego de 30 minutos de tratamiento con E₂17G (400 μ M) se detectó una mayor presencia de MRP2 en regiones intracelulares a expensas de la existente en BBM, consistente con un proceso de internalización. En concordancia con este hallazgo de tipo cualitativo, se observó una disminución significativa en la altura del pico de la curva de intensidad de fluorescencia de MRP2 con respecto al grupo control (-28,9%, $p < 0,05$) con simultáneo ensanchamiento de la misma, sugiriendo una mayor dispersión del transportador a lo largo del eje longitudinal del enterocito. Por su parte, el tratamiento con dbcAMP (100 μ M, 30 minutos) produjo una concentración de la señal de MRP2 en la superficie apical del epitelio con

simultánea disminución en espacios intracelulares. El análisis cuantitativo arrojó un aumento significativo en la altura del pico de MRP2 respecto al grupo control (+81,9%, $p < 0,05$). En conjunto, estos datos sugieren un aumento en la inserción de MRP2 desde membranas intracelulares hacia BBM.

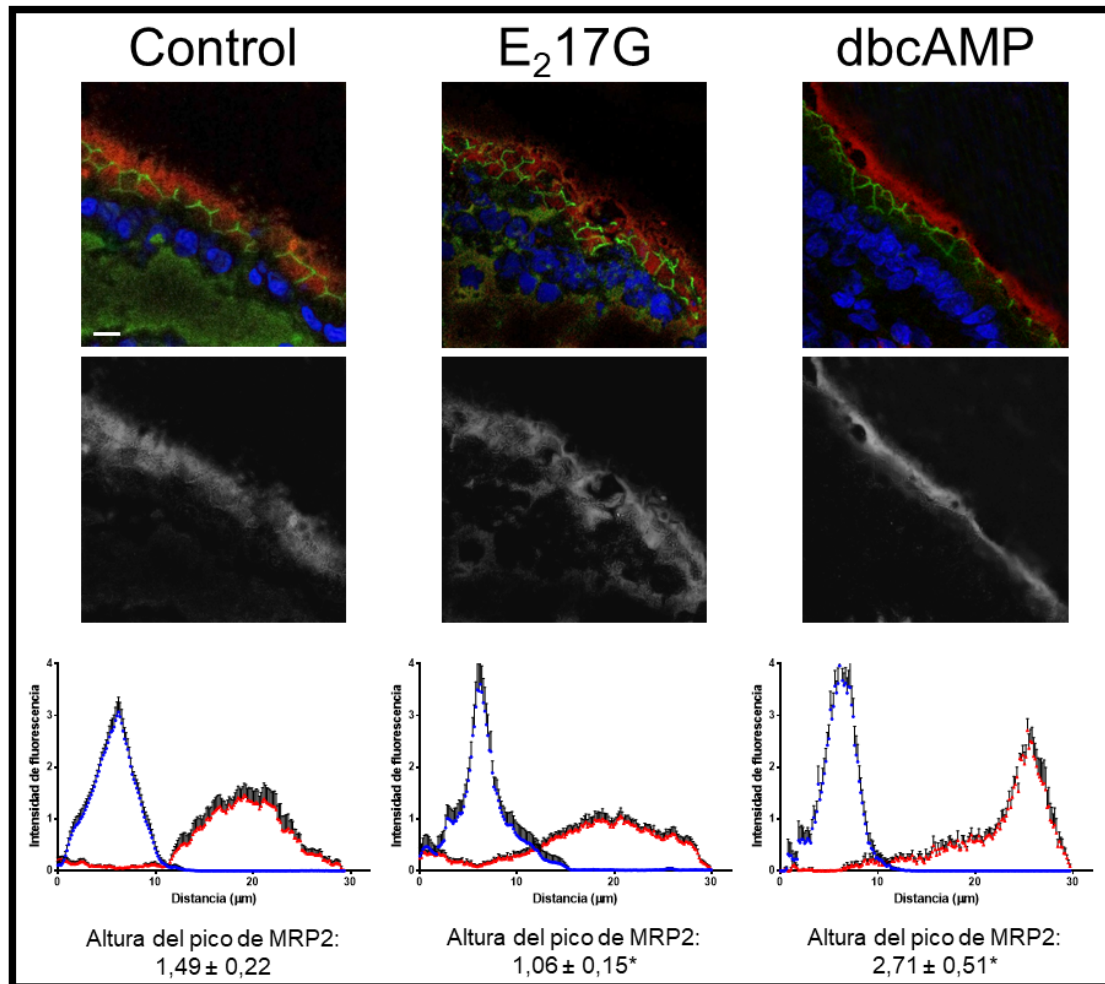


Figura 2.5. Localización de MRP2 en respuesta a E₂17G y dbcAMP. MRP2 fue marcada con fluorescencia roja y la proteína de uniones estrechas ZO-1 con fluorescencia verde. Los núcleos se tiñeron de azul con Hoechst 33258 (imágenes de la fila superior). Para mayor claridad, se incluyen imágenes en escala de grises mostrando únicamente el canal correspondiente a MRP2. La distribución de la intensidad de fluorescencia a lo largo de una barra de 30 μm fue evaluada para los canales rojo y azul ($n = 20$ por grupo). Para detectar cambios en la distribución de la curva correspondiente al canal rojo (MRP2), todas las áreas bajo la curva se igualaron a un mismo valor arbitrario y las curvas resultantes se alinearon usando el canal azul (núcleos) como referencia. Adicionalmente, la altura del pico correspondiente a MRP2 se calculó, se expresó como promedio \pm desviación estándar y se comparó entre grupos. * $p < 0,05$ vs. grupo control. La barra blanca de escala representa 10 μm.

2.4.3. Detección de cambios en localización de MRP2 por fraccionamiento de membranas seguido de western blot

A continuación, decidimos validar a través de otro método los resultados obtenidos por microscopía confocal en relación a la capacidad de E₂17G y dbcAMP para modificar la localización de MRP2. Partiendo de sacos intestinales tratados en forma aguda con estos agentes, obtuvimos fracciones enriquecidas en BBM y en MI, las cuales fueron sometidas a estudios de western blot para detección de MRP2. Sin embargo, como paso inicial decidimos caracterizar la distribución de MRP2 entre BBM y MI en condiciones normales. La Figura 2.6a muestra que MRP2 sigue un patrón de distribución similar al de villina, una proteína integral de la BBM de enterocitos maduros. Por el contrario, está presente en una cantidad mucho menor en la fracción MI, cuya naturaleza intracelular fue confirmada por el enriquecimiento en CYP3A4. Los datos sugieren fuertemente que MRP2 se recupera preferencialmente en la fracción de membrana apical, mientras que una fracción menor del transportador se encuentra en compartimientos intracelulares. Estos resultados concuerdan tanto con un estudio inmunohistoquímico previo que muestra una importante señal correspondiente a MRP2 en la superficie de las vellosidades de duodeno y yeyuno de rata (Mottino y col., 2000) como con otros estudios más detallados por microscopía confocal que demuestran localización de MRP2 en la membrana apical del enterocito, en cercanías de la proteína de uniones estrechas ZO-1 (Arias y col., 2009). En conjunto, los datos demuestran que este método de fraccionamiento parece ser apropiado para detectar cambios en la localización de MRP2. A continuación evaluamos el efecto de dbcAMP en la distribución de

MRP2 entre BBM y MI. La Figura 2.6b muestra un aumento en el contenido apical del transportador con respecto al grupo control y una disminución concomitante en la fracción MI, consistente con una traslocación rápida desde un compartimiento intracelular a la BBM. Considerando que dbcAMP es un activador directo de PKA, decidimos evaluar si esta quinasa está involucrada en la inserción de MRP2 usando el inhibidor selectivo KT5720. Como se muestra en la misma figura, el efecto de dbcAMP fue completamente suprimido por el inhibidor de PKA, confirmando la participación de un mecanismo PKA-dependiente. La Figura 2.6b también muestra que KT5720 solo no tuvo efecto en la distribución de MRP2.

En tercer y último lugar, evaluamos de la misma manera el efecto de E₂17G. La Figura 2.6c muestra que E₂17G produjo una disminución en el contenido de MRP2 en la fracción BBM con respecto al grupo control y un aumento concomitante en la fracción MI, consistente con una internalización endocítica del transportador. La endocitosis de MRP2 fue bloqueada por el inhibidor selectivo de cPKC Gö6976, confirmando la participación de esta quinasa en el efecto de E₂17G. La misma figura muestra que Gö6976 por sí mismo no afectó la localización de MRP2.

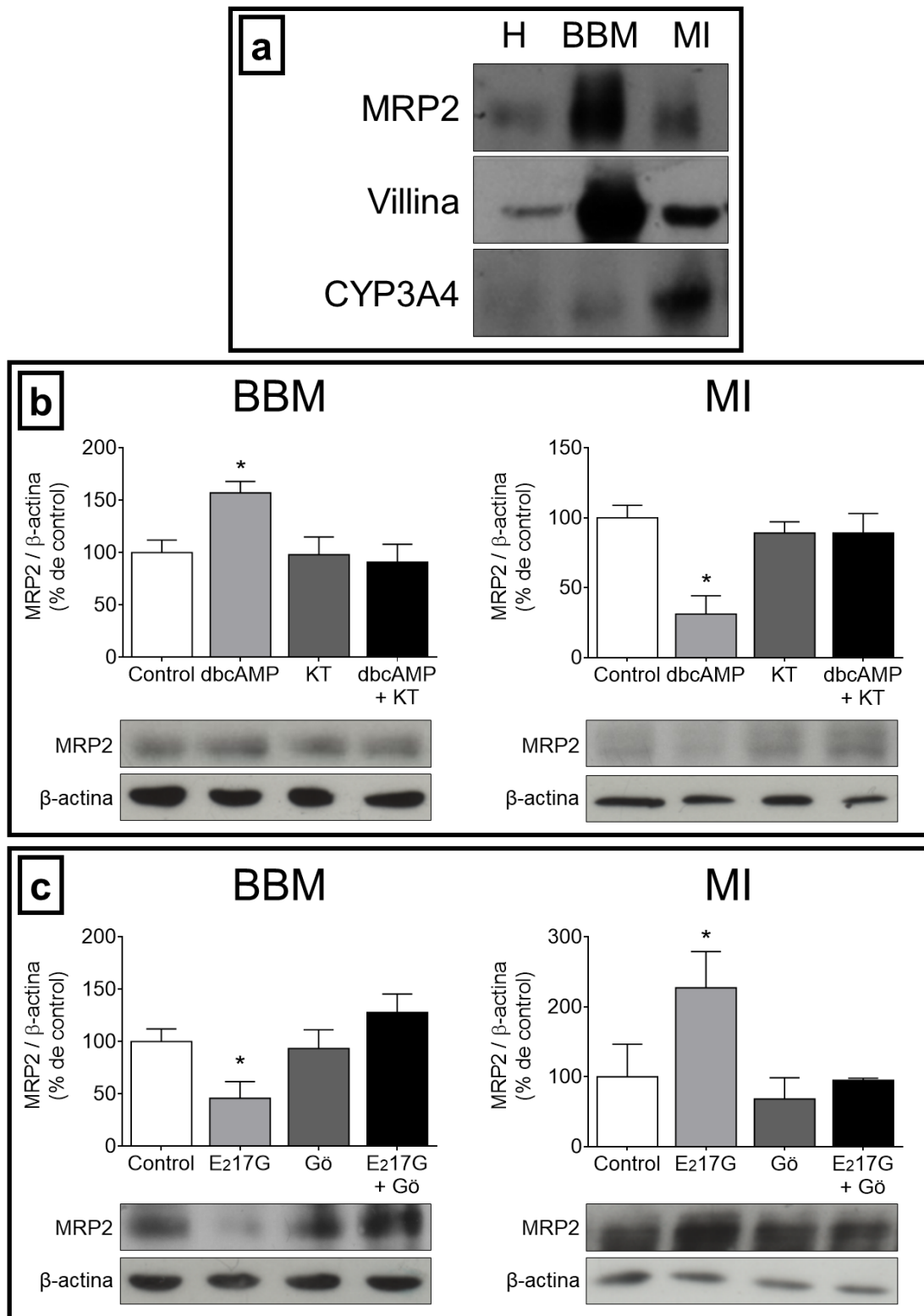


Figura 2.6. Distribución de MRP2 entre BBM y MI en yeyuno de rata y su modulación por dbcAMP y E217G. a. Se muestran bandas representativas correspondientes a MRP2, villina y CYP3A4 obtenidas de estudios de western blot sobre homogenados totales (H) de mucosa de yeyuno de rata y fracciones enriquecidas en BBM y MI. La uniformidad de carga y de transferencia desde los gels a las membranas de PVDF fue controlada con Ponceau S. Villina y CYP3A4 fueron

*utilizados como marcadores de las fracciones BBM y MI, respectivamente. La misma distribución de MRP2, villina y CYP3A4 fue confirmada en tres experimentos independientes. b, c. Se muestran bandas representativas correspondientes a MRP2 en fracciones BBM y MI luego de tratamientos con dbcAMP y E₂17G junto con el correspondiente análisis densitométrico. La participación de PKA (b) y cPKC (c) fue estudiada usando los inhibidores Gö6976 (Gö) y KT5720 (KT), respectivamente. La uniformidad de carga y transferencia desde los geles a las membranas de PVDF fue controlada con Ponceau S y con la detección de β -actina. Los datos son presentados como % del grupo control y expresados como promedio \pm desviación estándar (n = 4). *Diferente de los tres grupos restantes, p < 0,05.*

2.5. Conclusión

En esta primera parte del trabajo aportamos evidencia a favor de la existencia de una regulación aguda y bidireccional de la localización y la actividad de MRP2 en sacos intestinales de rata. En primer lugar, describimos la capacidad de dbcAMP (100 μ M, 30 minutos) de estimular la inserción de MRP2 en la BBM. Este efecto estuvo mediado por PKA y acompañado de un aumento en la actividad secretora del sustrato modelo DNP-SG. En segundo lugar, reportamos que E₂17G (400 μ M, 30 minutos) produce internalización de MRP2 desde la membrana apical hacia compartimientos intracelulares. Este efecto fue mediado por cPKC y condujo a pérdida en la actividad de transporte. Además, utilizando el método de fraccionamiento de membranas seguido de western blot demostramos la validez de la detección de cambios en la localización de MRP2 por microscopía confocal cuantitativa.

En conjunto, los datos sugieren que la localización de MRP2 en intestino puede estar sujeta a un equilibrio dinámico entre membrana plasmática y dominios intracelulares, permitiendo así una regulación rápida de la función de MRP2 *in vivo*. Este aspecto es precisamente el que será evaluado en el próximo capítulo.

CAPÍTULO 3 – La actividad y localización de MRP2 en intestino de rata son regulables *in vivo* y de forma aguda por nutrientes, siendo GLP-2 un mediador involucrado en este efecto.

3.1. Objetivo

El segundo objetivo del presente trabajo de tesis fue evaluar si determinados nutrientes son capaces de regular la localización y la actividad de MRP2 de forma rápida, estableciendo la mediación de GLP-2 así como también los posibles mecanismos cascada abajo del mismo. Para eso utilizamos un modelo *in vivo* conservando de forma intacta la anatomía y fisiología intestinal.

3.2. Introducción

3.2.1. Secreción bifásica de GLP-2 en respuesta a nutrientes

Habiendo demostrado en el capítulo anterior que MRP2 intestinal es capaz de regularse de forma aguda, el siguiente paso en la corroboración de nuestra hipótesis de trabajo es evaluar si los nutrientes, una vez alcanzado el intestino, son capaces de regular la localización y la actividad de MRP2 a través de la liberación de GLP-2. Como mencionamos en el capítulo 1, GLP-2 y GLP-1 son cosintetizados y cosecretados en cantidades equimolares por las células enteroendocrinas L, presentes en el epitelio intestinal principalmente a nivel de yeyuno, íleon y colon (Eissele y col., 1992). El estímulo principal para su liberación en condiciones fisiológicas es la presencia de nutrientes en el tracto

digestivo. Luego de la ingesta oral se produce un aumento bifásico en los niveles circulantes de GLP-2. El **primer pico** ocurre dentro de los primeros 15-30 minutos, cuando los nutrientes alcanzan el duodeno y provocan la secreción del polipéptido insulínico dependiente de la glucosa (GIP, del inglés *Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide*) por parte de las células enteroendocrinas K del epitelio intestinal. GIP, por su parte, estimula la vía aferente del nervio vago hacia el sistema nervioso central, con la consecuente activación de la vía eferente (rama celíaca) hacia el intestino distal (Fu-Cheng y col., 1997; Rocca y Brubaker, 1999). A su vez, la acetilcolina liberada por el nervio vago actúa directa o indirectamente sobre receptores muscarínicos presentes en las células L, produciéndose finalmente la liberación de GLP-2 (Anini y col., 2002; Anini y Brubaker, 2003). El **segundo pico** ocurre aproximadamente 60-90 minutos después de la ingesta; a diferencia del primero es un efecto más sostenido en el tiempo y producido por acción directa de los nutrientes sobre las células L. Interesantemente, este segundo pico de secreción de GLP-2 depende de la composición específica de la dieta. Los **lípidos** son presumiblemente los estímulos más potentes para la secreción de GLP-2, tal como fuera demostrado tanto en ratas (Rocca y Brubaker, 1999) como en humanos sometidos a dietas con diferente composición en macronutrientes (Xiao y col., 1999). Tiempo después se demostró que las células L responden selectivamente a los ácidos grasos. Así, dietas conteniendo únicamente aceite de oliva (enriquecido en ácidos grasos monoinsaturados) aumentaron la secreción de GLP-1 en ratas en comparación con dietas conteniendo únicamente aceite de coco (enriquecido en ácidos grasos saturados) (Rocca y col., 2001). En ese mismo trabajo, usando el

modelo *in vitro* de células L murinas GLUTag, se demostró que el ácido oleico (monoinsaturado) es mejor estimulador que el ácido palmítico (saturado). En línea con estos resultados, se demostró en humanos que los ácidos grasos monoinsaturados son mejores estimuladores de la secreción de GLP-1 que los ácidos grasos saturados e incluso que los ácidos grasos poliinsaturados (Beysen y col., 2002). En cuanto a los **carbohidratos**, se sabe desde hace tiempo que la glucosa es un potente secretagogo de GLP-1 y GLP-2 en humanos cuando es administrada por vía oral (Elliott y col., 1993; Balks y col., 1997; Xiao y col., 1999). A su vez, existen estudios que evaluaron el efecto directo de este monosacárido sobre las células L. Por ejemplo, la administración intraluminal de glucosa (3,5 - 11 mM) estimuló en forma dosis-dependiente la secreción de GLP-1 en íleon aislado y perfundido de cerdo (Hansen y col., 2004). Similares experimentos en íleon aislado y perfundido de rata mostraron que una concentración 250 mM de glucosa fue capaz de aumentar notablemente la secreción de GLP-1 medida en circulación portal, mientras que la concentración 5 mM no fue suficiente para producir dicho efecto (Dumoulin y col., 1998). Por último, en estudios *in vitro* utilizando células GLUTag, la glucosa (0,5 – 25 mM) produjo un aumento dosis-dependiente de la secreción de GLP-1 (Reimann y Gribble, 2002). La fructosa, por su parte, aumentó significativamente la secreción de GLP-1 aunque este efecto resultó ser menos potente que el de la glucosa (Kong y col., 1999). Finalmente, carbohidratos complejos como los presentes en el arroz integral o en la cebada no parecen ser estimulantes de la secreción de esta hormona (Elliott y col., 1993). Las **proteínas** y las peptonas, por su parte, no aumentan los niveles de GLP-1 y/o GLP-2 en humanos, según estudios *in vivo* (Elliott y col.,

1993; Layer y col., 1995; Xiao y col., 1999). Sin embargo, estudios *in vitro* usando células GLUTag demostraron que la glutamina (10 mM) es un potente estimulante de la secreción de GLP-1, superando a la propia glucosa cuando fueron evaluados a la misma concentración (Reimann y col., 2004). Por último, las **sales biliares** secretadas a la luz intestinal tras la ingesta podrían representar un estímulo para la liberación de GLP-2, tal como lo sugiere un estudio en humanos utilizando estímulos intraluminales con desoxicolato 10 mM (Adrian y col., 1993). Teniendo en cuenta toda esta información, decidimos incluir en nuestro diseño experimental a un representante de cada una de las categorías mencionadas y evaluar su capacidad de modular la actividad de MRP2 intestinal en un modelo *in vivo*.

3.2.2. Receptor de GLP-2 (GLP-2R)

El receptor de GLP-2 (GLP-2R) es un receptor acoplado a proteína G perteneciente a la clase B o familia de la secretina. Presenta gran homología de secuencia con otros receptores de la misma familia que transducen sus señales a través de adenilato ciclasa (Mayo y col., 2003), pero a su vez es altamente selectivo para GLP-2 y reacciona muy débilmente con otros ligandos estructuralmente relacionados como GLP-1, glucagon y GIP (DaCambre y col., 2000). Debido a que sólo unas pocas líneas celulares expresan GLP-2R y en todas ellas el receptor muestra actividad limitada, la mayoría de los estudios orientados a evaluar los mecanismos de señalización utilizaron líneas celulares transfectadas con este receptor. Sin embargo, debido a las notables diferencias entre las respuestas del GLP-2R transfectado y el endógeno (se detallan en Dubé y Brubaker, 2007), resulta difícil establecer cuál de los mecanismos

evaluados *in vitro* podrían ser relevantes en células expresando endógenamente el receptor. Un evento que parece ser común es la producción y acumulación intracelular de cAMP, tanto en un amplio rango de células transfectadas (Munroe y col., 1999; Yusta y col., 2000) como en células con GLP-2R endógeno (Walsh y col., 2003; Lovshin y col., 2004), sugiriendo el acoplamiento del receptor con proteína G de tipo estimuladora. Los mecanismos cascada abajo del cAMP son variados e incluyen mecanismos dependientes e independientes de PKA (Drucker y Yusta, 2014).

La expresión de GLP-2R está restringida al tracto gastrointestinal y el sistema nervioso central. Sin embargo, la localización exacta a nivel celular en lo que respecta al intestino ha sido fuente de controversia, en parte debido al uso de antisueros no específicos. Hoy, gracias al aporte de diferentes técnicas como RT-PCR, western blot, inmunohistoquímica, hidridación *in situ* y microdissección por captura láser, se sabe que GLP-2R está expresado en neuronas entéricas, miofibroblastos subepiteliales y células enteroendocrinas (Dubé y Brubaker, 2007). Interesantemente, se descartó la presencia de este receptor tanto en células epiteliales de la cripta como en el enterocito diferenciado, precisamente las dianas principales de la acción proliferativa y citoprotectora de GLP-2. Estos hallazgos sugieren que las múltiples acciones de GLP-2 a nivel intestinal que describimos en el capítulo 1 son ejercidas de forma indirecta, a través de mediadores paracrinos producidos por las células que expresan GLP-2R.

3.2.3. IGF-1 y adenosina como mediadores de la acción de GLP-2

La mayoría de los efectos reportados de GLP-2 tienen que ver con procesos a largo plazo, involucrando cambios en la expresión génica conducentes a

aumento de proliferación, disminución de apoptosis, hipertrofia e hiperplasia intestinal. Dentro de este extenso repertorio de acciones encontramos un protagonista común: el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1, del inglés *Insulin-like Growth Factor-1*). A nivel intestinal, IGF-1 es producido por los miofibroblastos subepiteliales en respuesta a GLP-2. Gracias al uso de ratones deficientes en IGF-1, se demostró el rol esencial de este mediador en los efectos de GLP-2 sobre parámetros morfométricos, índices proliferativos y peso intestinal (Dubé y col., 2006). Adicionalmente, el uso de NVP-AEW541, un inhibidor del receptor de IGF-1 (IGF-1R), previno efectos proliferativos de GLP-2 en células de la cripta (Dubé y col., 2008). Así, los efectos proliferativos a nivel intestinal parecen requerir del eje IGF-1/IGF-1R, capaz de regular transcripcionalmente numerosos genes diana en células de la mucosa (Lund, 1998; Howarth, 2003).

En cuanto a los efectos mediados por GLP-2 que tienen lugar de forma aguda, los mecanismos moleculares subyacentes son menos conocidos. En el primer intento reportado orientado a esclarecer esta cuestión, se observó que el tratamiento de 30 minutos con GLP-2 activó dos vías intracelulares diferentes en células epiteliales de ratón: por un lado, se activó el regulador de proliferación y diferenciación β -catenina en las células de la cripta, en un mecanismo mediado por IGF-1; por otro lado, se observó un aumento en la fosforilación de Akt en enterocitos de yeyuno, siendo este proceso independiente de IGF-1 (Dubé y col., 2008). Estos hallazgos sugieren un mecanismo molecular diferencial cascada abajo de GLP-2 según se trate de células en proliferación o células diferenciadas. Uno de los efectos agudos de GLP-2 mencionados en el capítulo 1 consiste en

la mejora de las funciones de digestión y absorción. En relación a esto, se reportó que la administración aguda de GLP-2 aumentó la absorción intestinal de aminoácidos en ratones. Los autores asociaron este efecto a un aumento en la traslocación a BBM del transportador de aminoácidos LAT1 (del inglés *Large neutral Amino acid Transporter*). El uso de tetrodotoxina, un bloqueador de canales de sodio dependientes de voltaje, llevó a concluir que el efecto ocurrió a través de un mecanismo mediado por las neuronas entéricas. Sin embargo, el mediador molecular entre la neurona y el enterocito no fue establecido (Lee y col., 2017). Otro efecto a corto plazo de GLP-2 está relacionado con el aumento en el flujo sanguíneo intestinal, constituyendo así un importante agente regulador de la hiperemia posprandial. En este sentido, mediadores vasoactivos locales como la adenosina tienen un rol clave en el control del flujo sanguíneo y su distribución en el tejido intestinal en una amplia variedad de especies (Granger y Norris, 1980; Proctor, 1986; Proctor, 1987; Sawmiller y Chou, 1992; Bohlen, 1998; Li y col., 2004), al menos en parte mediante la regulación de la síntesis de óxido nítrico (Chandrasekharan y col., 2009). Asimismo, en un trabajo realizado en cerdos en el que se demostró el papel del eje GLP-2/GLP-2R en la estimulación aguda del flujo sanguíneo intestinal, se observó activación concomitante de la enzima óxido nítrico sintasa (Guan y col., 2006). Así, se sugirió que GLP-2 está relacionado con mediadores vasoactivos que participan cascada abajo de la activación de GLP-2R. Por último, en un interesante trabajo utilizando videomicroscopía intravital en yeyuno de rata, se demostró que la vasodilatación intestinal producida por administración intraluminal de glucosa es mediada por la acción secuencial de adenosina y óxido nítrico (Matheson y col.,

2011). El mecanismo que da origen a la adenosina extracelular responsable de los mencionados efectos nunca ha sido estudiado. Sin embargo, se sabe que su formación enzimática a partir del ATP tiene un papel protagónico a nivel intestinal, tanto en condiciones fisiológicas como fisiopatológicas (Cardoso y col., 2015). Brevemente, el ATP liberado junto a neurotransmisores “clásicos” por las neuronas entéricas de los plexos submucoso y/o mientérico (Burnstock, 2008) es hidrolizado por diferentes ecto-nucleósido trifosfato-difosfohidrolasas dando lugar a AMP. Luego, por acción de la enzima ecto-5'-nucleotidasa (también conocida como CD73), el AMP se convierte en adenosina (Cardoso y col., 2015). La localización de CD73 intestinal en humanos ha sido estudiada únicamente a nivel de la mucosa. Por estudios de inmunohistoquímica, se identificó a esta enzima en toda la membrana plasmática del enterocito, con mayor expresión en membrana apical y menor expresión en membrana basolateral (Strohmeier y col., 1997). En intestino de rata el estudio fue más extenso, detectándose CD73 en enterocitos pero también en las capas musculares y en neuronas entéricas. Interesantemente, los autores sugieren al cAMP como precursor alternativo al ATP en la formación de adenosina extracelular, en este caso por acción en tándem de ecto-fosfodiesterasas y CD73 (Giron y col., 2008).

En esta parte del trabajo evaluamos el efecto agudo de ácido oleico, glucosa, glutamina y desoxicolato sobre la actividad de MRP2 en un modelo *in vivo*. Estos agentes fueron seleccionados como representantes de las grandes categorías descritas en la sección 3.2.1 capaces de estimular de forma directa la liberación de GLP-2. La participación de GLP-2, IGF-1 y adenosina en este efecto, así como también la vía de transmisión de estímulos, fueron evaluados utilizando

diferentes estrategias experimentales. Por último, utilizando el método de microscopía confocal cuantitativa validado en el capítulo anterior, determinamos si los cambios de actividad de MRP2 estuvieron asociados a cambios en su localización.

3.3. Materiales y métodos

3.3.1. Reactivos

Adenosina, adenosina 5'-(α,β -metileno)difosfato (APCP), desoxicolato de sodio, glucosa y glutamina se adquirieron en Sigma-Aldrich (Missouri, Estados Unidos); anti-GLP-2 (C-20) se adquirió en Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Estados Unidos); anti-IGF-1 (M23) se adquirió en ThermoScientific (Illinois, Estados Unidos); GLP-2 recombinante de rata se adquirió en Abcam (Cambridge, Reino Unido) y ácido oleico bidestilado se adquirió en Ballester Productos Químicos S.A. (Villa Ballester, Argentina). Los restantes reactivos fueron del máximo grado analítico disponible comercialmente.

3.3.2. Modelo *in vivo*

El modelo *in vivo* utilizado en esta parte del trabajo posibilita la estimulación directa de células L productoras de GLP-2 en la región del intestino en la cual su presencia es máxima (yeyuno distal, íleon y colon) con evaluación simultánea de actividad o localización de MRP2 en el segmento de máxima expresión del transportador (yeyuno proximal) (ver Figura 3.1a). Además, presenta la ventaja de mantener intactas la irrigación y la inervación intestinal. Los animales utilizados fueron obtenidos, mantenidos, ayunados y anestesiados previo a los experimentos según lo indicado en la sección 2.3.2. Durante los experimentos,

su temperatura corporal fue monitoreada y mantenida entre 37 °C y 37,5 °C utilizando lámparas de calentamiento.

3.3.2.1. Tratamientos por vía endovenosa o intraluminal

Para evaluar el efecto de agentes estimuladores de la secreción de GLP-2 sobre la actividad y/o localización de MRP2 intestinal, 2,5 mL de ácido oleico (10% V/V en solución fisiológica + Tween 20 3%; pH=6,5), glucosa (10 y 100 mM en solución fisiológica, pH=6,5), glutamina (10 y 100 mM en solución fisiológica, pH=6,5), desoxicolato (10 mM en solución fisiológica, pH=6,5) o solución fisiológica sola se agregaron lentamente a nivel del yeyuno distal (aproximadamente 19 cm después del ligamento de Treitz) utilizando una aguja 25G. Durante este tiempo, la región del intestino previa al sitio de administración se mantuvo ligeramente elevada y semicerrada con un hilo, de forma de evitar el flujo retrógrado de los agentes. Para evaluar el efecto del llenado sobre la actividad de MRP2, se realizó el mismo procedimiento pero sin realizar inyección alguna. El tiempo de tratamiento fue de 20 minutos; durante este tiempo, la cavidad abdominal fue cubierta con gasa humedecida con solución fisiológica a 37 °C.

Para los tratamientos por vía sistémica, la vena femoral fue cateterizada con un tubo de polietileno (PE-40) y dbcAMP (20 μ mol/kg peso corporal en 0,4 mL de solución fisiológica), GLP-2 (125 μ g/kg peso corporal en 0,4 mL de solución fisiológica), adenosina (10 mg/kg peso corporal en 0,4 mL de solución fisiológica) o solución fisiológica sola fueron administrados por vía endovenosa. El tiempo de tratamiento fue de 20 minutos. En el caso de adenosina, el volumen total se

administró en cuatro dosis de 0,1 mL cada una, separadas temporalmente entre sí por 5 minutos. Todos estos procedimientos están ilustrados en la Figura 3.1b.

3.3.2.2. Pretratamientos

En cuanto a los pretratamientos, la inmunoneutralización de GLP-2 e IGF-1 se realizó administrando una inyección intraperitoneal de anti-GLP-2 (20 µg en 1 mL de solución fisiológica) o anti-IGF-1 (50 µg en 1 mL de solución fisiológica) respectivamente, 30 minutos antes del tratamiento intraluminal con ácido oleico. Similarmente, el pretratamiento de 30 minutos con el inhibidor selectivo de CD73 APCP (2 mg/kg peso corporal en 1 mL de solución fisiológica) se realizó por vía intraperitoneal. Por último, para evaluar la vía de transmisión del efecto gatillado por el ácido oleico, se seccionó el intestino entre dos ligaduras realizadas entre el yeyuno proximal y el yeyuno distal (aproximadamente 17 cm después del ligamento de Treitz), justo antes del tratamiento intraluminal con el lípido. Todos estos procedimientos están ilustrados en la Figura 3.1c.

3.3.2.3. Estudios de actividad de MRP2

Durante los 20 minutos de tratamiento, se delimitó el segmento de yeyuno proximal de aproximadamente 15 cm de longitud en el que posteriormente se evaluó el eflujo de DNP-SG. Los extremos proximal y distal del segmento (ubicados 1 cm y 16 cm después del ligamento de Treitz, respectivamente) se identificaron con un nudo prearmado (sin ajustar). Una vez finalizado el tratamiento (intraluminal o endovenoso) se cerró el extremo distal del segmento ajustando la ligadura, se llenó el segmento con 2,6 mL de una solución de CDNB 100 µM en KHB y finalmente se ajustó el nudo del extremo proximal, cerrando

completamente el saco intestinal. El tiempo de incubación en estas condiciones fue de 30 minutos; durante este tiempo, la cavidad abdominal fue cubierta con gasa humedecida con solución fisiológica a 37 °C. Luego, el animal fue sacrificado por exanguinación y el saco intestinal fue retirado. Se registró su longitud y su contenido fue recogido en un tubo, se midió su volumen y luego fue desproteinizado y sometido a cuantificación de DNP-SG y DNP-CG según se indica en la sección 2.3.4. Estos procedimientos están ilustrados en la Figura 3.1d.

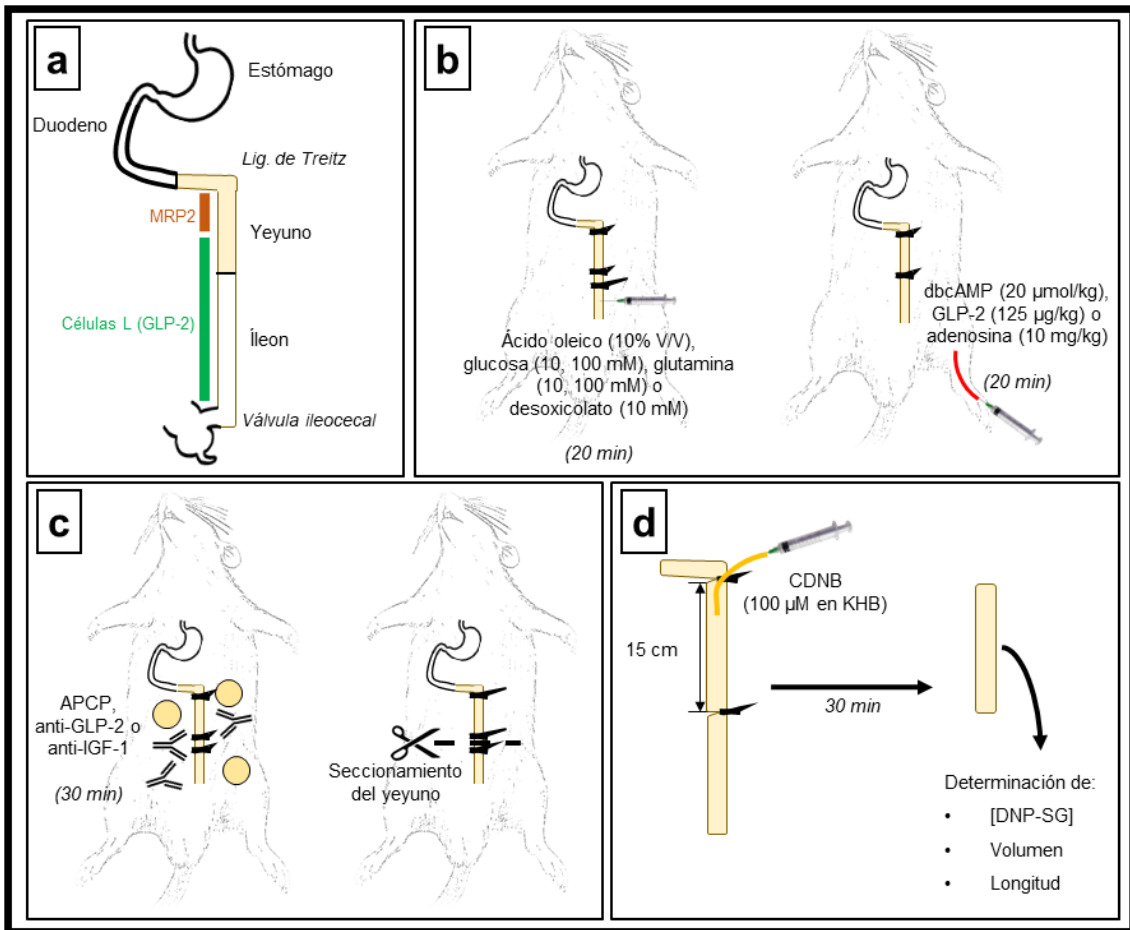


Figura 3.1. Modelo in vivo para determinación de actividad de MRP2. a. La expresión máxima de MRP2 en yeyuno proximal y la localización de células L productoras de GLP-2 a partir de yeyuno distal propició la separación espacial en el intestino de la medición de la actividad de transporte y la estimulación de células L. b. Los tratamientos orientados a estimular directamente las células L se realizaron a nivel de yeyuno distal mediante una inyección intraluminal (panel izquierdo). Considerando su acción desde el lado seroso del epitelio, dbcAMP, GLP-2 y

adenosina fueron administrados por vía endovenosa (panel derecho). Luego de 20 minutos de tratamiento se procedió a la determinación de la actividad de MRP2. c. Según el objetivo del experimento, en algunos casos se realizaron pretratamientos antes de los tratamientos intraluminales o endovenosos descriptos. Tanto la inmunoneutralización de GLP-2 o IGF-1 como la inhibición de CD73 se realizaron a través de una inyección intraperitoneal de anticuerpos o del inhibidor APCP, respectivamente (panel izquierdo). Para evaluar si la transmisión de la señal disparada por el ácido oleico ocurre por vía transmural, se seccionó el yeyuno entre el extremo distal del saco y el sitio de administración del lípido inmediatamente antes del tratamiento intraluminal (panel derecho). d. Una vez terminado el tratamiento, se determinó el eflujo de DNP-SG como medida de la actividad de MRP2. Para eso se creó un saco intestinal de 15 cm justo después del ligamento de Treitz (yeyuno proximal) que fue llenado con una solución del precursor difusible CDNB. Luego de 30 minutos se cuantificó la masa de DNP-SG secretada al compartimiento luminal.

3.3.2.4. Estudios de localización de MRP2

Para estudios de localización de MRP2 por inmunomarcación seguida de microscopía confocal cuantitativa, los animales fueron sometidos a tratamientos con solución fisiológica intraluminal (grupo control), ácido oleico intraluminal (grupo ácido oleico) o ácido oleico intraluminal con pretratamiento con anti-GLP-2 (grupo ácido oleico + anti-GLP-2) según lo descrito en las secciones 3.3.2.1 y 3.3.2.2. A continuación, el animal fue sacrificado por exanguinación y el segmento correspondiente al yeyuno proximal fue sometido al procedimiento descrito en la sección 2.3.4.

3.3.3. Análisis estadístico

Todos los resultados se expresaron como promedio \pm desviación estándar. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas a través del test t de Student (dos grupos experimentales) o a través de ANOVA seguido de Tukey (más de dos grupos experimentales). La significación estadística se estableció en $p < 0,05$.

3.4. Resultados

3.4.1. Validación del modelo *in vivo*

En primer lugar decidimos establecer si, en nuestro modelo *in vivo*, el agente proinsertor dbcAMP es capaz de producir un aumento agudo en la actividad de transporte de MRP2 cuando es administrado por vía endovenosa. Como se muestra en la Figura 3.2a, dbcAMP (20 $\mu\text{mol/kg}$ peso corporal) produjo un aumento significativo (+206% vs. control) en el eflujo de DNP-SG, demostrando que este modelo permite evidenciar cambios en la actividad de MRP2, al menos ante estímulos provenientes de la circulación sistémica. Así, este resultado avaló la ejecución de la siguiente etapa del proyecto.

3.4.2. Efecto de agentes liberadores de GLP-2 sobre la actividad de MRP2 *in vivo*

A continuación, decidimos evaluar el efecto agudo de agentes estimuladores de la liberación de GLP-2 administrados en yeyuno distal sobre la actividad de MRP2. La Figura 3.2b muestra que, de todos los agentes evaluados, únicamente el ácido oleico y la glucosa fueron capaces de alterar significativamente el eflujo de DNP-SG en yeyuno proximal, sugiriendo un efecto nutriente-específico. Puntualmente, el ácido oleico, administrado en forma de emulsión a una concentración de relevancia fisiológica (Iakoubov y col., 2011), aumentó la actividad de MRP2 con respecto al grupo control (+202%). Para el caso de la glucosa, es importante destacar que se observó un efecto de tipo dosis-dependiente, alcanzando significancia estadística únicamente a la concentración suprafisiológica 100 mM (+188%). Los efectos de la glutamina y del desoxicolato

fueron equivalentes al del vehículo administrado a las ratas del grupo control. Interesantemente, el llenado del intestino distal con el vehículo produjo un efecto *per se* sobre la actividad de MRP2, evidenciado en un mayor y significativo eflujo de DNP-SG comparado con las ratas sin administración intraluminal de solución (Figura 3.2b). Teniendo en cuenta todos estos resultados, elegimos al ácido oleico como prototipo de agente modulador de MRP2 de forma aguda en los estudios orientados a elucidar los mecanismos que subyacen a esta regulación.

3.4.3. Participación de GLP-2 en el efecto del ácido oleico

Teniendo en cuenta la hipótesis de trabajo presentada en la sección 1.2, el siguiente paso fue evaluar la capacidad de GLP-2 de afectar la actividad de MRP2. La Figura 3.2c muestra que la administración endovenosa de GLP-2 recombinante de rata (125 µg/kg peso corporal) es capaz de producir un aumento significativo en la actividad de MRP2 (+168%), evaluada luego de 20 minutos de tratamiento. A continuación, considerando que el ácido oleico es un conocido agente liberador de GLP-2, decidimos evaluar si esta hormona participa como mediador de los efectos del ácido graso sobre la actividad de transporte de MRP2. Utilizando la estrategia de inmunoneutralización de GLP-2 descrita en estudios previos (Hartmann y col., 2002), se observó una disminución significativa en la respuesta al ácido oleico en ratas pretratadas con anti-GLP-2 (Figura 3.2c). Este resultado indica que la actividad de GLP-2 es necesaria para que se produzca el efecto del ácido oleico sobre la actividad de MRP2.

3.4.4. Participación de mediadores cascada abajo de GLP-2

Como se describió en la sección 3.2.3, IGF-1 y adenosina median diversas acciones de GLP-2 en el intestino. Luego de confirmar el rol de GLP-2 en el fenómeno que estamos estudiando, estos mediadores irrumpen en escena generando el interrogante en relación a su protagonismo. Precisamente este último aspecto fue evaluado a continuación, inmunoneutralizando a IGF-1 e inhibiendo selectivamente a CD73, la enzima más importante en la producción de adenosina extracelular a nivel intestinal. Como podemos ver en la Figura 3.2d, el efecto del ácido oleico no fue prevenido por la inyección de anti-IGF-1, descartando la participación de IGF-1. Por el contrario, el pretratamiento con APCP fue capaz de prevenir el aumento en la actividad de MRP2 producido tanto por el lípido como por GLP-2 (Figura 3.2d), sugiriendo un rol de la adenosina extracelular en este efecto y estableciendo un orden en la participación de los mediadores, con adenosina actuando cascada abajo de GLP-2. La adenosina *per se*, administrada por vía endovenosa (10 mg/kg peso corporal), aumentó significativamente el eflujo de DNP-SG (+235%), confirmando la capacidad de este nucleósido de modular la actividad de MRP2 al alcanzar el epitelio intestinal desde el lado seroso (Figura 3.2d).

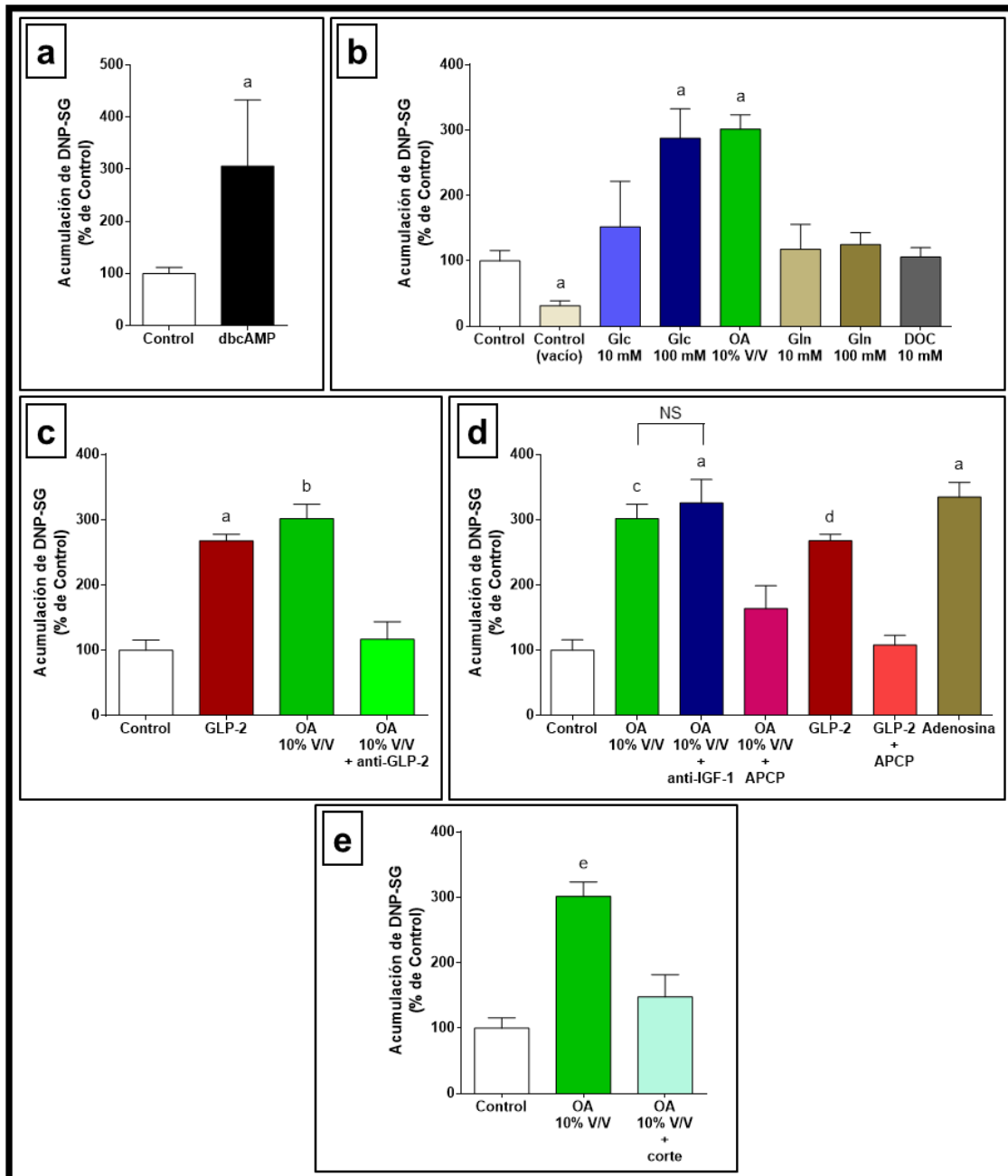


Figura 3.2. Regulación de la actividad de MRP2 in vivo por nutrientes y elucidación del mecanismo extracelular subyacente. a. El aumento en la actividad de MRP2 luego de la administración endovenosa de dbcAMP (20 μ mol/kg peso corporal; 20 minutos) permitió validar el modelo. b. Efecto de glucosa (Glc), ácido oleico (OA), glutamina (Gln) y desoxicolato (DOC) administrados intraluminalmente sobre la actividad de MRP2. El efecto del llenado per se también fue evaluado. c. Modulación de la actividad de MRP2 luego de administración de GLP-2 endovenoso y participación de este péptido en el efecto del ácido oleico. d. Evaluación del mecanismo cascada abajo de GLP-2, incluyendo los mediadores IGF-1 y adenosina. e. El seccionamiento del yeyuno antes del tratamiento con ácido oleico confirmó que la transmisión del estímulo gatillado por el lípido ocurre a través de la pared intestinal. Los datos son presentados como % del grupo control y expresados como promedio \pm desviación estándar (n = 4). a: diferente del grupo control, p < 0,05. b: diferente de los grupos control y OA 10% V/V + anti-GLP-2, p < 0,05. c: diferente de los grupos control y OA 10% V/V + APCP, p < 0,05. d: diferente de los grupos control y GLP-2 + APCP, p < 0,05. e: diferente de los grupos control y OA 10% V/V + corte, p < 0,05. NS: no significativo.

3.4.5. Efecto del seccionamiento del yeyuno

Habiendo aportado evidencia en relación a los mediadores que posibilitan la rápida acción del ácido oleico sobre la actividad de MRP2, surge el siguiente interrogante: ¿Cómo viaja el estímulo generado por el ácido oleico desde el yeyuno distal o íleon hasta el yeyuno proximal? Una de las posibles vías de transmisión es la endocrina, con GLP-2 accediendo a la circulación sistémica luego de su liberación y finalmente actuando a nivel del yeyuno proximal. La otra posibilidad es una transmisión a través de la compleja organización de neuronas del sistema nervioso entérico, capaz de propagar estímulos tanto en sentido oral como caudal (Mazzone y Farrugia, 2007). Para distinguir entre estas posibilidades, decidimos seccionar el yeyuno entre el extremo distal del saco intestinal y el sitio de administración del ácido oleico, justo antes del momento de la inyección. Con esta sencilla intervención se interrumpe la conexión neuronal entre ambas regiones del yeyuno, permaneciendo intacta la conexión por vía sistémica. La Figura 3.2e muestra que el seccionamiento del intestino limitó la capacidad del ácido oleico de potenciar la actividad de MRP2 (+48%, $p > 0,05$ vs. control). Este hallazgo es una prueba inequívoca de la participación (al menos parcial) de una vía de transmisión tras mural, presumiblemente a través de neuronas de los plexos submucosos y/o mientéricos.

3.4.6. Localización de MRP2

Para evaluar si estos cambios de actividad de MRP2 se correlacionaron con cambios en la localización subcelular de MRP2, se utilizó la técnica de inmunomarcación seguida de microscopía confocal cuantitativa validada en la

sección 2.4. En la Figura 3.3 se exhiben imágenes representativas de cada grupo evaluado. En las imágenes de la primera fila se muestran los canales correspondientes a núcleos (azul), ZO-1 (verde) y MRP2 (rojo), mientras que en las de la segunda fila se presenta únicamente el canal correspondiente a MRP2. Debajo de las imágenes se muestra el análisis densitométrico. El tratamiento agudo e intraluminal con ácido oleico en yeyuno distal produjo una inserción del transportador desde compartimientos intracelulares hacia la membrana apical de los enterocitos de yeyuno proximal con respecto al grupo control, tal como se evidencia a partir de una señal mucho menos dispersa a lo largo del eje longitudinal de las células y más focalizada en la región BBM. Consistente con esta interpretación cualitativa, el análisis de las curvas densitométricas arroja una altura del pico de MRP2 significativamente mayor (+185%) que en el grupo control. Esta mayor densidad de transportador en la membrana apical del enterocito permite explicar el aumento en la actividad de transporte observado luego del tratamiento. Por otra parte, la inmunoneutralización de GLP-2 30 minutos antes del tratamiento resultó en imágenes, curva densitométrica y altura del pico de MRP2 similares a las del grupo control, demostrando la participación de GLP-2 en el efecto proinsertor del ácido oleico.

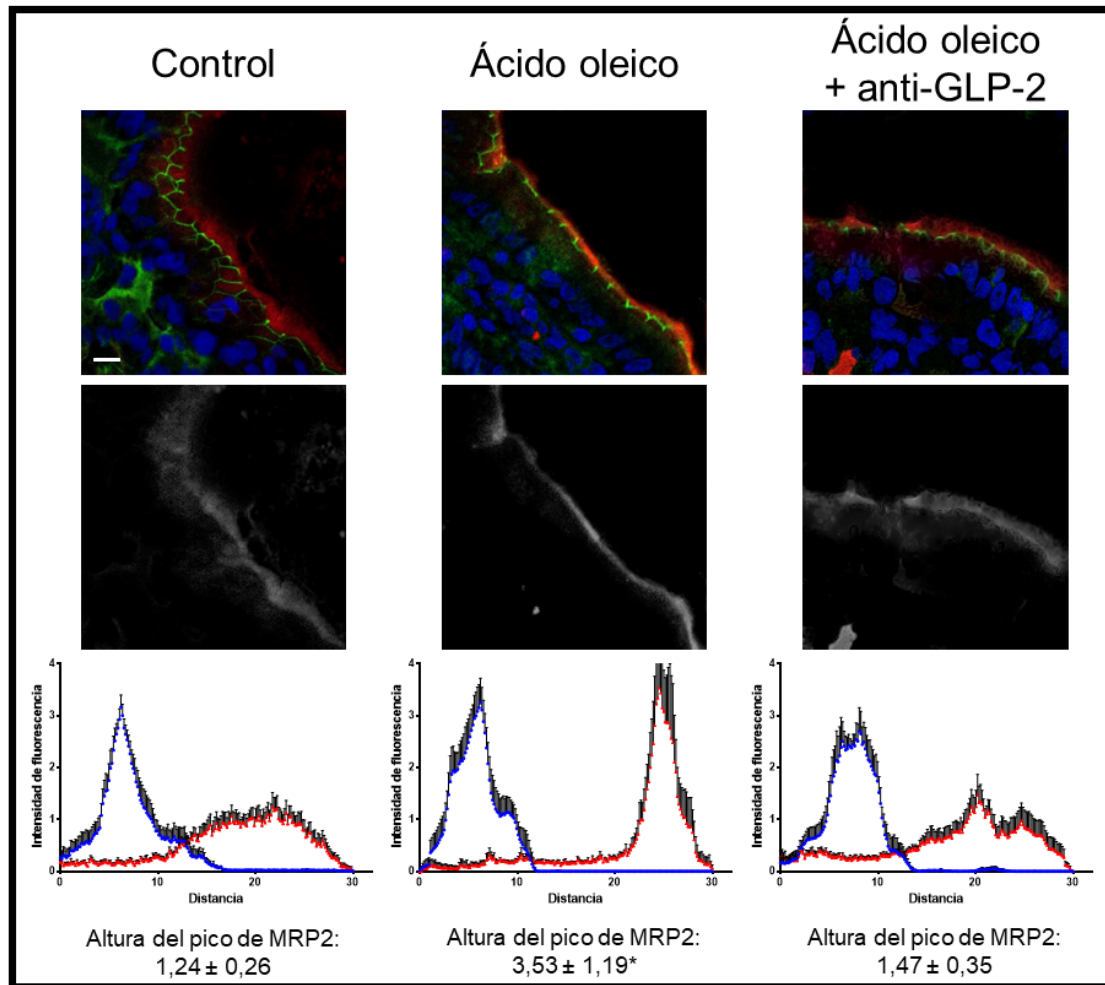


Figura 3.3. Localización de MRP2 en respuesta a ácido oleico en presencia o ausencia de anti-GLP-2. MRP2 fue marcada con fluorescencia roja y la proteína de uniones estrechas ZO-1 con fluorescencia verde. Los núcleos se tiñeron de azul con Hoechst 33258 (imágenes de la fila superior). Para mayor claridad, se incluyen imágenes en escala de grises mostrando únicamente el canal correspondiente a MRP2. La distribución de la intensidad de fluorescencia a lo largo de una barra de 30 μm fue evaluada para los canales rojo y azul ($n = 20$ por grupo). Para detectar cambios en la distribución de la curva correspondiente al canal rojo (MRP2), todas las áreas bajo la curva se igualaron a un mismo valor arbitrario y las curvas resultantes se alinearon usando el canal azul (núcleos) como referencia. Adicionalmente, la altura del pico correspondiente a MRP2 se calculó, se expresó como promedio \pm desviación estándar y se comparó entre grupos. * $p < 0,05$ vs. los dos grupos restantes. La barra blanca de escala representa 10 μm .

3.5. Conclusión

En esta segunda parte del trabajo utilizamos un innovador modelo *in vivo* para estudiar la regulación de MRP2 por nutrientes. En primer lugar, demostramos que cuando administramos ácido oleico (10% V/V) o glucosa (100 mM) en la luz

del yeyuno distal se produce un aumento rápido en la actividad de MRP2 medida en yeyuno proximal, donde su expresión es máxima. Este efecto dependió del tipo de agente y de su concentración, ya que no se pudo reproducir por el agregado de glutamina, desoxicolato o glucosa 10 mM. La evaluación del mecanismo subyacente demostró que GLP-2 tiene un rol clave en la mencionada acción del ácido oleico. Además, GLP-2 parece mediar sus efectos a través de un aumento en la producción extracelular de adenosina y no a través del factor de crecimiento IGF-1. La transmisión de estas señales ocurriría principalmente a través de la propia pared intestinal y no involucraría a la vía sistémica. Finalmente, según el resultado de los estudios por microscopía confocal cuantitativa, el aumento en la actividad de MRP2 puede explicarse por una mayor densidad del transportador en la membrana apical luego del tratamiento de 20 minutos con ácido oleico.

En conjunto, la incorporación de ciertos nutrientes a la luz intestinal conduce a un aumento de la capacidad excretora de MRP2 a través de un reclutamiento apical del transportador mediado por la hormona GLP-2. Los mecanismos intracelulares serán examinados en el próximo capítulo.

CAPÍTULO 4 – La actividad y localización de MRP2 son regulables de forma aguda en células intestinales de origen humano Caco-2. Utilización de este modelo para la evaluación del mecanismo subcelular.

4.1. Objetivo

El tercer y último objetivo de este trabajo de tesis fue evaluar el mecanismo molecular cascada abajo de la adenosina que conduce a la inserción de MRP2. La línea celular intestinal de origen humano Caco-2 fue utilizada con este fin, no sin antes evaluar si la localización y la actividad de MRP2 son regulables de forma aguda en este modelo.

4.2. Introducción

4.2.1. Células Caco-2 como modelo de enterocitos humanos

Para cumplir con el último objetivo del trabajo es conveniente contar con un modelo *in vitro* de células en cultivo que permita aislar los procesos que ocurren en el enterocito del resto de los tipos celulares que componen el intestino. Debido a las dificultades inherentes al trabajo con cultivo primario de enterocitos, las células Caco-2 han ganado protagonismo en este sentido. Si bien dicha línea celular fue obtenida a partir de un adenocarcinoma de colon humano (Fogh y col., 1977), presenta la característica de diferenciarse espontáneamente luego de 21 días de cultivo para formar una monocapa de células polarizadas muy similares al enterocito maduro desde el punto de vista estructural (uniones

estrechas, microvellosidades) y funcional (enzimas de BBM, de fase I y fase II, transporte vectorial) (Chantret y col., 1988; Hidalgo y col., 1989; Hilgers y col., 1990; Hubatsch y col., 2007). En cuanto a la expresión de MRP2 y otros transportadores, se reportó un patrón de expresión similar entre células Caco-2 diferenciadas y enterocitos humanos (Taipalensuu y col., 2001; Englund y col., 2006; Hilgendorf y col., 2007). Por todas estas razones, el cultivo de células Caco-2 aparece como la mejor opción para continuar con nuestro trabajo. Sin embargo, debido a que la regulación de la actividad de MRP2 mediante cambios en su localización nunca ha sido estudiada en este modelo, el primer paso fue evaluar esta posibilidad a través de la misma estrategia utilizada en el capítulo 2.

4.2.2. Receptores de adenosina

En el capítulo anterior y utilizando un modelo *in vivo*, demostramos que la producción extracelular de adenosina es clave en el aumento en la actividad de transporte de MRP2 inducido por ácido oleico. ¿Cómo puede actuar la adenosina generada en las inmediaciones de la membrana basolateral del enterocito? En términos generales, la adenosina ejerce sus acciones biológicas a través de la unión a receptores acoplados a proteínas G denominados A₁AR, A_{2A}AR, A_{2B}AR y A₃AR. Cada uno de ellos tiene mecanismos de señalización diferentes: mientras que A₁AR y A₃AR están acoplados a proteínas G_i, A_{2A}AR y A_{2B}AR están acoplados a proteínas G_s, dando lugar a inhibición o activación de adenilato ciclasa, respectivamente (Fredholm y col., 2001). En el intestino, el principal receptor de adenosina es el A_{2B}AR (Strohmeier y col., 1995). A nivel del intestino delgado humano, su expresión demostró ser mayor en yeyuno que en íleon, con

localización preferencial en epitelio, neuronas del plexo submucoso y células gliales (Christofi, 2008). Además, se detectó su expresión funcional en líneas celulares de origen intestinal como Caco-2 (Yang y col., 2014) y T84 (Kolachala y col., 2006), validando el estudio de su participación en este modelo. Así, este último episodio del trabajo está subdividido en dos partes. La primera parte está orientada a estudiar si la regulación aguda de la localización y actividad de MRP2 demostrada en intestino de rata también ocurre en las células intestinales humanas Caco-2 y, de ser así, revalidar el método de microscopía confocal cuantitativa en este modelo. En la segunda parte se estudiará la capacidad de adenosina para modular a MRP2 y la participación del receptor A_{2B}AR en este efecto.

4.3. Materiales y métodos

4.3.1. Reactivos

5(6)-carboxi-2',7'-diclorofluoresceína diacetato (CDFDA), adenosina y MRS 1754 se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Missouri, Estados Unidos). Los restantes reactivos fueron del máximo grado analítico disponible comercialmente.

4.3.2. Cultivo de células Caco-2

Las células Caco-2 se obtuvieron de la *American Type Culture Collection* (Manassas, Estados Unidos) y se crecieron en DMEM (Gibco; Carlsbad, Estados Unidos) suplementado con suero fetal bovino 10% V/V (Natocor; Córdoba, Argentina), aminoácidos no esenciales 1% V/V, L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/mL y estreptomycin 100 µg/mL (Gibco; Carlsbad, Estados Unidos). Las

células fueron cultivadas a 37 °C en atmósfera húmeda con CO₂ 5%, renovando el medio de cultivo cada dos días.

4.3.1. Estudios de actividad de MRP2

Para los estudios de actividad, 3x10⁵ células fueron sembradas en soportes Transwell® de 1,12 cm² de superficie (número de catálogo 3412; Corning; Corning, Estados Unidos) e incubadas durante 21 días siguiendo las recomendaciones de Hubatsch y col. (2007). El medio de cultivo en los compartimientos apical y basolateral fue reemplazado cada dos días. Para evaluar la integridad de la monocapa, se midió la resistencia eléctrica transepitelial cada dos días usando un equipo EVOM (*World Precision Instruments*; Sarasota, Estados Unidos). Todas las monocapas utilizadas en estos experimentos presentaron valores de resistencia eléctrica transepitelial a 37 °C mayores a 300 Ω cm², indicando una monocapa continua (Hubatsch y col., 2007).

La actividad de MRP2 se evaluó a través de la determinación del cociente entre el transporte en sentido basolateral-apical (BA) y en sentido apical-basolateral (AB) del sustrato modelo de MRP2 5(6)-carboxi-2',7'-diclorofluoresceína (CDF) (Schexnayder y Stratford, 2015; Tocchetti y col., 2018a). En este método, el precursor no fluorescente CDFDA ingresa pasivamente a la célula y es inmediatamente hidrolizado por acción de esterasas convirtiéndose en el compuesto fluorescente CDF (Zamek-Gliszczyński y col., 2003). Luego de los 21 días de cultivo, las células fueron tratadas con medio de cultivo solo (grupo control) o medio de cultivo conteniendo E₂17G 400 μM (grupo E₂17G), dbcAMP 10 μM (grupo dbcAMP), adenosina 50 μM (grupo adenosina), adenosina 50 μM

+ MRS 1754 10 μM (grupo adenosina + MRS) o adenosina 50 μM + KT5720 1 μM (grupo adenosina + KT). Después de 30 minutos de tratamiento, las células fueron lavadas con solución salina equilibrada de Hank (HBSS, del inglés *Hank's Balanced Salt Solution*) durante 15 minutos a 37 °C. Luego, los insertos Transwell® fueron transferidos a placas nuevas en las que se agregó CDFDA (10 μM en HBSS) al compartimiento dador (apical en el caso de experimentos en dirección AB y basolateral en el caso de experimentos en dirección BA). El compartimiento receptor (basolateral en el caso de experimentos en dirección AB y apical en el caso de experimentos en dirección BA) fue llenado con HBSS a 37 °C. Las placas se incubaron en agitación suave a 37 °C y se tomaron muestras con reemplazo de volumen del compartimiento receptor cada 30 minutos durante 120 minutos. El CDF se cuantificó usando un fluorómetro DTX 880 (Beckman Coulter; Brea, Estados Unidos), fijando como longitudes de onda de excitación y emisión 485 nm y 520 nm, respectivamente. Los coeficientes de permeabilidad aparente (P_{app} , en centímetros por segundo) de CDF a través de las monocapas celulares en ambas direcciones fueron calculados usando la siguiente ecuación:

$$P_{\text{app}} = \frac{1}{C_0 A} \times \frac{dQ}{dt}$$

donde dQ/dt es la tasa de aparición de CDF en el compartimiento receptor, C_0 es la concentración inicial de CDFDA en el compartimiento dador (10 μM) y A es el área del soporte Transwell® (1,12 cm^2). El coeficiente de eflujo de CDF fue obtenido dividiendo P_{app} en la dirección BA entre P_{app} en la dirección AB.

4.3.2. Determinación de la distribución de MRP2 entre fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas (MP) y en membranas intracelulares (MI)

Para los estudios de distribución de MRP2, las células se sembraron en placas de 6 pocillos ($2,5 \times 10^5$ células por pocillo) y se cultivaron durante 21 días. A continuación, las células fueron tratadas con medio de cultivo solo (grupo control) o medio de cultivo conteniendo E₂17G 400 μ M (grupo E₂17G), dbcAMP 10 μ M (grupo dbcAMP), E₂17G 400 μ M + Gö6976 1 μ M (grupo E₂17G + Gö) o dbcAMP 10 μ M + KT5720 1 μ M (grupo dbcAMP + KT). Al igual que para los experimentos utilizando sacos intestinales (sección 2.3.5), se realizaron experimentos preliminares con dbcAMP 10 y 100 μ M y con E₂17G 100, 200 y 400 μ M con el fin de establecer la concentración mínima de estos agentes capaz de producir un efecto significativo.

Luego de 30 minutos de tratamiento, las fracciones enriquecidas en membrana plasmática (MP) y en membranas intracelulares (MI) se obtuvieron por centrifugación diferencial según la técnica descrita por Kubitz y col. (2005). Brevemente, luego de dos lavados, las células se rasparon y recogieron en buffer sacarosa 250 mM, Tris 20 mM, EGTA 5 mM, MgCl₂ 1 mM, pH = 7,40 suplementado con inhibidores de proteasas para ser lisadas mediante 20 pasajes a través de una aguja 25G. La fracción MP se obtuvo por centrifugación a 1000 g durante 5 minutos a 4 °C. El sobrenadante resultante se centrifugó a 100000 g durante 60 minutos a 4 °C para obtener la fracción MI.

4.3.3. Western blot

Los estudios de western blot se realizaron de forma idéntica a lo descrito en la sección 2.3.5.

4.3.4. Inmunomarcación seguida de microscopía confocal

Para detectar la localización de MRP2, se colocó un cubreobjetos estéril en cada pocillo de la placa de 6 pocillos; sobre cada cubreobjetos se sembraron $2,5 \times 10^5$ células, las cuales fueron cultivadas de la forma habitual durante 21 días. A continuación, las células diferenciadas fueron tratadas con medio de cultivo solo (grupo control) o medio de cultivo conteniendo E₂17G 400 μ M (grupo E₂17G), dbcAMP 10 μ M (grupo dbcAMP), adenosina 50 μ M (grupo adenosina) o adenosina 50 μ M + MRS 1754 10 μ M (grupo adenosina + MRS). Luego de 30 minutos de tratamiento, las células sobre los cubreobjetos fueron lavadas con TBS (3 lavados de 5 minutos) y fijadas con paraformaldehído 4% P/V durante 15 minutos. Después de otros 3 lavados de 5 minutos con TBS, se incubaron durante 15 minutos en buffer de permeabilización y bloqueo. La marcación de MRP2, ZO-1 y los núcleos se realizó como se describió en la sección 2.3.4. Utilizando el mismo microscopio confocal que en dicha sección se obtuvieron entre 23 y 31 imágenes en el eje z con un tamaño de paso de 0,4 μ m. Como resultado se muestran vistas superior y 3D ortogonal de las imágenes. El estudio densitométrico también fue similar al realizado para los cortes de intestino, con excepción de que la determinación de la intensidad de fluorescencia se realizó a lo largo del eje z, utilizando una línea de 10 μ m.

4.3.5. Cuantificación de cAMP intracelular

Para determinar los niveles intracelulares de cAMP, se sembraron $2,5 \times 10^5$ células por pocillo en placas de 6 pocillos y se cultivaron durante 21 días. Luego, fueron incubadas con medio de cultivo solo (grupo control) o medio de cultivo conteniendo adenosina $50 \mu\text{M}$ (grupo adenosina) durante 15 minutos. Inmediatamente después, las células se lavaron con PBS y se lisaron en HCl ($0,1 \text{ M}$, 20 minutos) a temperatura ambiente con el objetivo de detener la actividad fosfodiesterasa y estabilizar el cAMP liberado (Huang y col., 2011). Finalmente, el cAMP fue cuantificado utilizando el kit *cAMP Select ELISA* (Cayman Chemical, Ann Arbor, Estados Unidos) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

4.3.6. Análisis estadístico

Todos los resultados se expresaron como promedio \pm desviación estándar. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas a través del test t de Student (dos grupos experimentales) o a través de ANOVA seguido de Tukey (más de dos grupos experimentales). La significación estadística se estableció en $p < 0,05$.

4.4. Resultados

4.4.1. Demostración de la regulación aguda de MRP2 en células Caco-2 por acción de dbcAMP y E₂17G

4.4.1.1. Modulación de la actividad de MRP2 en células Caco-2

En primer lugar evaluamos el efecto de dbcAMP y E₂17G sobre la actividad de MRP2, evaluada como el coeficiente de eflujo del sustrato modelo de MRP2 CDF. El tratamiento de 30 minutos con dbcAMP (10 μM) produjo un aumento significativo en la P_{app} en el sentido basolateral-apical sin afectar significativamente la P_{app} en el sentido contrario (Figura 4.1a). Este efecto (específico de membrana apical) se tradujo en un aumento significativo en el coeficiente de eflujo de CDF (+118%), confirmando un aumento en la actividad de MRP2 (Figura 4.1b). Por el contrario, el tratamiento con E₂17G (400 μM, 30 minutos) disminuyó significativamente la P_{app} en el sentido basolateral-apical con un ligero aumento no significativo en la P_{app} en el sentido apical-basolateral (Figura 4.1a). Como resultado, el coeficiente de eflujo de CDF fue significativamente menor que en el grupo control (-60%), consistente con una disminución en la actividad de MRP2 (Figura 4.1b).

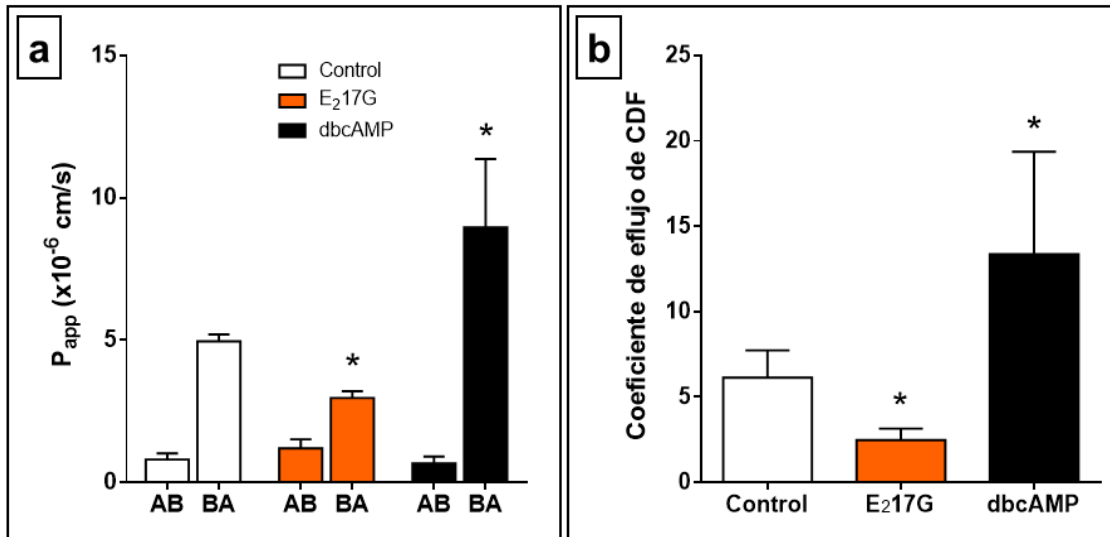


Figura 4.1. Modulación de la actividad de MRP2 por E₂17G y dbcAMP en células Caco-2 cultivadas en soportes Transwell. a. Coeficientes de permeabilidad (P_{app}) del sustrato de MRP2 CDF luego de 120 minutos, tanto en sentido apical-basolateral (AB) como en sentido basolateral-apical (BA). b. El coeficiente de flujo de CDF surge de la relación entre ambas permeabilidades y es una medida de la actividad de MRP2. Los datos están expresados como promedio \pm desviación estándar ($n = 4$, interpretándose como 4 filtros en cada dirección de transporte). *Diferente del grupo control, $p < 0,05$.

4.4.1.2. Detección de cambios en la localización de MRP2 por microscopía confocal cuantitativa

Para evaluar si estos cambios en la actividad están asociados a cambios en la localización de MRP2 utilizamos la técnica de inmunomarcación seguida de microscopía confocal cuantitativa. La Figura 4.2 incluye, en su primera fila, imágenes de células Caco-2 con detección fluorescente de MRP2 en rojo, ZO-1 en verde y núcleos en azul. En ellas se muestra la estructura de este cultivo celular (vista superior), la cual es consistente con una monocapa celular establecida. Las células están delimitadas por uniones estrechas, identificadas por la señal de ZO-1. Las imágenes creadas por apilamiento a lo largo del eje Z se muestran a la derecha y por debajo de la imagen correspondiente a la vista

superior. En la parte central de la Figura 4.2 se presenta una imagen en escala de grises de este apilamiento en el eje Z exclusivamente para el canal rojo (MRP2). Finalmente, el análisis densitométrico se presenta en la parte inferior de dicha figura como gráficas de intensidad de fluorescencia versus distancia. Luego del tratamiento agudo con dbcAMP (10 μ M, 30 minutos) no se pudieron distinguir cambios en el patrón de distribución de MRP2 con respecto al grupo control en la vista superior. Sin embargo, el apilamiento en el eje Z evidencia que la señal de MRP2 se concentra principalmente en la superficie apical de la monocapa celular, sin cambios aparentes en la localización de ZO-1. El análisis cuantitativo confirmó un aumento significativo en la altura del pico de MRP2, sugiriendo una relocalización del transportador en la membrana apical luego del tratamiento. La misma Figura 4.2 muestra que la localización de MRP2 también fue afectada por E₂17G (400 μ M, 30 minutos). El apilamiento en el eje Z evidencia una mayor presencia de MRP2 en el citosol en comparación con las células control. Esto concuerda con el análisis cuantitativo arrojando una disminución significativa en la altura del pico de MRP2. Vale la pena mencionar que el patrón de distribución del transportador difiere del de los grupos control y dbcAMP ya que muestra un patrón punteado. La naturaleza de tal distribución es desconocida, pero podría reflejar un proceso de internalización endocítica que conduce a pérdida de MRP2 a partir de regiones específicas de membrana. La imagen en blanco y negro parece estar a favor de tal hipótesis ya que la señal de MRP2 muestra intermitencias a nivel de la membrana apical, contrastando con la tinción más continua en los grupos control y dbcAMP.

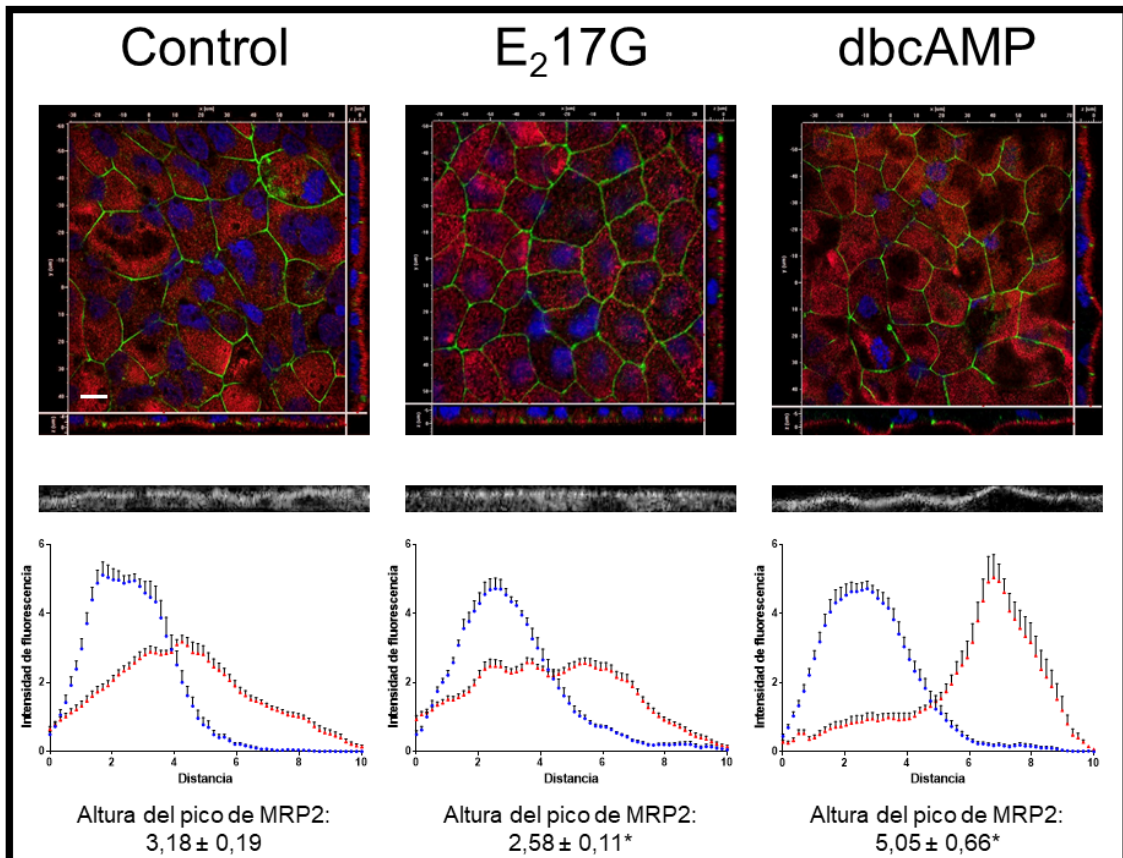


Figura 4.2. Localización de MRP2 en respuesta a E₂17G y dbcAMP. Las imágenes principales representan la vista superior de la monocapa celular. A la derecha y por debajo de estas imágenes principales se muestran imágenes creadas por apilamiento a lo largo del eje Z. MRP2 fue marcada con fluorescencia roja y la proteína de uniones estrechas ZO-1 con fluorescencia verde. Los núcleos se tiñeron de azul con Hoechst 33258. Para mayor claridad, se incluyeron imágenes en escala de grises del apilamiento a lo largo del eje Z mostrando únicamente el canal correspondiente a MRP2. La distribución de la intensidad de fluorescencia a lo largo del eje Z fue evaluada para los canales rojo y azul (n = 20 por grupo). Para detectar cambios en la distribución de la curva correspondiente al canal rojo (MRP2), todas las áreas bajo la curva se igualaron a un mismo valor arbitrario y las curvas resultantes se alinearon usando el canal azul (núcleos) como referencia. Adicionalmente, la altura del pico correspondiente a MRP2 se calculó, se expresó como promedio ± desviación estándar y se comparó entre grupos. *p < 0,05 vs. grupo control. La barra blanca de escala representa 10 μm.

4.4.1.3. Detección de cambios en la localización de MRP2 por fraccionamiento de membranas seguido de western blot

Al igual que en el modelo de intestino de rata, decidimos validar los resultados obtenidos por el método de microscopía confocal cuantificando MRP2 en fracciones enriquecidas en MP y MI. En primer lugar, verificamos la eficiencia del

método de fraccionamiento de membranas, el cual demostró ser apropiado para separar MP de MI en tejido hepático (Kubitz y col., 2005). La Figura 4.3a muestra que villina está claramente enriquecida en MP mientras que CYP3A4 se recupera principalmente en MI. MRP2 es recuperada en ambas fracciones, aunque se encuentra un contenido ligeramente más alto en MP en comparación con MI. Según estos hallazgos, es posible especular que en células Caco-2 una mayor proporción de proteína transportadora se encuentra en el espacio intracelular en comparación con yeyuno de rata. Los resultados de microscopía confocal en células del grupo control (Figura 4.2) mostrando localización de MRP2 tanto en la superficie apical como intracelularmente respaldan esta especulación. Luego de la incubación con dbcAMP (10 μ M) durante 30 minutos se observó un aumento significativo en la recuperación de MRP2 en la fracción MP con disminución concomitante en MI con respecto al grupo control (Figura 4.3b). Este efecto fue abolido en presencia del inhibidor de PKA KT5720. Después de la incubación con el inhibidor solo no se encontraron cambios en la distribución de MRP2. En conjunto, estos datos confirman un aumento en la inserción de MRP2 desde membranas intracelulares hacia membrana apical mediado por PKA luego del tratamiento con dbcAMP. En contraste con estos efectos, E₂17G disminuyó el contenido de MRP2 en la fracción MP y aumentó su expresión en la fracción MI en comparación con las células del grupo control (Figura 4.3c). Si bien la incorporación del inhibidor de cPKC Gö6976 solo a las incubaciones no afectó la localización de MRP2 entre MP y MI, este agente fue capaz de prevenir la redistribución inducida por E₂17G cuando se incorporaron en forma simultánea. Estos resultados confirman un proceso de internalización de MRP2 desde

membrana apical hacia reservorios intracelulares mediado por cPKC luego del tratamiento agudo con E₂17G (400 μM, 30 minutos).

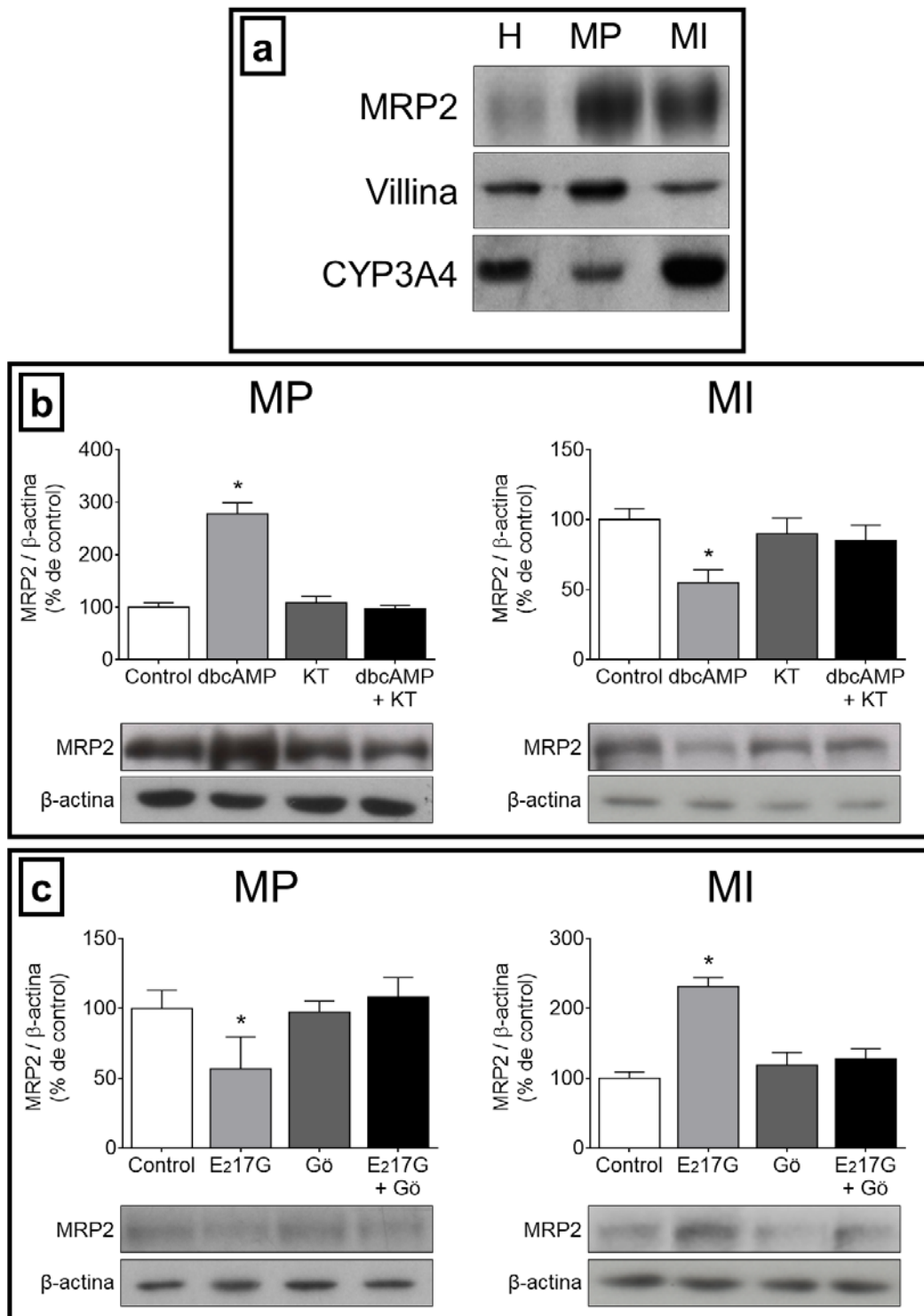


Figura 4.3. Distribución de MRP2 entre MP y MI en células Caco-2 y su modulación por dbcAMP y E₂17G. a. Se muestran bandas representativas correspondientes a MRP2, villina y CYP3A4 obtenidas de estudios de western blot a partir de lisados totales de células Caco-2 (H) y fracciones enriquecidas en MP y MI. La uniformidad de carga y de transferencia desde los gels

a las membranas de PVDF fue controlada con Ponceau S. Villina y CYP3A4 fueron utilizados como marcadores de las fracciones MP y MI, respectivamente. La misma distribución de MRP2, villina y CYP3A4 fue confirmada en tres experimentos independientes. b, c. Se muestran bandas representativas correspondientes a MRP2 en fracciones MP y MI luego de tratamientos con dbcAMP y E₂17G junto con el correspondiente análisis densitométrico. La participación de PKA (b) y cPKC (c) fue estudiada usando los inhibidores Gö6976 (Gö) y KT5720 (KT), respectivamente. La uniformidad de carga y transferencia desde los geles a las membranas de PVDF fue controlada con Ponceau S y con la detección de β -actina. Los datos son presentados como % del grupo control y expresados como promedio \pm desviación estándar (n = 4). *Diferente de los tres grupos restantes, p < 0,05.

4.4.2. Mecanismo molecular cascada abajo de la adenosina

4.4.2.1. Modulación de la actividad de MRP2

Luego de haber confirmado que MRP2 es regulable en forma aguda también en el modelo de células intestinales humanas Caco-2, procedimos a evaluar el efecto de la adenosina sobre la actividad de este transportador a través de la evaluación del coeficiente de eflujo de CDF. La Figura 4.4a muestra que el tratamiento agudo con adenosina (50 μ M) provocó un aumento significativo en el coeficiente de permeabilidad aparente de CDF en el sentido basolateral-apical con respecto a células controles, sin modificarse el P_{app} en el sentido apical-basolateral. Esto condujo a un aumento también significativo en el coeficiente de eflujo de CDF, confirmando que adenosina es capaz de producir aumento en la actividad de MRP2 también en este modelo (Figura 4.4b). Además, demostramos que los efectos de la adenosina fueron mediados por el receptor A_{2B}AR, ya que los aumentos tanto en P_{app} en el sentido basolateral-apical como en el coeficiente de eflujo de CDF fueron prevenidos por MRS 1754, un inhibidor selectivo de este receptor (Figura 4.4). Por último, evaluamos la participación de PKA en el aumento de actividad mediado por adenosina utilizando KT5720. En presencia de este inhibidor, adenosina no aumentó significativamente ninguno

de los dos parámetros (Figura 4.4), sugiriendo un rol de PKA en este efecto. Sin embargo, debido a que estos mismos parámetros no difirieron entre los grupos adenosina y adenosina + KT (Figura 4.4), es posible que PKA no sea el único mediador involucrado en los efectos de la adenosina.

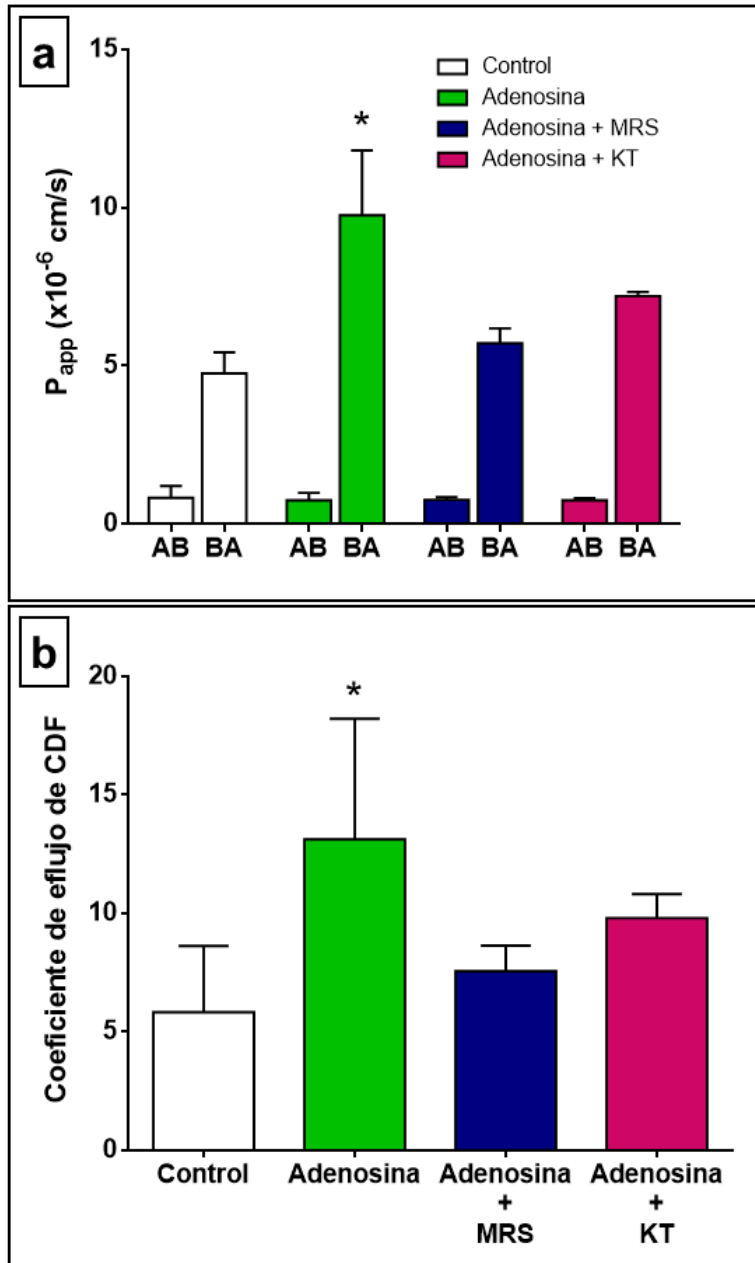


Figura 4.4. Modulación de la actividad de MRP2 por adenosina en células Caco-2 cultivadas en soportes Transwell®. Evaluación de la participación del receptor de adenosina $A_{2B}AR$ y de PKA. a. Coeficientes de permeabilidad (P_{app}) del sustrato de MRP2 CDF luego de 120 minutos, tanto en sentido apical-basolateral (AB) como en sentido basolateral-apical (BA). b. El coeficiente de eflujo de CDF surge de la relación entre ambas permeabilidades y es una medida de la actividad de MRP2. MRS: MRS 1754 10 μM , inhibidor selectivo del receptor $A_{2B}AR$. KT: KT5720 1 μM , inhibidor selectivo de PKA. Los datos están expresados como promedio \pm desviación estándar ($n = 4$, interpretándose como 4 filtros en cada dirección de transporte). *Diferente de los grupos control y adenosina + MRS, $p < 0,05$.

4.4.2.2. Modulación de la localización de MRP2

El siguiente paso fue evaluar si el aumento en la actividad de MRP2 en respuesta a adenosina se corresponde con un aumento en la inserción del transportador en la membrana apical de las células. En efecto, los estudios de microscopía confocal cuantitativa mostraron que el tratamiento con adenosina (50 μ M, 30 minutos) produjo un aumento significativo en la altura del pico de MRP2, el cual además se encontró notablemente desplazado hacia el ápice de la monocapa (Figura 4.5). Las imágenes correspondientes al apilamiento en el eje Z ilustran adecuadamente este hallazgo, ya que células tratadas con adenosina presentan una señal de MRP2 concentrada en la membrana apical en detrimento de la señal proveniente del interior celular cuando se comparan con células del grupo control, las cuales muestran una distribución de MRP2 mucho más homogénea a lo largo del eje Z (Figura 4.5). Por su parte, MRS 1754 (1 μ M; inhibidor de $A_{2B}AR$) fue capaz de prevenir este cambio de localización, evidenciándose para el grupo cotratado con adenosina y MRS 1754 resultados cualitativos y cuantitativos iguales a los del grupo control. Estos hallazgos demuestran que el tratamiento agudo con adenosina es capaz de movilizar el contenido de MRP2 desde reservorios intracelulares hacia la membrana apical, en un mecanismo mediado por $A_{2B}AR$.

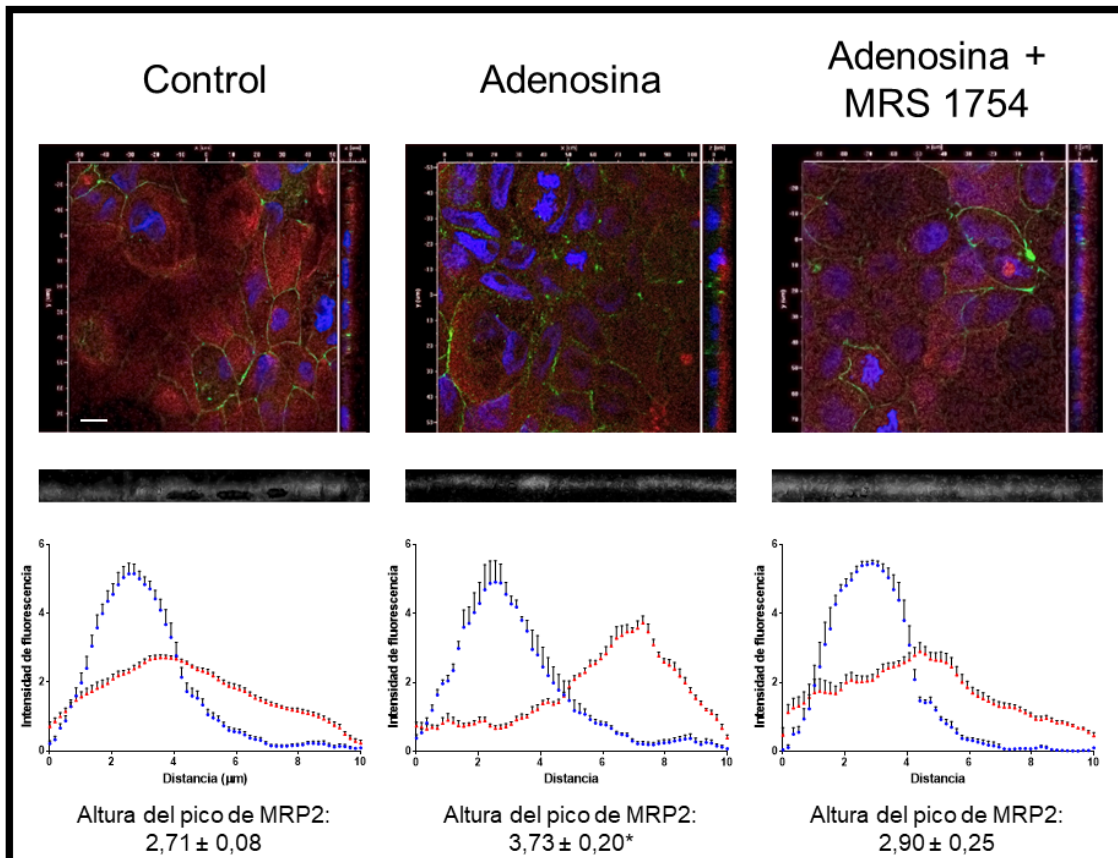


Figura 4.5. Localización de MRP2 en respuesta a adenosina en presencia o ausencia de MRS 1754. Las imágenes principales representan la vista superior de la monocapa celular. A la derecha de estas imágenes principales se muestran imágenes creadas por apilamiento a lo largo del eje Z. MRP2 fue marcada con fluorescencia roja y la proteína de uniones estrechas ZO-1 con fluorescencia verde. Los núcleos se tiñeron de azul con Hoechst 33258. Para mayor claridad, se incluyen imágenes en escala de grises del apilamiento a lo largo del eje Z mostrando únicamente el canal correspondiente a MRP2. La distribución de la intensidad de fluorescencia a lo largo del eje Z fue evaluada para los canales rojo y azul ($n = 20$ por grupo). Para detectar cambios en la distribución de la curva correspondiente al canal rojo (MRP2), todas las áreas bajo la curva se igualaron a un mismo valor arbitrario y las curvas resultantes se alinearon usando el canal azul (núcleos) como referencia. Adicionalmente, la altura del pico correspondiente a MRP2 se calculó, se expresó como promedio \pm desviación estándar y se comparó entre grupos. * $p < 0,05$ vs. los dos grupos restantes. La barra blanca de escala representa $10 \mu\text{m}$.

4.4.2.3. Cuantificación de cAMP intracelular

Por último, teniendo en cuenta que $A_{2B}AR$ está acoplado a G_s , una proteína activadora de adenilato ciclasa, decidimos evaluar los niveles de cAMP intracelulares luego del tratamiento con adenosina. Como se muestra en la Figura 4.6, el tratamiento con el nucleósido durante 15 minutos aumentó

significativamente la concentración de cAMP en lisados de Caco-2 ($269,5 \pm 21,9$ pmol/mL vs. $206,7 \pm 6,4$ pmol/mL, respectivamente). Este resultado sugiere la funcionalidad del eje adenosina/ $A_{2B}AR$ /adenilato ciclasa en nuestro modelo experimental. Serán necesarios experimentos adicionales para demostrar su rol en la inserción de MRP2 mediada por adenosina.

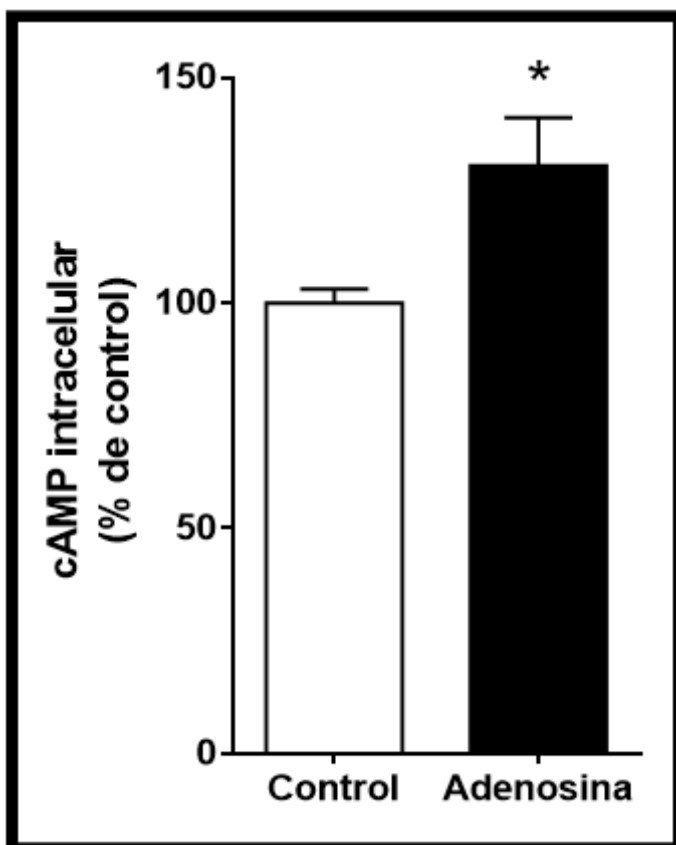


Figura 4.6. Modulación de cAMP intracelular por adenosina. Células Caco-2 diferenciadas fueron tratadas con adenosina ($50 \mu\text{M}$; 15 min). Luego, se midieron los niveles intracelulares de cAMP utilizando un kit comercial. Los datos están expresados como promedio \pm desviación estándar ($n = 4$). *Diferente del grupo control, $p < 0,05$.

4.5. Conclusión

En la última parte experimental de este trabajo de tesis nos trasladamos del modelo de intestino de rata (más complejo en cuanto a tipos celulares y estructuras) a células de epitelio intestinal de origen humano (monocapa de un único tipo celular). En primer lugar, utilizando las mismas herramientas que en el

modelo anterior, verificamos que tanto la localización como la actividad de MRP2 son regulables de forma rápida por agentes prototipo. Además, utilizando un método de fraccionamiento de membranas seguido de western blot aplicado a cultivo celular, validamos la detección de cambios en la localización de MRP2 por el método de microscopía confocal cuantitativa. Esto nos permitió utilizar células Caco-2 para corroborar la habilidad proinsertora de la adenosina en un modelo similar a los enterocitos humanos. Efectivamente, luego de 30 minutos, este nucleósido (50 μ M) fue capaz de aumentar la actividad de MRP2 (evaluada como el coeficiente de eflujo de CDF) y simultáneamente incrementar la densidad de este transportador a nivel de la membrana apical de las células. Este proceso estuvo mediado por el receptor de adenosina A_{2B}AR y, al menos en parte, por PKA. Finalmente, luego de 15 minutos de tratamiento, los niveles intracelulares de cAMP se encontraron incrementados. Este último hallazgo es consistente con la participación tanto de A_{2B}AR como de PKA.

Discusión y conclusión final

En el presente trabajo de tesis aportamos evidencia a favor de un novedoso mecanismo fisiológico orientado a regular rápidamente la actividad del transportador intestinal MRP2 en ciclos de ingesta y ayuno y de esa forma protegernos contra la absorción de tóxicos. En esta sección se analizarán los resultados presentados, confrontándolos con la literatura, discutiendo su relevancia fisiológica y sus limitaciones.

Desde su descubrimiento a finales del siglo pasado, numerosos trabajos han descrito con mayor o menor detalle la regulación de MRP2 intestinal a través de cambios en su expresión, tanto por factores fisiológicos y fisiopatológicos (Arana y col., 2016) como por un amplio rango de xenobióticos (Tocchetti y col., 2016). La regulación de su actividad en el corto plazo (en referencia a lapsos más cortos que los demandados por cambios en la expresión proteica) ha sido pobremente estudiada, con escasos reportes relacionados con inhibiciones competitivas y no competitivas luego de interacción directa del agente regulador con el transportador (Tocchetti y col., 2016). Aún menos evidencia hay sobre la posibilidad de una regulación aguda basada en cambios en la localización del transportador entre membrana apical y compartimientos intracelulares como la demostrada en hígado (Crocenzi y col., 2012), con una virtual ausencia de trabajos en este sentido. Es por eso que nos propusimos como primer objetivo demostrar que esta regulación de MRP2 intestinal, tanto en el sentido de la inserción como en el de la internalización, es posible. Valiéndonos de E₂17G y dbcAMP, dos agentes de probadas acciones contrapuestas sobre MRP2 en hígado, pudimos demostrar la existencia de este fenómeno tanto en intestino de

rata (capítulo 2) como en células humanas Caco-2 (capítulo 4). Un hallazgo interesante es que esta regulación bidireccional ocurrió independientemente de la distribución inicial de MRP2 entre MP y MI, claramente diferente entre ambos modelos.

El dbcAMP, un análogo permeable del cAMP, estimuló tanto la actividad como la inserción de MRP2 en la membrana apical de ambos modelos pero a concentraciones diferentes: 100 μ M para intestino de rata y 10 μ M para células Caco-2. La diferencia posiblemente radique en la morfología diferencial entre ambos modelos: mientras las células Caco-2 constituyen una monocapa a la que el dbcAMP puede acceder directa e inmediatamente, el intestino de rata presenta varias capas de tejido (descritas en detalle en el capítulo 1) que limitan o retrasan la difusión y el acceso del agente al enterocito, especialmente considerando que fue administrado del lado seroso de forma de simular mejor la situación *in vivo* (ver secciones 2.3.3 y 2.3.5). La mediación de PKA fue demostrada en ambos modelos mediante el uso del inhibidor KT5720 (Figura 2.6b y Figura 4.3b), pero los mecanismos subyacentes a la activación de esta quinasa no fueron estudiados. En relación a esto, existen estudios demostrando fenómenos de inserción apical de MRP2 dependiente de microtúbulos en diferentes modelos hepáticos (Roelofsen y col., 1998; Roma y col., 2000; Mottino y col., 2005). Adicionalmente, se observó que el restablecimiento en la localización apical de MRP2 luego de un estrés oxidativo también resultó estar mediado por microtúbulos, en este caso siendo además dependiente de PKA (Sekine y col., 2008). En este último estudio, los autores propusieron que proteínas motoras asociadas a microtúbulos como kinesina-2, miosina-5 o dineína podrían estar

implicadas. Finalmente, en células Huh-7 se demostró la participación de p38 α MAPK en la inserción de MRP2 mediada por cAMP (Schonhoff y col., 2010). Mecanismos similares a estos podrían estar implicados en el aumento de la inserción de MRP2 mediado por dbcAMP observado en nuestros modelos.

El E₂17G, un derivado endógeno del estradiol cuya excreción biliar se supone aumentada durante el embarazo, terapias de reemplazo hormonal o tratamientos anticonceptivos (Vore y col., 1997), produjo en ambos modelos una internalización de MRP2 desde la membrana plasmática hacia compartimientos intracelulares, con concomitante pérdida de la capacidad excretora. Un efecto similar había sido demostrado previamente, aunque en hígado de rata (Mottino y col., 2002) y duplas aisladas de hepatocitos (Crocenzi y col., 2008). Si bien la finalidad de este estudio fue la de demostrar la regulación bidireccional de MRP2 intestinal, el hallazgo podría tener cierta relevancia fisiopatológica, especialmente considerando que el E₂17G alcanza concentraciones elevadas en bilis, aún antes de producir colestasis en la rata (Meyers y col., 1980). Así, el enterocito podría estar expuesto a altos niveles de E₂17G de origen biliar desde su polo apical, precisamente el lado a través del cual este metabolito presenta su poder internalizador. En relación a esto, la incorporación diferencial del agente desde el lado mucoso o seroso parece tener nuevamente un rol clave: en un estudio previo realizado en ratas se administró una dosis colestásica de E₂17G por vía endovenosa y se evaluó la localización y la actividad de MRP2 intestinal. Como resultado, la localización del transportador no se vio afectada mientras que el transporte de DNP-SG disminuyó significativamente, lo cual fue atribuido a un efecto inhibitorio de tipo competitivo por parte del E₂17G (Arias y col., 2009).

El efecto diferencial de E₂17G sobre la localización de MRP2 entre ambos trabajos puede radicar en la vía de administración, en la dosis o en ambas. En lo que respecta al mediador, los resultados en la Figura 2.6c y en la Figura 4.3c demuestran que cPKC participa en el efecto de E₂17G en ambos modelos. Este hecho era en cierta forma esperado teniendo en cuenta que esta quinasa es capaz de mediar la internalización vesicular de MRP2 en hepatocitos de rata (Crocenzi y col., 2008). Los mecanismos subyacentes a cPKC también escaparon al objetivo de este trabajo de tesis. La fosforilación de radixina u otro miembro de la familia de las proteínas ERM podría estar involucrada, al menos parcialmente, en la internalización de MRP2 hepática inducida por proteinquinasas (Anwer, 2014). En este sentido, la activación de cPKC producida por estrés oxidativo condujo a un aumento en la fosforilación de radixina seguida de disociación entre esta proteína de anclaje y MRP2, finalmente resultando en internalización del transportador (Sekine y col., 2011). En intestino, la fosforilación de ezrina mediada por cPKC condujo similarmente a pérdida de interacción e internalización de MRP2 (Nakano y col., 2009). En futuros experimentos intentaremos identificar las dianas de fosforilación de cPKC en nuestros modelos. Por último, la utilización de dbcAMP y E₂17G en experimentos de fraccionamiento de membranas seguido de detección de MRP2 por western blot permitió validar la detección de cambios en la localización del transportador por el método de microscopía confocal cuantitativa, tanto en intestino de rata (sección 2.4.3) como en células Caco-2 (sección 4.4.1.3). Esta validación metodológica resultó de gran significación, ya que en los experimentos subsiguientes hubiera sido dificultoso demostrar el efecto de los diferentes

tratamientos sobre la localización de MRP2 a través del método de fraccionamiento de membranas seguido de western blot dada la complejidad de los modelos utilizados.

Habiendo demostrado la posibilidad de una regulación aguda de MRP2 intestinal, el siguiente paso fue diseñar un modelo *in vivo* con irrigación e inervación conservada que permita medir cambios en la localización y actividad de MRP2 en respuesta al estímulo de nutrientes administrados intraluminalmente (sección 3.3.2 y Figura 3.1). Para probar el funcionamiento del modelo utilizamos el recientemente convalidado regulador de MRP2 dbcAMP (Figura 3.2a), administrado por vía endovenosa a una dosis que se sabe efectiva, al menos en otro órgano de alta perfusión como el hígado (Mottino y col., 2002). El efecto diferencial de los agentes administrados intraluminalmente sobre la actividad de MRP2 (Figura 3.2b) concuerda con evidencia previa que sostiene que la secreción de GLP-2 depende de la composición específica de nutrientes de la dieta (Dubé y Brubaker, 2004). La glucosa mostró un efecto dosis-dependiente, con un ligero efecto a 10 mM que alcanzó significancia estadística a la concentración de 100 mM (Figura 3.2b). Reparando en que la concentración intrayeyunal posprandial de glucosa oscila entre 0,4 mM y 24 mM en la rata y entre 0,5 mM y 40 mM en el hombre según se trate de yeyuno distal o proximal (Soergel, 1993), la relevancia fisiológica del hallazgo observado a la concentración 100 mM resulta cuestionable. El desoxicolato estuvo dentro de la lista de agentes evaluados debido a que se espera un contacto directo de esta sal biliar con las células L en períodos posprandiales. En nuestras condiciones experimentales resultó incapaz de modular la actividad de MRP2 (Figura 3.2b),

algo relativamente insospechado teniendo en cuenta su capacidad de estimular las células L en humanos a la misma concentración a la que lo evaluamos (Adrian y col., 1993). Explicaciones posibles de estas diferencias incluyen un aumento insuficiente en los niveles de GLP-2, la administración de desoxicolato en regiones diferentes (colon sigmoide vs. yeyuno distal) y la variabilidad en la respuesta entre diferentes especies. El trabajo de Reimann y col. (2004) demostrando la capacidad de la glutamina 10 mM como secretor de GLP-1 en un modelo *in vitro* justificó su inclusión dentro de la lista de nutrientes a evaluar. Sin embargo, nuestros resultados negativos (Figura 3.2b) concuerdan con estudios *in vivo* en los que se descarta un efecto estimulador de parte de proteínas y aminoácidos sobre la secreción de GLP-2 (Elliott y col., 1993; Xiao y col., 1999). Interesantemente, la actividad de MRP2 en yeyuno proximal de ratas que recibieron solución fisiológica en yeyuno distal (grupo control) fue significativamente mayor que la obtenida en ratas a las que no se le administró ninguna solución (grupo control [vacío]) (Figura 3.2b). Este hallazgo sugiere que el simple llenado del intestino es capaz de gatillar una señal que produce un aumento rápido en la actividad de transporte de MRP2. El desconocimiento del mecanismo subyacente a este fenómeno amerita posteriores estudios. Finalmente, el aumento máximo en la actividad de MRP2 fue registrado luego del tratamiento con ácido oleico (Figura 3.2b) a una concentración fisiológicamente relevante (Iakoubov y col., 2011), lo que erigió a este nutriente como el prototipo a utilizar durante el resto de los estudios correspondientes al capítulo 3. Este aumento en la actividad de transporte estuvo asociado a un efecto proinsertor de MRP2 en la membrana apical, evidenciado por un pico

agudo, desplazado hacia el extremo apical del enterocito y una señal más débil en regiones intracelulares (Figura 3.3).

La participación de GLP-2 en el efecto del ácido oleico sobre la actividad (Figura 3.2c) y la localización (Figura 3.3) de MRP2 fue demostrada empleando la técnica de inmunoneutralización, originalmente reportada en un trabajo que vinculó a GLP-2 con el crecimiento intestinal asociado a la diabetes mellitus experimental inducida por estreptozotocina (Hartmann y col., 2002). Este hallazgo, confirmado por el efecto de GLP-2 administrado endovenosamente sobre la actividad de MRP2 (Figura 3.2c), representa un nuevo ítem en la creciente lista de funciones biológicas de GLP-2 a nivel intestinal (sección 1.1.5.2). En cuanto al mecanismo molecular cascada abajo de GLP-2, se descartó la participación de IGF-1 (Figura 3.2d). Este factor de crecimiento, si bien está estrechamente vinculado a la acción de GLP-2, parece mediar exclusivamente efectos a largo plazo relacionados con proliferación y crecimiento intestinal (Dubé y col., 2006). De acuerdo con los resultados obtenidos utilizando el inhibidor APCP, la formación extracelular de adenosina por parte de CD73 demostró ser clave en el efecto del ácido oleico y de GLP-2 sobre la actividad de MRP2 (Figura 3.2d). Cabe destacar que con esta última estrategia experimental se tienen en consideración tanto al ATP como al cAMP como posibles sustratos iniciales en la cascada que culmina con la formación de adenosina CD73-dependiente (ver sección 3.2.3 y Figura 5.1). Finalmente, la transmisión de la señal desde el yeyuno distal al yeyuno proximal dependió de la preservación de la estructura y continuidad del intestino y pareció prescindir de la circulación sistémica (Figura 3.2e). Teniendo en cuenta tanto la expresión

de GLP-2R en neuronas del sistema nervioso entérico (Dubé y Brubaker, 2007) como la profunda invasión de las células epiteliales intestinales por parte de estas neuronas (Bjerknes y col., 2001), la hipótesis de una transmisión de la señal de GLP-2 a través de las múltiples neuronas de los plexos submucoso o mientérico parece la más verosímil. La Figura 5.1 ilustra sólo una de las posibilidades, ya que no pueden descartarse otras alternativas más complejas a la representada, como por ejemplo la participación de más de un tipo neuronal. En este sentido, la transmisión de señales en sentido caudal-oral puede involucrar a neuronas aferentes intrínsecas primarias, interneuronas ascendentes y neuronas motoras (Mazzone y Farrugia, 2007). Experimentos adicionales incluyendo bloqueos de la transmisión neuronal podrán contribuir al esclarecimiento de esta situación.

En el último capítulo de este trabajo y utilizando la línea celular Caco-2, demostramos que el tratamiento agudo con adenosina produjo un aumento significativo en la actividad de MRP2 (Figura 4.4b) que se vio acompañado de una clara inserción apical del transportador (Figura 4.5). En ambos casos, los efectos fueron similares a los producidos por dbcAMP (Figura 4.1b y Figura 4.2). Estos hallazgos complementan los obtenidos en el modelo *in vivo* (Figura 3.2d), demostrando por primera vez su capacidad moduladora de MRP2 intestinal, tanto de origen murino como humano. Interesantemente, los niveles de adenosina intersticiales en el yeyuno están aumentados hasta dos órdenes de magnitud durante períodos posingesta, fenómeno hasta el momento asociado a la hiperemia yeyunal posprandial (Sawmiller y Chou, 1992; Li y col., 2004). En virtud de nuestros hallazgos, podemos sugerir que el aumento en los niveles de

adenosina secundario a la ingesta no sólo tiene como objetivo aumentar el flujo sanguíneo intestinal sino que también contribuye a aumentar la función de barrera intestinal que provee MRP2.

El efecto de la adenosina en los cambios de localización y de actividad de MRP2 en las células Caco-2 estuvo mediado por A_{2B}AR (Figura 4.4 y Figura 4.5). Dentro de los receptores de adenosina, A_{2B}AR es el más importante a nivel intestinal y se expresa, entre otros sitios, a nivel epitelial (Strohmeier y col., 1995; Christofi, 2008). Debido a su acoplamiento con G_s, es esperable un aumento en la síntesis de cAMP por parte de adenilato ciclasa luego de la activación. De hecho, en estudios utilizando monocapas de células epiteliales intestinales T84, se demostró que la activación del eje A_{2B}AR/cAMP/PKA por adenosina estimula la secreción polarizada de la citoquina proinflamatoria IL-6 hacia el compartimiento apical (Sitaraman y col., 2001). Teniendo en cuenta que numerosos compuestos con actividad proinflamatoria como prostaglandinas o leucotrienos son sustratos de MRP2 (Tabla 1.1), existe la posibilidad de que la regulación descrita en este trabajo de tesis también pueda tener lugar en condiciones fisiopatológicas, en este caso en particular orientada a dar una respuesta rápida ante la amenaza de patógenos en el tracto gastrointestinal. En nuestras condiciones experimentales los niveles intracelulares de cAMP también se vieron incrementados significativamente en respuesta a adenosina; específicamente en un 30% de aumento luego de un tratamiento de 15 minutos (Figura 4.6). Debido a la fuerte influencia de la duración del tratamiento en los niveles de cAMP intracelular (Tocchetti y col., 2018b), es posible que pueda detectarse un efecto mayor luego de exposiciones a adenosina más breves o más prolongadas que la realizada en

este experimento en particular. Aunque en forma parcial, la participación de PKA en el efecto de la adenosina sobre la actividad de MRP2 fue sugerida por los resultados de los experimentos utilizando el inhibidor KT5720 (Figura 4.4). En este sentido, es importante resaltar que el aumento en cAMP no sólo conduce a la activación de PKA sino que también puede aumentar la actividad de otras quinasas como Epac (del inglés *Exchange protein activated by cAMP*), fosfoinositol 3-quinasa o p38 MAPK, todas ellas capaces de modular de forma aguda la localización de MRP2 en modelos de hígado (Crocenzi y col., 2012). Luego de la realización de estudios adicionales podremos aclarar si sólo PKA o también alguna otra quinasa media el efecto de adenosina cascada abajo de cAMP.

Nuestro modelo *in vivo* permitió evaluar únicamente el efecto de GLP-2 producido por estimulación directa de las células L por parte de los nutrientes, excluyendo la secreción previa de esta hormona por mecanismos indirectos en respuesta a la presencia de nutrientes en yeyuno proximal. Por este motivo, en la situación fisiológica concreta correspondiente a la ingesta se esperaría una secreción de GLP-2 no sólo más cuantiosa sino que también más temprana, presumiblemente adelantando el efecto sobre MRP2 en la escala temporal. En cuanto a los tiempos de permanencia de los nutrientes en el intestino delgado, se estima un tiempo de tránsito de entre 1 y 4 horas, independientemente de que se trate de alimentos sólidos o líquidos (Dressman y col., 1998). Comparativamente, la celeridad del efecto que describimos permitiría potenciar la función de barrera intestinal en un plazo adecuado.

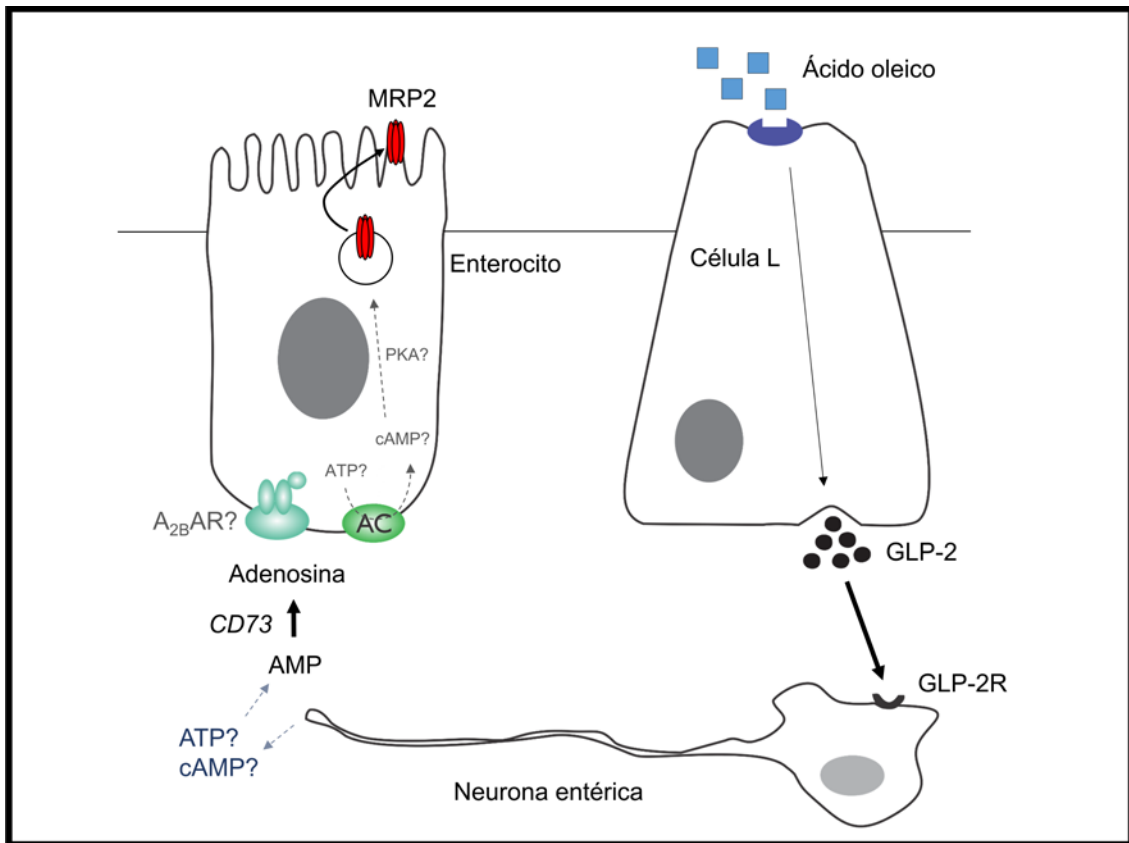


Figura 5.1. Secuencia probable de eventos en la regulación de MRP2 por ácido oleico. Luego de la ingesta, el ácido oleico intraluminal actúa directamente sobre las células L intestinales produciéndose una liberación de GLP-2 hacia el polo basolateral. GLP-2 a su vez se une a su receptor presente en neuronas entéricas, las cuales directa o indirectamente liberan uno o más de los posibles precursores de adenosina. La enzima CD73 cataliza la conversión extracelular de AMP a adenosina, un nucleósido capaz de aumentar la inserción y la actividad de MRP2 en el enterocito. La participación de los mediadores en color gris (A_{2B}AR, cAMP y PKA) ha sido demostrada utilizando un modelo diferente (células Caco-2), por lo que estos resultados deben interpretarse con cautela.

La conclusión de nuestro trabajo se resume en la Figura 5.1. Luego de la ingesta, la llegada al intestino de nutrientes como el ácido oleico gatillarían la liberación de GLP-2 por parte de células enteroendocrinas L, presumiblemente tanto por mecanismos indirectos como directos. GLP-2, liberado a través de la membrana basolateral hacia el intersticio, activaría a su receptor localizado en neuronas entéricas. Como consecuencia, se generaría y transmitiría una señal a través de la pared intestinal, involucrando a una o varias neuronas. Posiblemente sean

estas neuronas quienes secreten algún precursor del AMP, como ATP o cAMP, aunque no se descarta la intervención de algún otro tipo celular presente en las inmediaciones del enterocito. El AMP sería hidrolizado por acción de CD73 dando lugar a adenosina, la cual activaría directamente a su receptor A_{2B}AR localizado en la membrana basolateral enterocitaria. Esta activación conduciría a un aumento en las concentraciones intracelulares de cAMP, el cual estimularía la inserción de MRP2 en la membrana apical desde reservorios intracelulares a través de un proceso exocítico mediado al menos en parte por PKA. El aumento en la densidad de MRP2 en la membrana apical se traduciría en un aumento en la actividad de transporte y por ende en la capacidad de expulsar de regreso a la luz intestinal compuestos tóxicos presentes en la dieta o sus metabolitos. Este fenómeno implicaría también una menor cantidad de MRP2 localizada en la membrana apical y por ende menor actividad en períodos de ayuno. Este fenómeno evitaría la innecesaria secreción a la luz intestinal de sustratos como leucotrienos y prostaglandinas, asociados a inflamación y quimiotaxis de leucocitos hacia la luz intestinal. Más importante aún, permitiría ahorrar energía metabólica (ATP) y evitar la secreción de sustratos valiosos para la célula como glutatión, imprescindibles para el mantenimiento la homeostasis celular.

REFERENCIAS

- Abe H, Okuda K (1975) Biliary excretion of conjugated sulfobromophtalein (BSP) in constitutional conjugated hyperbilirubinemias. *Digestion* **13**, 272-283.
- Adrian TE, Ballantyne GH, Longo WE, Bilchik AJ, Graham S, Basson MD, Tierney RP, Modlin IM (1993) Deoxycholate is an important releaser of peptide YY and enteroglucagon from the human colon. *Gut* **34**, 1219-1224.
- Anini Y, Brubaker PL (2003) Muscarinic receptors control glucagon-like peptide 1 secretion by human endocrine L cells. *Endocrinology* **144**, 3244-3250.
- Anini Y, Hansotia T, Brubaker PL (2002) Muscarinic receptors control postprandial release of glucagon-like peptide-1: in vivo and in vitro studies in rats. *Endocrinology* **143**, 2420-2426.
- Anwer MS (2014) Role of protein kinase C isoforms in bile formation and cholestasis. *Hepatology* **60**, 1090-1097.
- Arana MR, Tocchetti GN, Rigalli JP, Mottino AD, Villanueva SS (2016) Physiological and pathophysiological factors affecting the expression and activity of the drug transporter MRP2 in intestine. Impact of its function as membrane barrier. *Pharmacol Res* **109**, 32-44.
- Arana MR, Tocchetti GN, Zecchinati F, Londero AS, Domínguez C, Perdomo V, Rigalli JP, Villanueva SSM, Mottino AD (2017) Glucagon-like peptide 2 prevents down-regulation of intestinal multidrug resistance-associated protein 2 and P-glycoprotein in endotoxemic rats. *Toxicology* **390**, 22-31.
- Arias A, Villanueva SS, Ruiz ML, Luquita MG, Veggi LM, Pellegrino JM, Vore M, Catania VA, Mottino AD (2009) Regulation of expression and activity of rat intestinal multidrug resistance-associated protein 2 by cholestatic estrogens. *Drug Metab Dispos* **37**, 1277-1285.
- Balks HJ, Holst JJ, von zur Mühlen A, Brabant G (1997) Rapid oscillations in plasma glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in humans: cholinergic control of GLP-1 secretion via muscarinic receptors. *J Clin Endocrinol Metab* **82**, 786-790.
- Benjamin MA, McKay DM, Yang PC, Cameron H, Perdue MH (2000) Glucagon-like peptide-2 enhances intestinal epithelial barrier function of both transcellular and paracellular pathways in the mouse. *Gut* **47**, 112-119.
- Berger V, Gabriel AF, Sergent T, Trouet A, Larondelle Y, Schneider YJ (2003) Interaction of ochratoxin A with human intestinal Caco-2 cells: possible implication of a multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2). *Toxicol Lett* **140-141**, 465-476.
- Beysen C, Karpe F, Fielding BA, Clark A, Levy JC, Frayn KN (2002) Interaction between specific fatty acids, GLP-1 and insulin secretion in humans. *Diabetologia* **45**, 1533-1541.
- Bjerknes M, Cheng H (2001) Modulation of specific intestinal epithelial progenitors by enteric neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 12497-12502.

- Bohlen HG (1998) Mechanism of increased vessel wall nitric oxide concentrations during intestinal absorption. *Am J Physiol* **275**, H542-H550.
- Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J (1999) The multidrug resistance protein family. *Biochim Biophys Acta* **1461**, 347-357.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Brubaker PL, Izzo A, Hill M, Drucker DJ (1997) Intestinal function in mice with small bowel growth induced by glucagon-like peptide-2. *Am J Physiol* **272**, E1050-E1058.
- Büchler M, König J, Brom M, Kartenbeck J, Spring H, Horie T, Keppler D (1996) cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats. *J Biol Chem* **271**, 15091-15098.
- Burnstock G (2009) Purinergic cotransmission. *Exp Physiol* **94**, 20-24.
- Cao X, Gibbs ST, Fang L, Miller HA, Landowski CP, Shin HC, Lennernas H, Zhong Y, Amidon GL, Yu LX, Sun D (2006) Why is it challenging to predict intestinal drug absorption and oral bioavailability in human using rat model. *Pharm Res* **23**, 1675-1686.
- Cardoso AM, Schetinger MR, Correia-de-Sá P, Sévigny J (2015) Impact of ectonucleotidases in autonomic nervous functions. *Auton Neurosci* **191**, 25-38.
- Chance WT, Foley-Nelson T, Thomas I, Balasubramaniam A (1997) Prevention of parenteral nutrition-induced gut hypoplasia by coinfusion of glucagon-like peptide-2. *Am J Physiol* **273**, G559-G563.
- Chandrasekharan BP, Kolachala VL, Dalmaso G, Merlin D, Ravid K, Sitaraman SV, Srinivasan S (2009) Adenosine 2B receptors (A(2B)AR) on enteric neurons regulate murine distal colonic motility. *FASEB J* **23**, 2727-2734.
- Chantret I, Barbat A, Dussaulx E, Brattain MG, Zweibaum A (1988) Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines. *Cancer Res* **48**, 1936-1942.
- Cheeseman CI (1997) Upregulation of SGLT-1 transport activity in rat jejunum induced by GLP-2 infusion in vivo. *Am J Physiol* **273**, R1965-R1971.
- Chen Z, Shi T, Zhang L, Zhu P, Deng M, Huang C, Hu T, Jiang L, Li J (2016) Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. *Cancer Lett* **370**, 153-164.
- Christofi FL (2008) Purinergic receptors and gastrointestinal secretomotor function. *Purinergic Signal* **4**, 213-236.
- Crocenzi FA, Sánchez Pozzi EJ, Ruiz ML, Zucchetti AE, Roma MG, Mottino AD, Vore M (2008) Ca(2+)-dependent protein kinase C isoforms are critical to estradiol 17beta-D-glucuronide-induced cholestasis in the rat. *Hepatology* **48**, 1885-1895.

Crocenzi FA, Zucchetti AE, Boaglio AC, Barosso IR, Sanchez Pozzi EJ, Mottino AD, Roma MG (2012) Localization status of hepatocellular transporters in cholestasis. *Front Biosci (Landmark Ed)* **17**, 1201-1218.

DaCabra MP, Yusta B, Sumner-Smith M, Crivici A, Drucker DJ, Brubaker PL (2000) Structural determinants for activity of glucagon-like peptide-2. *Biochemistry* **39**, 8888-8894.

Dahan A, Sabit H, Amidon GL (2009) Multiple efflux pumps are involved in the transepithelial transport of colchicine: combined effect of p-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein 2 leads to decreased intestinal absorption throughout the entire small intestine. *Drug Metab Dispos* **37**, 2028-2036.

de Waart DR, Paulusma CC, Kunne C, Oude Elferink RP (2006) Multidrug resistance associated protein 2 mediates transport of prostaglandin E2. *Liver Int* **26**, 362-368.

Di Pietro A, Conseil G, Pérez-Victoria JM, Dayan G, Baubichon-Cortay H, Trompier D, Steinfels E, Jault JM, de Wet H, Maitrejean M, Comte G, Boumendjel A, Mariotte AM, Dumontet C, McIntosh DB, Goffeau A, Castanys S, Gamarro F, Barron D (2002) Modulation by flavonoids of cell multidrug resistance mediated by P-glycoprotein and related ABC transporters. *Cell Mol Life Sci* **59**, 307-322.

Dietrich CG, de Waart DR, Ottenhoff R, Schoots IG, Elferink RP (2001) Increased bioavailability of the food-derived carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in MRP2-deficient rats. *Mol Pharmacol* **59**, 974-980.

Döring B, Petzinger E (2014) Phase 0 and phase III transport in various organs: combined concept of phases in xenobiotic transport and metabolism. *Drug Metab Rev* **46**, 261-282.

Dressman JB, Amidon GL, Reppas C, Shah VP (1998) Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. *Pharm Res* **15**, 11-22.

Drozdik M, Busch D, Lapczuk J, Müller J, Ostrowski M, Kurzawski M, Oswald S (2018) Protein abundance of clinically relevant drug transporters in the human liver and intestine: a comparative analysis in paired tissue specimens. *Clin Pharmacol Ther* doi: 10.1002/cpt.1301 [Epub ahead of print].

Drucker DJ (2005) Biologic actions and therapeutic potential of the proglucagon-derived peptides. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* **1**, 22-31.

Drucker DJ, Erlich P, Asa SL, Brubaker PL (1996) Induction of intestinal epithelial proliferation by glucagon-like peptide 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7911-7916.

Drucker DJ, Yusta B (2014) Physiology and pharmacology of the enteroendocrine hormone glucagon-like peptide-2. *Annu Rev Physiol* **76**, 561-583.

Dubé PE, Brubaker PL (2004) Nutrient, neural and endocrine control of glucagon-like peptide secretion. *Horm Metab Res* **36**, 755-760.

- Dubé PE, Brubaker PL (2007) Frontiers in glucagon-like peptide-2: multiple actions, multiple mediators. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **293**, E460-E465.
- Dubé PE, Forse CL, Bahrami J, Brubaker PL (2006) The essential role of insulin-like growth factor-1 in the intestinal tropic effects of glucagon-like peptide-2 in mice. *Gastroenterology* **131**, 589-605.
- Dubé PE, Rowland KJ, Brubaker PL (2008) Glucagon-like peptide-2 activates beta-catenin signaling in the mouse intestinal crypt: role of insulin-like growth factor-I. *Endocrinology* **149**, 291-301.
- Dubin IN, Johnson FB (1954) Chronic idiopathic jaundice with unidentified pigment in liver cells; a new clinicopathologic entity with a report of 12 cases. *Medicine (Baltimore)* **33**, 155-197.
- Dumoulin V, Moro F, Barcelo A, Dakka T, Cuber JC (1998) Peptide YY, glucagon-like peptide-1, and neurotensin responses to luminal factors in the isolated vascularly perfused rat ileum. *Endocrinology* **139**, 3780-3786.
- Eissele R, Göke R, Willemer S, Harthus HP, Vermeer H, Arnold R, Göke B (1992) Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. *Eur J Clin Invest* **22**, 283-291.
- Elliot JL, Oldham JM, Ambler GR, Molan PC, Spencer GS, Hodgkinson SC, Breier BH, Gluckman PD, Suttie JM, Bass JJ (1993) Receptors for insulin-like growth factor-II in the growing tip of the deer antler. *J Endocrinol* **138**, 233-242.
- El-Sheikh AA, van den Heuvel JJ, Koenderink JB, Russel FG (2007) Interaction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with multidrug resistance protein (MRP) 2/ABCC2- and MRP4/ABCC4-mediated methotrexate transport. *J Pharmacol Exp Ther* **320**, 229-235.
- Englund G, Rorsman F, Rönnblom A, Karlbom U, Lazorova L, Gråsjö J, Kindmark A, Artursson P (2006) Regional levels of drug transporters along the human intestinal tract: co-expression of ABC and SLC transporters and comparison with Caco-2 cells. *Eur J Pharm Sci* **29**, 269-277.
- Estudante M, Morais JG, Soveral G, Benet LZ (2013) Intestinal drug transporters: an overview. *Adv Drug Deliv Rev* **65**, 1340-1356.
- Fell BF, Smith KA, Campbell RM (1963) Hypertrophic and hyperplastic changes in the alimentary canal of the lactating rat. *J Pathol Bacteriol* **85**, 179-188.
- Fogh J, Wright WC, Loveless JD (1977) Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst* **58**, 209-214.
- Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J (2001) International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* **53**, 527-552.
- Fu-Cheng X, Anini Y, Chariot J, Castex N, Galmiche JP, Rozé C (1997) Mechanisms of peptide YY release induced by an intraduodenal meal in rats: neural regulation by proximal gut. *Pflugers Arch* **433**, 571-579.

- Giron MC, Bin A, Brun P, Etteri S, Bolego C, Florio C, Gaion RM (2008) Cyclic AMP in rat ileum: evidence for the presence of an extracellular cyclic AMP-adenosine pathway. *Gastroenterology* **134**, 1116-1126.
- Gondolesi G, Ramisch D, Padin J, Almau H, Sandi M, Schelotto PB, Fernandez A, Rumbo C, Solar H (2012) What is the normal small bowel length in humans? First donor-based cohort analysis. *Am J Transplant* **12**, S49-S54.
- Gotoh Y, Suzuki H, Kinoshita S, Hirohashi T, Kato Y, Sugiyama Y (2000) Involvement of an organic anion transporter (canalicular multispecific organic anion transporter/multidrug resistance-associated protein 2) in gastrointestinal secretion of glutathione conjugates in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **292**, 433-439.
- Granger HJ, Norris CP (1980) Role of adenosine in local control of intestinal circulation in the dog. *Circ Res* **46**, 764-770.
- Guan X, Karpen HE, Stephens J, Bukowski JT, Niu S, Zhang G, Stoll B, Finegold MJ, Holst JJ, Hadsell D, Nichols BL, Burrin DG (2006) GLP-2 receptor localizes to enteric neurons and endocrine cells expressing vasoactive peptides and mediates increased blood flow. *Gastroenterology* **130**, 150-164.
- Hansen L, Hartmann B, Mineo H, Holst JJ (2004) Glucagon-like peptide-1 secretion is influenced by perfusate glucose concentration and by a feedback mechanism involving somatostatin in isolated perfused porcine ileum. *Regul Pept* **118**, 11-18.
- Hartmann B, Harr MB, Jeppesen PB, Wojdemann M, Deacon CF, Mortensen PB, Holst JJ (2000) In vivo and in vitro degradation of glucagon-like peptide-2 in humans. *J Clin Endocrinol Metab* **85**, 2884-2888.
- Hartmann B, Thulesen J, Hare KJ, Kissow H, Orskov C, Poulsen SS, Holst JJ (2002) Immunoneutralization of endogenous glucagon-like peptide-2 reduces adaptive intestinal growth in diabetic rats. *Regul Pept* **105**, 173-179.
- Helander HF, Fändriks L (2014) Surface area of the digestive tract – revisited. *Scand J Gastroenterol* **49**, 681-689.
- Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT (1989) Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* **96**, 736-749.
- Hilgendorf C, Ahlin G, Seithel A, Artursson P, Ungell AL, Karlsson J (2007) Expression of thirty-six drug transporter genes in human intestine, liver, kidney, and organotypic cell lines. *Drug Metab Dispos* **35**, 1333-1340.
- Hilgers AR, Conradi RA, Burton PS (1990) Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa. *Pharm Res* **7**, 902-910.
- Hinchman CA, Matsumoto H, Simmons TW, Ballatori N (1991) Intrahepatic conversion of a glutathione conjugate to its mercapturic acid. Metabolism of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene in isolated perfused rat and guinea pig livers. *J Biol Chem* **266**, 22179-22185.
- Howarth GS (2003) Insulin-like growth factor-I and the gastrointestinal system: therapeutic indications and safety implications. *J Nutr* **133**, 2109-2112.

- Huang X, Gai Y, Yang N, Lu B, Samuel CS, Thannickal VJ, Zhou Y (2011) Relaxin regulates myofibroblast contractility and protects against lung fibrosis. *Am J Pathol* **179**, 2751-2765.
- Hubatsch I, Ragnarsson EG, Artursson P (2007) Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nat Protoc* **2**, 2111-2119.
- Iakoubov R, Ahmed A, Lauffer LM, Bazinet RP, Brubaker PL (2011) Essential role for protein kinase C ζ in oleic acid-induced glucagon-like peptide-1 secretion in vivo in the rat. *Endocrinology* **152**, 1244-1252.
- Jacobs LR, Bloom SR, Dowling RH (1981) Response of plasma and tissue levels of enteroglucagon immunoreactivity to intestinal resection, lactation and hyperphagia. *Life Sci* **29**, 2003-2007.
- Jansen PL, van Klinken JW, van Gelder M, Ottenhoff R, Elferink RP (1993) Preserved organic anion transport in mutant TR- rats with a hepatobiliary secretion defect. *Am J Physiol* **265**, G445-G452.
- Jeppesen PB, Hartmann B, Thulesen J, Graff J, Lohmann J, Hansen BS, Tofteng F, Poulsen SS, Madsen JL, Holst JJ, Mortensen PB (2001) Glucagon-like peptide 2 improves nutrient absorption and nutritional status in short-bowel patients with no colon. *Gastroenterology* **120**, 806-815.
- Jeppesen PB, Sanguinetti EL, Buchman A, Howard L, Scolapio JS, Ziegler TR, Gregory J, Tappenden KA, Holst J, Mortensen PB (2005) Teduglutide (ALX-0600), a dipeptidyl peptidase IV resistant glucagon-like peptide 2 analogue, improves intestinal function in short-bowel syndrome patients. *Gut* **54**, 1224-1231.
- Kartenbeck J, Leuschner U, Mayer R, Keppler D (1996) Absence of the canalicular isoform of the MRP gene-encoded conjugate export pump from the hepatocytes in Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology* **23**, 1061-1066.
- Kato Y, Yu D, Schwartz MZ (1999) Glucagonlike peptide-2 enhances small intestinal absorptive function and mucosal mass in vivo. *J Pediatr Surg* **34**, 18-20.
- Keppler D, König J (1997) Hepatic canalicular membrane 5: Expression and localization of the conjugate export pump encoded by the MRP2 (cMRP/cMOAT) gene in liver. *FASEB J* **11**, 509-516.
- Kessler M, Acuto O, Storelli C, Murer H, Müller M, Semenza G (1978) A modified procedure for the rapid preparation of efficiently transporting vesicles from small intestinal brush border membranes. Their use in investigating some properties of D-glucose and choline transport systems. *Biochim Biophys Acta* **506**, 136-154.
- Kim ES, Keam SJ (2017) Teduglutide: A Review in Short Bowel Syndrome. *Drugs* **77**, 345-352.
- Kolachala VL, Obertone TS, Wang L, Merlin D, Sitaraman SV (2006) Adenosine 2b receptor (A2bR) signals through adenylate cyclase (AC) 6 isoform in the intestinal epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* **1760**, 1102-1108.

- Kong MF, Chapman I, Goble E, Wishart J, Wittert G, Morris H, Horowitz M (1999) Effects of oral fructose and glucose on plasma GLP-1 and appetite in normal subjects. *Peptides* **20**, 545-551.
- König J, Nies AT, Cui Y, Leier I, Keppler D (1999) Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim Biophys Acta* **1461**, 377-394.
- Kubitz R, Helmer A, Häussinger D (2005) Biliary transport systems: short-term regulation. *Methods Enzymol* **400**, 545-557.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Layer P, Holst JJ, Grandt D, Goebell H (1995) Ileal release of glucagon-like peptide-1 (GLP-1). Association with inhibition of gastric acid secretion in humans. *Dig Dis Sci* **40**, 1074-1082.
- Lee J, Koehler J, Yusta B, Bahrami J, Matthews D, Rafii M, Pencharz PB, Drucker DJ (2017) Enteroendocrine-derived glucagon-like peptide-2 controls intestinal amino acid transport. *Mol Metab* **6**, 245-255.
- Li N, Harris PD, Zakaria el R, Matheson PJ, Garrison RN (2004) Microvascular responses to adenosine help explain functional and pathologic differences between intestinal segments. *Am J Surg* **188**, 526-531.
- Lindahl A, Sjöberg A, Bredberg U, Toreson H, Ungell AL, Lennernäs H (2004) Regional intestinal absorption and biliary excretion of fluvastatin in the rat: possible involvement of mrp2. *Mol Pharm* **1**, 347-356.
- Lindenmaier H, Becker M, Haefeli WE, Weiss J (2005) Interaction of progestins with the human multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2). *Drug Metab Dispos* **33**, 1576-1579.
- Litvak DA, Hellmich MR, Evers BM, Banker NA, Townsend CM Jr (1998) Glucagon-like peptide 2 is a potent growth factor for small intestine and colon. *J Gastrointest Surg* **2**, 146-150.
- Lovshin J, Yusta B, Iliopoulos I, Migirdicyan A, Dableh L, Brubaker PL, Drucker DJ (2000) Ontogeny of the glucagon-like peptide-2 receptor axis in the developing rat intestine. *Endocrinology* **141**, 4194-4201.
- Lovshin JA, Huang Q, Seaberg R, Brubaker PL, Drucker DJ (2004) Extrahypothalamic expression of the glucagon-like peptide-2 receptor is coupled to reduction of glutamate-induced cell death in cultured hippocampal cells. *Endocrinology* **145**, 3495-3506.
- Lund PK (1998) Molecular basis of intestinal adaptation: the role of the insulin-like growth factor system. *Ann N Y Acad Sci* **859**, 18-36.
- Luquita MG, Catania VA, Sánchez Pozzi EJ, Vore M, Veggi LM, Pellegrino JM, Mottino AD (1999) Induction of phase II biotransformation reactions in rat jejunum during lactation. Possible involvement of prolactin. *Biochim Biophys Acta* **1472**, 82-92.

- Matheson PJ, Li N, Harris PD, Zakaria el R, Garrison RN (2011) Glucose-induced intestinal vasodilation via adenosine A1 receptors requires nitric oxide but not K(+)(ATP) channels. *J Surg Res* **168**, 179-187.
- Mayo KE, Miller LJ, Bataille D, Dalle S, Göke B, Thorens B, Drucker DJ (2003) International Union of Pharmacology. XXXV. The glucagon receptor family. *Pharmacol Rev* **55**, 167-194.
- Mazzone A, Farrugia G (2007) Evolving concepts in the cellular control of gastrointestinal motility: neurogastroenterology and enteric sciences. *Gastroenterol Clin North Am* **36**, 499-513.
- Meyers M, Slikker W, Pascoe G, Vore M (1980) Characterization of cholestasis induced by estradiol-17 beta-D-glucuronide in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* **214**, 87-93.
- Miller DS (2015) Regulation of ABC transporters blood-brain barrier: the good, the bad and the ugly. *Adv Cancer Res* **125**, 43-70.
- Miszczuk GS, Barosso IR, Zucchetti AE, Boaglio AC, Pellegrino JM, Sánchez Pozzi EJ, Roma MG, Crocenzi FA (2015) Sandwich-cultured rat hepatocytes as an in vitro model to study canalicular transport alterations in cholestasis. *Arch Toxicol* **89**, 979-990.
- Mottino AD, Cao J, Veggi LM, Crocenzi F, Roma MG, Vore M (2002) Altered localization and activity of canalicular Mrp2 in estradiol-17beta-D-glucuronide-induced cholestasis. *Hepatology* **35**, 1409-1419.
- Mottino AD, Crocenzi FA, Pozzi EJ, Veggi LM, Roma MG, Vore M (2005) Role of microtubules in estradiol-17beta-D-glucuronide-induced alteration of canalicular Mrp2 localization and activity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **288**, G327-G336.
- Mottino AD, Hoffman T, Jennes L, Cao J, Vore M (2001) Expression of multidrug resistance-associated protein 2 in small intestine from pregnant and postpartum rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **280**, G1261-G1273.
- Mottino AD, Hoffman T, Jennes L, Vore M (2000) Expression and localization of multidrug resistant protein mrp2 in rat small intestine. *J Pharmacol Exp Ther* **293**, 717-723.
- Munroe DG, Gupta AK, Kooshesh F, Vyas TB, Rizkalla G, Wang H, Demchyshyn L, Yang ZJ, Kamboj RK, Chen H, McCallum K, Sumner-Smith M, Drucker DJ, Crivici A (1999) Prototypic G protein-coupled receptor for the intestinotrophic factor glucagon-like peptide 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1569-1573.
- Nakamura T, Sakaeda T, Ohmoto N, Tamura T, Aoyama N, Shirakawa T, Kamigaki T, Nakamura T, Kim KI, Kim SR, Kuroda Y, Matsuo M, Kasuga M, Okumura K (2002) Real-time quantitative polymerase chain reaction for MDR1, MRP1, MRP2, and CYP3A-mRNA levels in Caco-2 cell lines, human duodenal enterocytes, normal colorectal tissues, and colorectal adenocarcinomas. *Drug Metab Dispos* **30**, 4-6.

Nakano T, Sekine S, Ito K, Horie T (2009) Correlation between apical localization of Abcc2/Mrp2 and phosphorylation status of ezrin in rat intestine. *Drug Metab Dispos* **37**, 1521-1527.

National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (2011) *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, 8^o Ed., National Academies Press (US).

Paulusma CC, Kool M, Bosma PJ, Scheffer GL, ter Borg F, Scheper RJ, Tytgat GN, Borst P, Baas F, Oude Elferink RP (1997) A mutation in the human canalicular multispecific organic anion transporter gene causes the Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology* **25**, 1539-1542.

Pinkus LM, Ketley JN, Jakoby WB (1977) The glutathione S-transferases as a possible detoxification system of rat intestinal epithelium. *Biochem Pharmacol* **26**, 2359-2363.

Proctor KG (1986) Possible role for adenosine in local regulation of absorptive hyperemia in rat intestine. *Circ Res* **59**, 474-481.

Proctor KG (1987) Intestinal arteriolar responses to mucosal and serosal applications of adenosine analogues. *Circ Res* **61**, 187-193.

Reimann F, Gribble FM (2002) Glucose-sensing in glucagon-like peptide-1-secreting cells. *Diabetes* **51**, 2757-2763.

Reimann F, Williams L, da Silva Xavier G, Rutter GA, Gribble FM (2004) Glutamine potently stimulates glucagon-like peptide-1 secretion from GLUTag cells. *Diabetologia* **47**, 1592-1601.

Rocca AS, Brubaker PL (1999) Role of the vagus nerve in mediating proximal nutrient-induced glucagon-like peptide-1 secretion. *Endocrinology* **140**, 1687-1694.

Rocca AS, LaGreca J, Kalitsky J, Brubaker PL (2001) Monounsaturated fatty acid diets improve glycemic tolerance through increased secretion of glucagon-like peptide-1. *Endocrinology* **142**, 1148-1155.

Roelofsen H, Soroka CJ, Keppler D, Boyer JL (1998) Cyclic AMP stimulates sorting of the canalicular organic anion transporter (Mrp2/cMoat) to the apical domain in hepatocyte couplets. *J Cell Sci* **111**, 1137-1145.

Roma MG, Crocenzi FA, Mottino AD (2008) Dynamic localization of hepatocellular transporters in health and disease. *World J Gastroenterol* **14**, 6786-6801.

Roma MG, Milkiewicz P, Elias E, Coleman R (2000) Control by signaling modulators of the sorting of canalicular transporters in rat hepatocyte couplets: role of the cytoskeleton. *Hepatology* **32**, 1342-1356.

Salvo Romero E, Alonso Cotoner C, Pardo Camacho C, Casado Bedmar M, Vicario M (2015) The intestinal barrier function and its involvement in digestive disease. *Rev Esp Enferm Dig* **107**, 686-696.

Sawmiller DR, Chou CC (1992) Role of adenosine in postprandial and reactive hyperemia in canine jejunum. *Am J Physiol* **263**, G487-G493.

- Schexnayder C, Stratford RE (2015) Genistein and Glyceollin Effects on ABCC2 (MRP2) and ABCG2 (BCRP) in Caco-2 cells. *Int J Environ Res Public Health* **13**, ijerph13010017.
- Schonhoff CM, Webster CR, Anwer MS (2010) Cyclic AMP stimulates Mrp2 translocation by activating p38 α MAPK in hepatic cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **298**, G667-G674.
- Schricks J, Lektarau Y, Fink-Gremmels J (2006) Ochratoxin A secretion by ATP-dependent membrane transporters in Caco-2 cells. *Arch Toxicol* **80**, 243-249.
- Sekine S, Ito K, Horie T (2008) Canalicular Mrp2 localization is reversibly regulated by the intracellular redox status. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **295**, G1035-G1041.
- Sekine S, Ito K, Saeki J, Horie T (2011) Interaction of Mrp2 with radixin causes reversible canalicular Mrp2 localization induced by intracellular redox status. *Biochim Biophys Acta* **1812**, 1427-1434.
- Shin ED, Estall JL, Izzo A, Drucker DJ, Brubaker PL (2005) Mucosal adaptation to enteral nutrients is dependent on the physiologic actions of glucagon-like peptide-2 in mice. *Gastroenterology* **128**, 1340-1353.
- Shin HC, Kim HR, Cho HJ, Yi H, Cho SM, Lee DG, Abd El-Aty AM, Kim JS, Sun D, Amidon GL (2009) Comparative gene expression of intestinal metabolizing enzymes. *Biopharm Drug Dispos* **30**, 411-421.
- Sitaraman SV, Merlin D, Wang L, Wong M, Gewirtz AT, Si-Tahar M, Madara JL (2001) Neutrophil-epithelial crosstalk at the intestinal luminal surface mediated by reciprocal secretion of adenosine and IL-6. *J Clin Invest* **107**, 861-869.
- Soergel KH (1993) Showdown at the tight junction. *Gastroenterology* **105**, 1247-1250.
- Sokolovsky M, Sadeh T, Patchornik A (1964) Nonenzymatic cleavages of peptide chains at the cysteine and serine residues through their conversion to dehydroalanine (DHAL). II. The specific chemical cleavage of cysteinyl peptides. *J Am Chem Soc* **86**, 1212-1217.
- Stephens J, Stoll B, Cottrell J, Chang X, Helmrath M, Burrin DG (2006) Glucagon-like peptide-2 acutely increases proximal small intestinal blood flow in TPN-fed neonatal piglets. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **290**, R283-R289.
- Stevens JS, Gray MC, Morisseau C, Criss AK (2018) Endocervical and Neutrophil Lipooxygenases Coordinate Neutrophil Transepithelial Migration to *Neisseria gonorrhoeae*. *J Infect Dis* **218**, 1663-1674.
- St-Pierre MV, Serrano MA, Macias RI, Dubs U, Hoehli M, Lauper U, Meier PJ, Marin JJ (2000) Expression of members of the multidrug resistance protein family in human term placenta. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **279**, R1495-R1503.
- Strohmeier GR, Lencer WI, Patapoff TW, Thompson LF, Carlson SL, Moe SJ, Carnes DK, Mrsny RJ, Madara JL (1997) Surface expression, polarization, and

functional significance of CD73 in human intestinal epithelia. *J Clin Invest* **99**, 2588-2601.

Strohmeier GR, Reppert SM, Lencer WI, Madara JL (1995) The A2b adenosine receptor mediates cAMP responses to adenosine receptor agonists in human intestinal epithelia. *J Biol Chem* **270**, 2387-2394.

Sugano K (2007) *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, 2^o Ed., Elsevier, Oxford, Vol. 5, pp. 453-487.

Taipalensuu J, Törnblom H, Lindberg G, Einarsson C, Sjöqvist F, Melhus H, Garberg P, Sjöström B, Lundgren B, Artursson P (2001) Correlation of gene expression of ten drug efflux proteins of the ATP-binding cassette transporter family in normal human jejunum and in human intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers. *J Pharmacol Exp Ther* **299**, 164-170.

Thelen K, Dressman JB (2009) Cytochrome P450-mediated metabolism in the human gut wall. *J Pharm Pharmacol* **61**, 541-558.

Tocchetti GN, Domínguez CJ, Zecchinati F, Arana MR, Ruiz ML, Villanueva SSM, Mottino AD, Weiss J, Rigalli JP (2018) Inhibition of multidrug resistance-associated 2 (MRP2) activity by the contraceptive noregestrol acetate in HepG2 and Caco-2 cells. *Eur J Pharm Sci* **122**, 205-213.

Tocchetti GN, Domínguez CJ, Zecchinati F, Arana MR, Ruiz ML, Villanueva SSM, Weiss J, Mottino AD, Rigalli JP (2018) Biphasic modulation of cAMP levels by the contraceptive noregestrol acetate. Impact on P-glycoprotein expression and activity in hepatic cells. *Biochem Pharmacol* **154**, 118-126.

Tocchetti GN, Rigalli JP, Arana MR, Villanueva SSM, Mottino AD (2016) Modulation of expression and activity of intestinal multidrug resistance-associated protein 2 by xenobiotics. *Toxicol Appl Pharmacol* **303**, 45-57.

Tsai CH, Hill M, Asa SL, Brubaker PL, Drucker DJ (1997) Intestinal growth-promoting properties of glucagon-like peptide-2 in mice. *Am J Physiol* **273**, E77-E84.

Tucker TG, Milne AM, Fournel-Gigleux S, Fenner KS, Coughtrie MW (2012) Absolute immunoquantification of the expression of ABC transporters P-glycoprotein, breast cancer resistance protein and multidrug resistance-associated protein 2 in human liver and duodenum. *Biochem Pharmacol* **83**, 279-285.

Van Aubel RA, Peters JG, Masereeuw R, Van Os CH, Russel FG (2000) Multidrug resistance protein mrp2 mediates ATP-dependent transport of classic renal organic anion p-aminohippurate. *Am J Physiol Renal Physiol* **279**, F713-F717.

Villanueva SS, Arias A, Ruiz ML, Rigalli JP, Pellegrino JM, Vore M, Catania VA, Mottino AD (2010) Induction of intestinal multidrug resistance-associated protein 2 by glucagon-like Peptide 2 in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* **335**, 332-341.

Villanueva SS, Perdomo VG, Ruiz ML, Rigalli JP, Arias A, Luquita MG, Vore M, Catania VA, Mottino AD (2012) Effect of glucagon-like peptide 2 on hepatic, renal,

and intestinal disposition of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene. *Drug Metab Dispos* **40**, 1252-1258.

Vore M, Liu Y, Huang L (1997) Cholestatic properties and hepatic transport of steroid glucuronides. *Drug Metab Rev* **29**, 183-203.

Walsh NA, Yusta B, DaCambra MP, Anini Y, Drucker DJ, Brubaker PL (2003) Glucagon-like peptide-2 receptor activation in the rat intestinal mucosa. *Endocrinology* **144**, 4385-4392.

Xiao Q, Boushey RP, Drucker DJ, Brubaker PL (1999) Secretion of the intestinotropic hormone glucagon-like peptide 2 is differentially regulated by nutrients in humans. *Gastroenterology* **117**, 99-105.

Yang Y, Qiu Y, Wang W, Xiao W, Liang H, Zhang C, Yang H, Teitelbaum DH, Sun LH, Yang H (2014) Adenosine A2B receptor modulates intestinal barrier function under hypoxic and ischemia/reperfusion conditions. *Int J Clin Exp Pathol* **7**, 2006-2018.

Yusta B, Boushey RP, Drucker DJ (2000) The glucagon-like peptide-2 receptor mediates direct inhibition of cellular apoptosis via a cAMP-dependent protein kinase-independent pathway. *J Biol Chem* **275**, 35345-35352.

Zamek-Gliszczyński MJ, Xiong H, Patel NJ, Turncliff RZ, Pollack GM, Brouwer KL (2003) Pharmacokinetics of 5 (and 6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein and its diacetate moiety in the liver. *J Pharmacol Exp Ther* **304**, 801-809.

Zelcer N, Huisman MT, Reid G, Wielinga P, Breedveld P, Kuil A, Knipscheer P, Schellens JH, Schinkel AH, Borst P (2003) Evidence for two interacting ligand binding sites in human multidrug resistance protein 2 (ATP binding cassette C2). *J Biol Chem* **278**, 23538-23544.