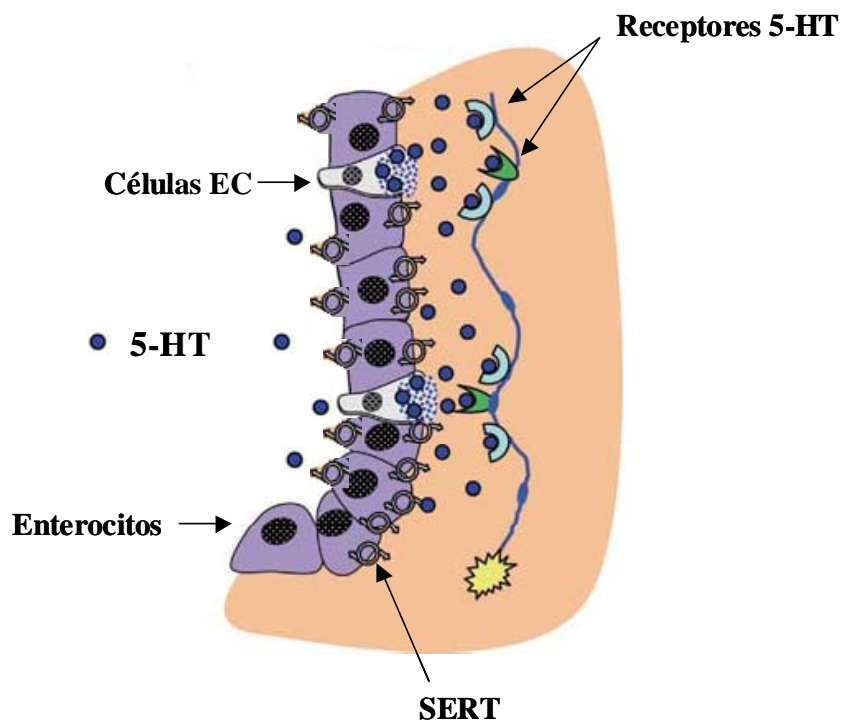




# CARACTERIZACIÓN DEL TRANSPORTADOR DE SEROTONINA HUMANO EN CÉLULAS CACO-2: ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE REGULACIÓN FISIOLÓGICA



Tesis doctoral presentada por  
**Dña. RUTH ICETA ECHAVE**

Departamento de Farmacología y Fisiología  
Unidad de Fisiología. Facultad de Veterinaria  
Universidad de Zaragoza  
2008



**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y FISIOLÓGÍA**

**UNIDAD DE FISIOLÓGÍA**



**“CARACTERIZACIÓN DEL TRANSPORTADOR DE  
SEROTONINA HUMANO EN CÉLULAS CACO-2: ESTUDIO  
DE LOS MECANISMOS DE REGULACIÓN FISIOLÓGICA”**

Memoria presentada por la Licenciada en Bioquímica **Dña. Ruth Iceta Echave** para optar al grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza.

Dirigida por:  
**Ana Isabel Alcalde Herrero y José Emilio Mesonero Gutiérrez**

**Zaragoza, 2008**



# UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

## Facultad de Veterinaria

Departamento de Farmacología y Fisiología

Unidad de Fisiología



Dña. Ana Isabel Alcalde Herrero, Profesora Titular y, D. José Emilio Mesonero Gutiérrez, Profesor Contratado Doctor, ambos pertenecientes al área de Fisiología del Departamento de Farmacología y Fisiología de la Universidad de Zaragoza

### CERTIFICAN

Que la presente Tesis Doctoral, presentada por la Licenciada **Ruth Iceta Echave**, con el título: “**Caracterización del transportador de serotonina humano en células Caco-2: estudio de los mecanismos de regulación fisiológica**”, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el laboratorio de la Unidad de Fisiología de la Facultad de Veterinaria del Departamento de Farmacología y Fisiología de la Universidad de Zaragoza,

La presente memoria se corresponde con el proyecto de Tesis Doctoral presentado y aprobado previamente por el correspondiente órgano responsable y cumple las condiciones exigidas, por lo que se autoriza su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos el presente en Zaragoza, a 3 de diciembre de 2007.

Fdo.: Ana I. Alcalde Herrero

Fdo.: José E. Mesonero Gutiérrez



## *Agradecimientos*

A mis directores de tesis, Ana Isabel Alcalde y José Emilio Mesonero. A los dos os agradezco el tiempo que me habéis dedicado, los conocimientos que me habéis transmitido y sobre todo, el afecto que me habéis hecho llegar. Me he sentido muy satisfecha y orgullosa de teneros como directores de tesis. Gracias por todo.

A todos los miembros del Departamento de Fisiología: M<sup>a</sup> Divina Murillo, Pilar Arruebo, Miguel Ángel Plaza, M<sup>a</sup> Jesús Rodríguez-Yoldi, por vuestro apoyo. A José Miguel, por su ayuda en el laboratorio.

Al resto de compañeros del Departamento, que cada uno me ha aportado algo durante estos años. A Laura, que aún estando ausente durante largos periodos de tiempo por motivos profesionales, siempre me has apoyado en todo. A Marta, por su amistad y por todos los buenos momentos que hemos pasado tanto dentro como fuera del trabajo. A Diego y Sergio, mis compañeros de despacho, gracias por vuestra ayuda desinteresada y por todo lo que me habéis hecho reír. Por último, y no por ello menos especiales, a mis Venezolanas y futuras mamás: Carmen y Nyurky. Aunque llevamos poco tiempo conociéndonos, me habéis demostrado que sois unas personas excelentes, y que puedo contar con vosotras para lo que haga falta.

A la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, por brindarme la oportunidad de realizar esta tesis doctoral.

Al Ministerio de Ciencia y Tecnología y a la Diputación General de Aragón por financiar la realización de este trabajo de investigación.

A mis padres y hermanas, que en tantos momentos les he echado de menos: para hablar, para recibir un buen consejo, para un abrazo. Aún estando lejos, siempre os llevo muy dentro.

A mi reciente marido, Jesús. Comencé esta aventura a tú lado, siendo novios, y he terminado satisfactoriamente con un gran cambio a nivel personal: siendo tú mujer. Gracias por apoyarme en todos los momentos en los que he necesitado, por darme otro punto de vista, y por quererme tanto.

En definitiva, a todas aquellas personas que han hecho posible este trabajo.





*A mi familia*



# ÍNDICE

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
I.1.	Serotonina	3
1.1.	Introducción	3
1.2.	Estructura química	5
1.3.	Biosíntesis y metabolismo	6
1.4.	Localización y liberación de 5-HT	8
1.5.	Receptores de serotonina	10
1.6.	Actividad de la serotonina	16
1.6.1.	Papel de la 5-HT en el sistema nervioso central	16
1.6.2.	Papel de la 5-HT en la regulación de la actividad gastrointestinal	17
I.2.	El transportador de serotonina (SERT)	20
2.1.	Estructura y características generales de los transportadores de monoaminas	21
2.2.	Análisis de la relación entre la estructura y la función de SERT	24
2.3.	Mecanismo de transporte	24
2.4.	Localización del transportador de serotonina	25
2.5.	Regulación fisiológica del transportador de serotonina	26
2.5.1.	Oligomerización del transportador	26
2.5.2.	Regulación post-traducciona	26
2.5.3.	Interacciones proteína-proteína	28

2.6. Estudios genéticos de la actividad de SERT .....	29
2.7. Patologías en las que existe alteración de la actividad serotoninérgica: Papel de SERT .....	31
2.7.1. Alteraciones de la conducta e implicaciones serotoninérgicas .....	31
2.7.2. Alteraciones de la actividad gastrointestinal e implicaciones serotoninérgicas .....	32
2.8. Regulación farmacológica del transportador de serotonina .....	35
<b>II. OBJETIVOS .....</b>	<b>39</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>45</b>
III.1. Modelo experimental: La línea celular Caco-2 .....	47
1.1. Material y equipo de cultivo celular .....	48
1.2. Cultivo de la línea celular Caco-2/TC7 .....	50
1.3. Mantenimiento de la línea celular Caco-2 .....	51
1.4. Método de tripsinización y siembra de las células .....	52
III.2. Estudios de transporte de 5-HT .....	54
2.1. Medios necesarios para los estudios de transporte sobre células Caco-2 .....	54
2.2. Medida de transporte de 5-HT en células Caco-2 sobre soporte plástico .....	55
2.3. Medida de transporte de 5-HT en células Caco-2 cultivadas en soportes permeables “Transwell” .....	56
2.4. Cálculo de la acumulación de 5-HT en las células Caco-2 y de sus constantes cinéticas .....	58
2.5. Cálculo del flujo y la acumulación de 5-HT en soportes permeables .....	58
III.3. Cuantificación de proteínas: método Bradford .....	60
3.1. Técnica del método de Bradford .....	61
III.4. Preparación de vesículas del borde en cepillo de las células Caco-2 .....	62
4.1. Soluciones necesarias .....	62
4.2. Técnica para preparar vesículas de borde en cepillo de células Caco-2 .....	62

III.5.	Biotinilación de proteínas de superficie celular .....	64
III.6.	Análisis de las proteínas mediante western blot .....	66
	6.1. Preparación de muestras .....	66
	6.2. Preparación de geles .....	67
	6.3. Detección de la $\beta$ -actina mediante western blot .....	70
III.7.	Extracción de ARN total .....	72
	7.1. Determinación de la concentración, pureza e integridad de ARN total .....	74
III.8.	Detección y determinación de la secuencia codificante mediante RT-PCR ...	76
	8.1. Síntesis de la primera cadena del ADNc: transcripción reversa (RT) .....	76
	8.2. Amplificación del ADNc: PCR .....	77
	8.3. PCR semi-cuantitativa .....	79
III.9.	Determinación de la aminopeptidasa N (L-Alanina) por colorimetría .....	80
	9.1. Reactivos necesarios .....	80
III.10.	Análisis estadísticos de los resultados .....	82
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>83</b>
IV.1.	Caracterización molecular y funcional del transportador de serotonina humano (hSERT) en las células Caco-2 .....	86
	1.1. Determinación de la expresión del ARNm de hSERT: Amplificación por RT-PCR y secuenciación .....	87
	1.2. Detección mediante western blot de la expresión proteica del transportador hSERT en las células Caco-2 .....	88
	1.3. Estudio del transporte de 5-HT en células Caco-2 en función del estadio de diferenciación .....	90
	1.4. Estudio cinético del transporte de serotonina en células Caco-2 .....	94
	1.5. Estudio de la especificidad del transporte de 5-HT en células Caco-2. Inhibición con fluoxetina. ....	97
	1.6. Regulación de la funcionalidad de hSERT mediada por segundos mensajeros intracelulares .....	99

1.6.1. Análisis del efecto de la estimulación de la fosforilación de hSERT, mediada por proteína cinasa C (PKC), sobre su funcionalidad .....	100
1.6.2. Análisis del efecto de la estimulación de la fosforilación de hSERT, mediada por AMPc, sobre su funcionalidad .....	106
1.6.3. Análisis del efecto de la estimulación de la fosforilación de hSERT mediada por inhibidores de las fosfatasa intracelulares .....	112
1.7. Discusión general .....	113
IV.2. Estudio de la regulación fisiológica de hSERT en las células Caco-2 .....	116
2.1. Efecto del tratamiento con 5-HT sobre el transporte de serotonina y sus constantes cinéticas .....	118
2.2. Efecto del tratamiento a largo plazo con 5-HT sobre la expresión del mRNA de hSERT .....	122
2.3. Efecto del tratamiento con 5-HT en la expresión de la proteína hSERT .....	124
2.4. Reversibilidad del tratamiento con 5-HT sobre la funcionalidad de SERT ...	126
2.5. Papel de los segundos mensajeros intracelulares en el tratamiento con 5-HT	128
2.6. Papel de los receptores serotoninérgicos 5-HT <sub>2</sub> , 5-HT <sub>3</sub> y 5-HT <sub>4</sub> en el efecto producido por el tratamiento con serotonina sobre hSERT .....	130
2.7. Efecto del tratamiento con fluoxetina y citalopram sobre la actividad de hSERT en células tratadas con 5-HT .....	132
2.8. Discusión general .....	135
IV.3. Estudio de la regulación farmacológica de hSERT mediada por el tratamiento a largo plazo de las células Caco-2 con fluoxetina .....	139
3.1. Efecto del tratamiento a largo plazo con fluoxetina sobre la actividad de hSERT .....	141
3.2. Estudio del efecto del tratamiento con fluoxetina sobre la funcionalidad e integridad de las células Caco-2 .....	145
3.3. Estudio del efecto de la fluoxetina a diferentes tiempos de tratamiento y determinación de la reversibilidad del efecto del tratamiento de fluoxetina sobre SERT .....	147
3.4. Estudio cinético del efecto del tratamiento con fluoxetina sobre SERT .....	150

3.5. Efecto del tratamiento con fluoxetina sobre la expresión del mRNA de hSERT .....	153
3.6. Efecto del tratamiento con fluoxetina sobre la expresión proteica de hSERT	155
3.7. Papel de los sistemas intracelulares reguladores del nivel de fosforilación en el efecto producido por el tratamiento con fluoxetina sobre hSERT .....	157
3.8. Papel de los receptores serotoninérgicos 5-HT <sub>2</sub> , 5-HT <sub>3</sub> y 5-HT <sub>4</sub> en el efecto producido por el tratamiento con fluoxetina sobre hSERT .....	160
3.9. Discusión general .....	162
<b>V. CONCLUSIONES</b> .....	167
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	171
<b>VII. ANEXOS</b> .....	191
VII.1. Difusión de los resultados .....	193
VII.2. Artículo 1 ( <i>J. Physiol. Pharmacol.</i> , 57(1): 119-130. 2006) .....	197
VII.3. Artículo 2 ( <i>Life Sci.</i> , 80(16): 1517-1524. 2007) .....	211
VII.4. Artículo 3 ( <i>Acta Physiol.</i> , 2007. in press) .....	221
VII.5. Resumen / Summary .....	233





# **I. INTRODUCCIÓN**



## **I.1. SEROTONINA**

### **1.1. Introducción**

Hace ya casi un siglo, algunos fisiólogos dedicados al estudio de los mamíferos encontraron un material vasoconstrictor en el suero sanguíneo. Este material recibió varios nombres, y constituía una molestia frecuente en los experimentos de perfusión donde se usaba sangre desfibrinada.

En el año 1930, Vally y Erspamer demostraron la existencia de una sustancia en las células enterocromafines de la mucosa digestiva a la que denominaron enteramina, que tenía la propiedad de estimular la contracción de la musculatura lisa del sistema gastrointestinal. Unos años más tarde, en 1948, Rapport y cols. aislaron del suero sanguíneo una sustancia vasoconstrictora a la que denominaron serotonina, que identificaron como 5-hidroxitriptamina (5-HT) y que era la misma molécula que la enteramina.

En la actualidad se sabe que la serotonina es una sustancia perteneciente a las aminas biógenas que actúa como neurotransmisor y como neuromodulador, y que juega un papel importante en el humor, ansiedad, sueño y que se distribuye por todo el organismo ejerciendo múltiples funciones. Está presente en la mayoría de las especies animales y vegetales, localizándose en el caso de los mamíferos, en un 95% en el sistema enterocromafín del tracto gastrointestinal, y el resto en las plaquetas y neuronas triptaminérgicas del sistema nervioso central y del sistema nervioso entérico (Ahlman y cols. 1981; Gronstad y cols. 1985; Gershon y cols. 1965; Wade y cols. 1994; Gershon, 2004).

En el sistema nervioso central las neuronas que contienen serotonina, tienen su mayor concentración en la línea media de la protuberancia y el bulbo, especialmente en

los núcleos dorsal y medial del rafe y, en menor medida, en el *locus coeruleus*, área postrema y área interpeduncular, de donde emergen proyecciones caudales y ventrales.

A pesar de la importancia y la diversidad de los mecanismos serotoninérgicos en el sistema nervioso central, el cerebro contiene muy poca 5-HT en términos relativos, ya que, como hemos comentado anteriormente, el 95% de la 5-HT reside en el tracto digestivo.

En el tracto digestivo, cuando la serotonina es liberada por las células enterocromafines, da origen a una gran diversidad de respuestas motoras y sensoriales a través de neuronas del plexo submucoso y mientérico, y de absorción y secreción, a través del propio epitelio intestinal. Tanto los plexos como el epitelio intestinal responden a la 5-HT a través de una gran diversidad de receptores serotoninérgicos, lo cual permite modular la actividad digestiva. De este modo, la 5-HT inicia respuestas tan diversas como, por un lado, náuseas, vómitos, secreción intestinal y peristaltismo, desarrollando un papel importante como neurotransmisor (Gershon, 1999). Por otro lado, induce la alteración de la absorción intestinal de nutrientes (Salvador y cols. 1997, 2000) y de la secreción de agua y electrolitos (Hardcastle y cols. 1999), para lo cual desarrolla su actividad como sustancia endocrina/paracrina.

Estudios fisiológicos del músculo liso del intestino, han demostrado que la 5-HT puede provocar la contracción y relajación del intestino. La serotonina activa tanto las neuronas motoras intrínsecas excitatorias como las inhibitorias. Así, puede estimular los receptores 5-HT<sub>3</sub> o 5-HT<sub>4</sub> de las neuronas entéricas colinérgicas que liberan acetil colina, produciendo contracción del músculo liso, o por el contrario, estimular los receptores 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>1A</sub> o 5-HT<sub>1D</sub> en las neuronas entéricas nitrérgicas inhibitorias para liberar óxido nítrico, lo que produciría relajación de la musculatura lisa (Gershon, 1981).

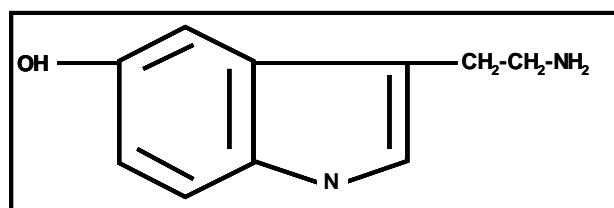
La 5-HT participa de un modo importante en la transducción sensorial desde la mucosa intestinal a diversos efectores. Así, cuando hay un incremento de la presión intraluminal, las células enterocromafines liberan 5-HT que se comporta como una molécula o señal química, con el objeto de estimular terminaciones nerviosas de la pared intestinal para poder iniciar el reflejo peristáltico. Esto se debe a que las neuronas serotoninérgicas entéricas no se proyectan directamente sobre el músculo u otros efectores, y la 5-HT actúa de modo paracrino (Pan y Gershon, 2000; Bülbbring y Cream 1959; Bertrand, 2004).

No sólo se les atribuye a las células enterocromafines un papel transductor que implica efectos paracrinos de 5-HT, tal como se acaba de mencionar, sino que también hay diversas hipótesis que plantean que la 5-HT por vía paracrina podría jugar un papel regulador del epitelio intestinal controlando la tasa de proliferación de los enterocitos vecinos.

Además del efecto sobre la actividad motora intestinal, la 5-HT ha mostrado ser un potente secretagogo intestinal. El receptor 5-HT<sub>2</sub> localizado en la mucosa, está involucrado en el transporte electrolítico intestinal, que resulta estimulado por la serotonina (Hardcastle y cols. 1999). Asimismo, se ha descrito el papel modulador de la 5-HT en la absorción intestinal de nutrientes, en el cual parecen estar implicados distintos tipos de receptores (Arruebo y cols. 1989; Salvador y cols. 1997; Salvador y cols. 1996).

## 1.2. Estructura química

La serotonina es la 5-hidroxitriptamina (5-HT) (Figura 1) y presenta unas características moleculares muy interesantes. Así, la serotonina posee la combinación de un grupo hidroxilo en la posición 5 del núcleo indol y una amida nitrogenada primaria que actúa como aceptador de un protón a pH fisiológico. Ello hace de la 5-HT una sustancia hidrofílica y como tal, no traspasa la barrera hematoencefálica fácilmente. En consecuencia, su descubrimiento en el cerebro en 1953 por Twarog y Page indicó que la 5-HT estaba siendo sintetizada en el propio cerebro.



**Figura 1.** Estructura química de la serotonina.

No todas las células que contienen 5-HT lo sintetizan. Por ejemplo, las plaquetas no sintetizan 5-HT sino que acumulan la 5-HT del plasma por un mecanismo de transporte activo que se encuentra en la membrana de las plaquetas.

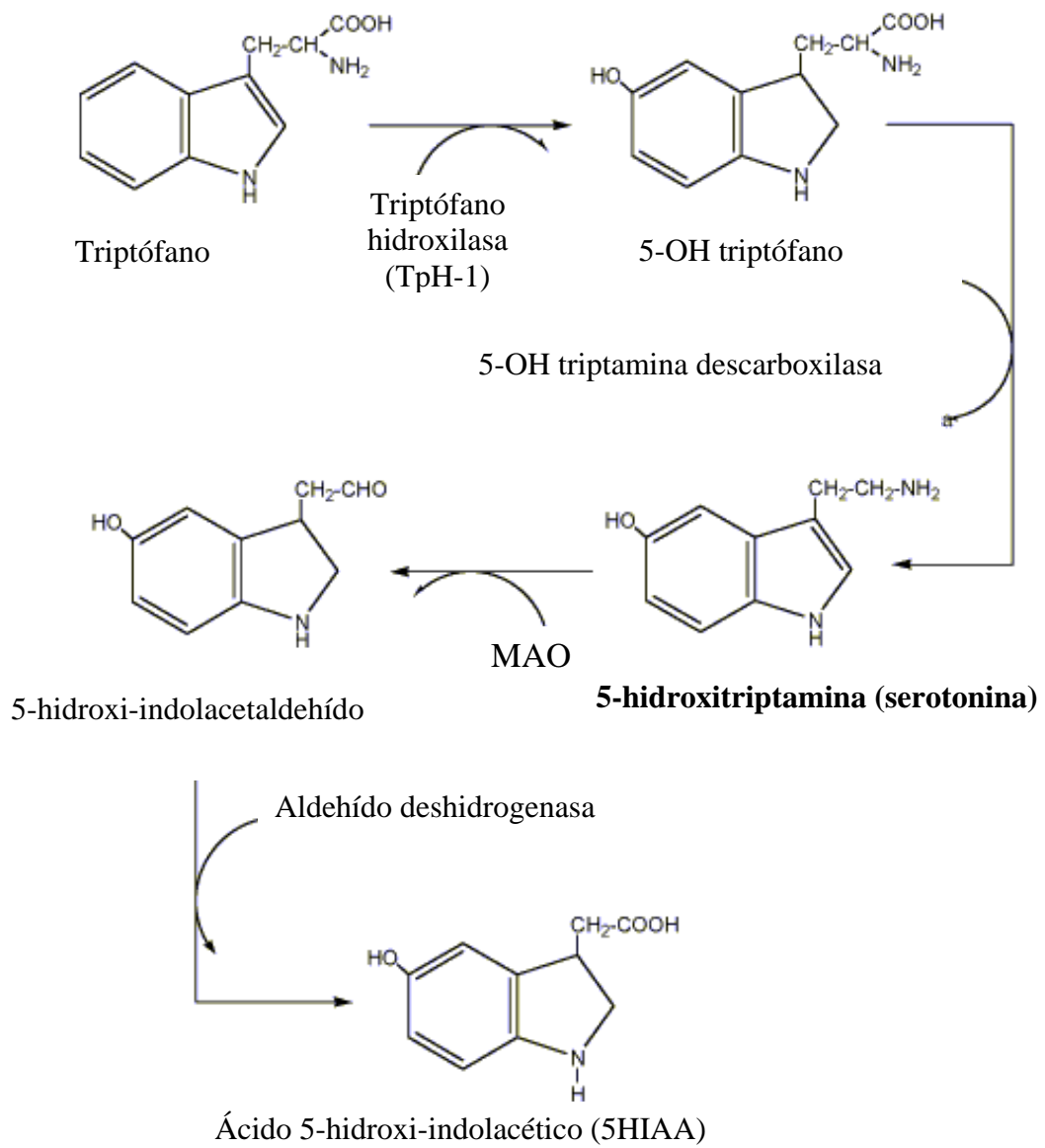
### 1.3. Biosíntesis y metabolismo

La serotonina es fundamentalmente sintetizada en dos zonas: a nivel central en los núcleos localizados en el tallo cerebral, y a nivel periférico en las células enterocromafines intestinales y en neuronas serotoninérgicas del plexo mientérico.

La síntesis de la 5-HT se inicia a partir del triptófano (Figura 2), que es oxidado en posición 5 del anillo pirrólico, mediante la enzima triptófano-5-hidroxilasa (TpH-1) dando como producto el 5-hidroxitriptófano. Esta molécula, tras descarboxilación de la cadena lateral por la 5-OH-triptamina descarboxilasa da lugar finalmente a la 5-HT. La enzima triptófano-5-hidroxilasa ha mostrado ser el factor limitante de la síntesis de la serotonina.

Aproximadamente el 2% del triptófano presente en la dieta se utiliza para la síntesis de serotonina. Este proceso se encuentra aumentado en personas con tumor carcinoide (Camilleri y Von der Ohe, 1994; Peart y cols. 1961). Una vez sintetizada, la serotonina pasa a la sangre donde es captada por las plaquetas. El calcio intracelular parece jugar un papel regulador en el transporte de serotonina hacia el interior de las plaquetas.

En lo que se refiere al metabolismo, la serotonina es objeto de dos reacciones de conjugación, para facilitar su excreción. La principal vía catabólica es la desaminación oxidativa por la monoamin oxidasa (MAO) (Gershon y cols. 1990; Molinoff y Axelrod, 1971) dando origen a su principal metabolito inactivo, el ácido 5-hidroxi-indolacetaldehído. Este producto a continuación es oxidado por la enzima aldehído deshidrogenasa, dependiente de  $\text{NAD}^+$ , obteniéndose ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) como producto final (Figura 2). En el aparato digestivo también es degradada la 5-HT por transferasas y otros enzimas (Airaskinen y cols. 1965). Todos estos enzimas son moléculas intracelulares, lo cual exige que la 5-HT sea previamente captada por las células para proceder a su inactivación (Fuller y Wong, 1990; Iversen 2000).



**Figura 2.** Síntesis y degradación de la serotonina.

#### 1.4. Localización y liberación de 5-HT

En el organismo de los mamíferos la mucosa intestinal, así como la glándula pineal, son los tejidos con más alta concentración de 5-HT (Racke y Schworer, 1993; Ormsbee y Fondacaro, 1985).

En el sistema nervioso central las neuronas que contienen serotonina, tienen su mayor concentración en la línea media de la protuberancia y el bulbo, especialmente en los núcleos dorsal y medial del rafe y, en menor medida, en el *locus coeruleus*, área postrema y área interpeduncular, de donde emergen proyecciones caudales y ventrales. En las proyecciones caudales hacia las astas dorsales de la médula espinal, la 5-HT está involucrada en la percepción del dolor, vasoconstricción del músculo liso, agregación plaquetaria, peristaltismo intestinal, contracción urinaria y broncoconstricción. En las proyecciones ventrales hacia los ganglios basales, glándula pineal, sistema límbico y cortex cerebral, la 5-HT modula funciones neuroendocrinas, cognitivas y afectivas dentro de las cuales se encuentran la regulación del afecto, sueño, apetito, función sexual y control motor.

El intestino es el principal órgano de síntesis y almacenaje de 5-HT. Dentro del tracto gastrointestinal, la amina es encontrada en las células enteroendocrinas (enterocromafines) de la mucosa y en neuronas del sistema nervioso entérico. Esta localización dual podría sugerir que la 5-HT puede funcionar como una hormona local y como un neurotransmisor (Gershon, 1985).

Las células enterocromafines (EC) son un tipo de células enteroendocrinas secretoras que están dispersas por toda la mucosa gastrointestinal. Estas células pueden sintetizar, acumular y secretar 5-HT. Se ha demostrado recientemente que las células EC contienen dos sitios de almacenaje independientes de serotonina. La mayoría de la serotonina se encuentra en los gránulos densos situados basalmente. Sin embargo, una pequeña cantidad de la amina está localizada en forma citoplasmática libre, cerca del borde luminal de las células (Money y cols. 1988).

A pesar de que la mayor producción de 5-HT corresponde a las células enterocromafines de la mucosa intestinal, también la 5-HT puede ser encontrada en el sistema nervioso entérico. Así, la 5-HT ha sido co-localizada con varios péptidos como el VIP, sustancia P y somatostatina en fibras nerviosas varicosas y no-varicosas de los



plexos mientérico y submucoso. Es importante remarcar que existen marcadas diferencias en la localización de la 5-HT dependiendo de la especie animal estudiada.

En lo que se refiere a la biodisponibilidad de 5-HT, ésta no depende exclusivamente de la síntesis “de novo” de la molécula en el tracto gastrointestinal o en el sistema nervioso, sino que existen también mecanismos de recaptación de 5-HT en las células que la secretan. Los sitios de recaptación de serotonina se localizan en las terminales nerviosas, especialmente del sistema nervioso central, y en diversas células especializadas para ello, entre las cuales cabe mencionar las plaquetas y los enterocitos. El mecanismo de recaptación es llevado a cabo mediante un transporte activo secundario específico para este fin. Posteriormente, dedicaremos un apartado exclusivo a este transportador de serotonina.

El hecho de que el tracto gastrointestinal sea el principal lugar de síntesis de serotonina, así como la localización de la 5-HT tanto en células EC como en tejido nervioso entérico, permite intuir la gran importancia de esta molécula en la regulación de la actividad gastrointestinal.

La liberación de la serotonina desde la mucosa intestinal, está regulada por la actividad neuronal y humoral sobre las células EC. Estas células parecen estar dotadas de diferentes receptores inhibitorios  $\alpha_2$ -adrenérgicos, gamma-aminobutíricos, histaminérgicos  $H_3$ , para el VIP, la somatostatina y 5-HT<sub>4</sub>. También tienen receptores estimuladores como los  $\beta$ -adrenoreceptores, receptores muscarínicos, nicotínicos y 5-HT<sub>3</sub> (Chen y cols. 1998).

Una parte de la serotonina es secretada por las células enterocromafines hacia el medio intersticial para acceder a los receptores específicos de 5-HT localizados tanto en terminales nerviosas de los plexos nerviosos entéricos como en la musculatura longitudinal y circular intestinal y en el epitelio intestinal. Una vez alcanzados dichos receptores, se producirán diversos efectos moduladores sobre la motilidad, secreción y absorción intestinal. Pero la 5-HT no sólo es liberada al medio intersticial, sino que existen pequeñas cantidades de serotonina que se liberan continuamente desde la mucosa intestinal hacia la luz del intestino y a la circulación portal. La cantidad de 5-HT liberada está directamente relacionada con el pH intraluminal, con la presión mecánica en la mucosa, con el nivel de peristaltismo, con el ritmo de estimulación de los nervios esplácnicos y con la osmolaridad del contenido intraluminal (Bulbring y Crema, 1959; Martin y cols. 1989; Grider y Piland, 2007).

## 1.5. Receptores de serotonina

La serotonina presenta una gran diversidad de efectos que son mediados por su unión a diversos receptores específicos de membrana. Tanto la serotonina como sus receptores están presentes en el sistema nervioso central y en el sistema nervioso periférico, así como en numerosos tejidos no neuronales del intestino, sistema cardiovascular y en células sanguíneas.

Hasta el momento, se han identificado hasta siete miembros dentro de la familia de receptores de serotonina (5-HT<sub>1</sub> a 5-HT<sub>7</sub>) y diversos subtipos incluidos en algunos de estos miembros. Ello ha conducido a la descripción y consideración de un total de hasta 14 tipos distintos (Hoyer y Martín, 1997). Estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, con la excepción del receptor 5-HT<sub>3</sub> que actúa a través de los mecanismos de los canales iónicos.

Los receptores acoplados a proteínas G (G-protein coupled receptor, GPCR) llevan a cabo el proceso de transducción de señal a través de proteínas G, proteínas heterotriméricas, que tienen unido un nucleótido de guanidina. Estos receptores son proteínas integrales de membrana que forman una de las familias más extensas de proteínas transductoras de señal, y se destacan por su participación en un gran número de procesos fisiológicos. Estas proteínas responden a una gran variedad de estímulos, incluyendo señales sensoriales, hormonas y neurotransmisores, y son las responsables en muchos casos del control de la actividad enzimática, de los canales iónicos y del transporte vesicular.

Las proteínas G son una familia de proteínas acopladas a sistemas efectores que se unen a GDP/GTP. Poseen tres subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) por lo que son denominadas también heterotriméricas. La estructura heterotrimérica mantiene un estado inactivo, y en el estado activo se libera la subunidad  $\alpha$ . La subunidad  $\alpha$  posee un sitio de unión para el nucleótido guanina y actividad GTPasa. Se han identificado varios tipos de subunidades  $\alpha$ : la subunidad  $\alpha_s$ , que estimula la enzima adenilato ciclasa, que cataliza la síntesis del segundo mensajero AMPc; la subunidad  $\alpha_i$  que inhibe la enzima adenilato ciclasa; y por último la subunidad  $\alpha_o$  que se encuentra implicada en la regulación de canales iónicos. Además de las mencionadas, existe otro tipo de proteína G, denominada Gq, constituida por las subunidades  $\alpha_q$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , que en estado activo es capaz de estimular la actividad de la enzima fosfolipasa C, que cataliza la hidrólisis del

fostatidilinositol bifosfato (PIP<sub>2</sub>) a partir de la cual se generan productos como el el diacilglicérido (DAG) y el inositol 1,4,5 trifosfato (IP<sub>3</sub>), que indirectamente incrementa la disponibilidad de Ca<sup>2+</sup> intracelular.

A continuación se va a realizar una breve descripción de los distintos receptores de 5-HT. En la Tabla 1 se expone un resumen de los aspectos farmacológicos y estructurales de dichos receptores, extraído de la revisión de Hoyer y Martín (1997).

### - 5-HT<sub>1</sub>:

Los receptores 5-HT<sub>1</sub> comprenden cinco subtipos: 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>1E</sub>, 5-HT<sub>1F</sub>. Estos receptores están acoplados a proteínas Gi/o que a su vez inhiben la enzima adenil ciclasa, disminuyendo así la producción de AMPc. El receptor 5-HT<sub>1</sub> se encuentra en regiones límbicas y esta implicado en la ansiedad y control del estado afectivo (Lazemberger y cols. 2007; Sullivan y cols. 2005).

Los receptores 5-HT<sub>1A</sub> son los primeros receptores de serotonina que fueron secuenciados (Albert y cols. 1990; Fujiwara y cols. 1990). El receptor 5-HT<sub>1A</sub> de rata, tiene un 89% de homología con el receptor humano. Estos receptores, se consideran los más importantes en la fisiopatología del síndrome serotoninérgico (SS). El síndrome serotoninérgico es una condición clínica asociada al uso de medicamentos agonistas de la serotonina, prescritos para el manejo de enfermedades psiquiátricas y no psiquiátricas como trastornos afectivos, ansiedad y dolor. Este síndrome se caracteriza por una excesiva estimulación de los receptores postsinápticos 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2</sub> y 5-HT<sub>3</sub> a causa de la alta disponibilidad de serotonina, tanto a nivel central como periférico (Turkel y cols. 2001; Gillman, 2006).

Los receptores 5-HT<sub>1A</sub> se localizan principalmente en los cuerpos neuronales. Dichos receptores presentan tanto localización presináptica como postsináptica. Ello les permite regular a nivel presináptico la liberación de serotonina, actuando como autoreceptores, y a nivel postsináptico ejercer una función primordialmente inhibitoria.

La activación de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> causa hiperpolarización neuronal, cuyo efecto está mediado a través de las proteínas G acopladas a canales de K<sup>+</sup>. En el tracto gastrointestinal, los receptores 5-HT<sub>1A</sub> han sido identificados en los plexos mientéricos.

Los receptores 5-HT<sub>1A</sub> están implicados en numerosos efectos psicológicos y conductuales. Se han realizado estudios con ratones “knockout” (KO) para el receptor 5-HT<sub>1A</sub>, en los cuales aparecía un aumento de la ansiedad (Heisler y cols. 1998; Parks y cols. 1998). Por ello, los agonistas de los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, como la buspirona o la gspirona, se están empleando para el tratamiento de la ansiedad y la depresión (Tunnicliff, 1991).

Los receptores 5-HT<sub>1B</sub> parecen actuar como autorreceptores terminales (Roberts y cols. 1997) mientras que los y 5-HT<sub>1D</sub> parecen ser autorreceptores del rafe (Pineyro y cols. 1996). En cuanto a los receptores 5-HT<sub>1E</sub> y 5-HT<sub>1F</sub>, aunque se ha descrito la secuencia del ARNm y su localización y características farmacológicas, no se han encontrado evidencias que indiquen la función que realizan (Hoyer y Martin, 1997).

#### **- 5-HT<sub>2</sub>:**

El grupo de receptores 5-HT<sub>2</sub> presenta tres subtipos diferentes: 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> y 5-HT<sub>2C</sub>. Se encuentran acoplados a proteínas Gq, produciendo un aumento en la hidrólisis del inositol fosfato y de la concentración intracelular del ión Ca<sup>2+</sup>. Están localizados a nivel postsináptico. El subtipo 5-HT<sub>2A</sub> ha sido el más estudiado y está relacionado con la vasoconstricción del músculo liso y agregación plaquetaria a nivel periférico (Hoyer y cols. 2002). Los receptores 5-HT<sub>2B</sub> también parecen mediar la relajación del endotelio vascular, y además han sido identificados en el músculo liso de intestino delgado humano donde producen la contracción del músculo longitudinal (Borman y Burleigh, 1995).

#### **- 5-HT<sub>3</sub>:**

Los receptores 5-HT<sub>3</sub> pertenecen a la superfamilia de receptores con función de canales iónicos, similar a los receptores GABA (Boess y Martín, 1994). Los receptores 5-HT<sub>3</sub> se localizan en el sistema nervioso central y en el tracto gastrointestinal. La serotonina, provoca diversos efectos mediante la activación del receptor 5-HT<sub>3</sub>, en el tracto gastrointestinal, especialmente en lo que se refiere a la motilidad, la secreción intestinal (De Ponti y Tonini, 2001) y la absorción intestinal (Salvador y cols. 1997).

**- 5-HT<sub>4</sub>:**

Los receptores 5-HT<sub>4</sub> actúan mediante la vía de las proteínas G<sub>s</sub>, estimulando la enzima adenilato ciclasa y por lo tanto, incrementando la síntesis y los niveles de AMPc. Los receptores 5-HT<sub>3</sub> y 5-HT<sub>4</sub>, están relacionados básicamente con la función gastrointestinal: promueven el vómito y el vaciamiento gástrico al ser estimulados tanto central como periféricamente. La estimulación de los receptores 5-HT<sub>4</sub> aumenta la liberación de ACh en el tracto gastrointestinal y potencia la transmisión sináptica (Pan y Galligan, 1994) estimulando la contractilidad del músculo liso (Clarke y cols. 1989). También se han propuesto diversos ligandos para los receptores de 5-HT<sub>4</sub> que han mostrado ser de gran utilidad terapéutica en muchas enfermedades, incluyendo arritmias cardíacas (Kaumann y Sanders, 1994; Rahme y cols. 1999), enfermedades neurodegenerativas (Reynolds y cols. 1995) e incontinencia urinaria (Boyd y Rohan, 1994).

**- 5-HT<sub>5</sub>:**

Los receptores 5-HT<sub>5</sub> son probablemente los menos estudiados de todos los receptores de serotonina. La primera secuencia de ADNc se obtuvo del cerebro de ratón mediante el uso de oligonucleótidos degenerados (Plassat y cols. 1992). Estos receptores comprenden dos subtipos: 5-HT<sub>5A</sub> y 5-HT<sub>5B</sub>. Hay pocos estudios realizados acerca de la respuesta fisiológica y el sitio específico de unión de los receptores 5-HT<sub>5</sub>. Se ha visto que en ratas, el receptor 5-HT<sub>5</sub> inhibe la actividad de la enzima adenilato ciclasa, mediante el acoplamiento a proteínas G<sub>i</sub> y G<sub>o</sub> (Francken y cols. 1998, 2000).

**- 5-HT<sub>6</sub>:**

El receptor 5-HT<sub>6</sub> fue clonado a partir del ADNc de rata. El gen humano, también se ha clonado mostrando una homología en la secuencia del 89% con el equivalente de rata (Kohen y cols. 1996). El receptor 5-HT<sub>6</sub> se expresa endógenamente en tejido neuronal, aunque en ratas y en humanos el ARNm del receptor se ha localizado en el cuerpo estriado, amígdalas, hipocampo y córtex. Sin embargo, no se ha detectado la presencia del receptor en órganos periféricos. El mecanismo de acción de este receptor, parece ser mediado por un aumento de los niveles intracelulares del AMPc, por lo que parece actuar a través de la vía de las proteínas G<sub>s</sub> (Conner y Mansour, 1990). En cuanto a los estudios farmacológicos que se han realizado, se ha

visto que los agentes antipsicóticos y antidepresivos tienen una alta afinidad y actúan como antagonistas de los receptores 5-HT<sub>6</sub>.

#### - 5-HT<sub>7</sub>:

En lo que se refiere al receptor 5-HT<sub>7</sub>, ha sido clonado en rata, ratón, cobaya y especie humana. Su mecanismo actúa mediante la vía de las proteínas G<sub>s</sub>, aumentando los niveles de adenilato ciclasa, y por lo tanto la síntesis del AMPc (Bard y cols. 1993, Adham y cols. 1998). El receptor 5-HT<sub>7</sub> activa las proteínas cinasas activadas por mitógenos, ERK, en cultivos neuronales primarios (Norum y cols. 2005). La distribución de los sitios de unión del receptor de 5-HT<sub>7</sub> en el sistema límbico y en las regiones talamocorticales sugiere un posible papel de este receptor en la fisiopatología de los desórdenes afectivos. De hecho, los antidepresivos y los antipsicóticos como la clozapina, tienen una gran afinidad por el receptor 5-HT<sub>7</sub> (Roth y cols. 1994). Diversos experimentos han demostrado que, después de un tratamiento crónico con antidepresivos, se observa una regulación a la baja (“down-regulation”) de los receptores 5-HT<sub>7</sub> (Sleight y cols. 1995; Mullins y cols. 1999).

El estudio de los receptores de 5-HT, y de su actividad fisiológica e implicación en patologías en los cuales está implicado el sistema serotoninérgico, presenta un gran interés y está produciendo resultados relevantes continuamente.

La información acerca de los receptores de 5-HT viene completada y resumida en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Clasificación y nomenclatura de los receptores de 5-HT.

Receptor	Nombre anterior	Agonistas selectivos	Antagonistas selectivos	Radioligandos	Efector	Gen	Información estructural
5-HT <sub>1A</sub>	--	8-OH-DPAT	WAY 100635	[ <sup>3</sup> H]WAY 100635	Gi/o	5-ht <sub>1A</sub>	h 421aa P8908 7TM r 422aa P19327 7TM
5-HT <sub>1B</sub>	*5-HT <sub>1D/β</sub>	SB 26641	GR55562	[ <sup>3</sup> H]sumatriptan	Gi/o	h 5-ht1D/F r 5-ht1B	h 390aa P28222 7TM r 386aa P28564 7TM
5-HT <sub>1D</sub>	5-HT <sub>1Dα</sub>	--	--	[ <sup>3</sup> H]sumatriptan	Gi/o	5-ht1Dα	h 377aa P11614 7TM 374aa P28565 7TM
5-ht <sub>1E</sub>	--	--	--	[ <sup>3</sup> H]5-HT	Gi/o	5-ht1E	h 365aa P28566 7TM
5-ht <sub>1F</sub>	5-HT <sub>1Eβ</sub> 5-HT <sub>6</sub>	--	--	[ <sup>3</sup> H]sumatriptan	Gi/o	5-ht1F	h 366aa P30939 7TM r 366aa P30940 7TM
5-HT <sub>2A</sub>	D/5-HT <sub>2</sub>	α-Me-5-HT	Ketanserina Ritanserina MDL100907	[ <sup>3</sup> H]-ketanserina	Gq/11	5-ht <sub>2A</sub>	h 471aa 7TM r 471aa 7TM hm 471aa 7TM p 477aa 7TM mk 479aa 7TM
5-HT <sub>2B</sub>	5-HT <sub>2F</sub>	α-Me-5-HT	SB200646 Ritanserina SB204741	[ <sup>3</sup> H]-5-HT	Gq/11	5-ht <sub>2B</sub>	h 479aa 7TM r 479aa 7TM
5-HT <sub>2C</sub>	5-HT <sub>1C</sub>	α-Me-5-HT	Mesulergina Ritanserina SB200646	[ <sup>3</sup> H]-mesulergina	Gq/11	5-ht <sub>2C</sub>	h 488aa 5 7TM r 460aa 7TM
5-HT <sub>3</sub>	M	2-Me-5-HT m-clorofenil-biguanida	Granisetron Ondansetron Tropisetron	[ <sup>3</sup> H]-zacoprida [ <sup>125</sup> I]-zacoprida	Ión catiónico	5-ht <sub>3A(a)</sub> 5-ht <sub>3A(b)</sub>	m 487aa 7TM m 481aa 7TM
5-HT <sub>4</sub>	---	BIMU8 RS67506 ML10302	GR113080 SB204070	[ <sup>3</sup> H]-GR113808 [ <sup>125</sup> I]-SB207710	Gs	5-ht <sub>4A(a)</sub> 5-ht <sub>4A(b)</sub>	r387aa 7TM(a) r 402aa 7TM(b)
5-HT <sub>5A</sub>	5-HT <sub>5α</sub>	5-carboxi-amidotriptamina	--	[ <sup>3</sup> H]-5-CT [ <sup>125</sup> I]LSD	Gs?	5-ht <sub>5A</sub>	h 357aa 7TM m 357aa 7TM r 357aa 7TM
5-HT <sub>5B</sub>	5-HT <sub>5β</sub>	--	--	[ <sup>3</sup> H]-5-CT [ <sup>125</sup> I]LSD	No se conoce	5-ht <sub>5B</sub>	m 370aa 7TM r 371aa 7TM
5-HT <sub>6</sub>	--	EMD 386088 2-Metil-5-HT	SB 258585	[ <sup>3</sup> H]-5-CT [ <sup>125</sup> I]LSD	Gs	5-ht <sub>6</sub>	h 480aa 7TM r 438aa 7TM
5-HT <sub>7</sub>	5-HT <sub>x</sub>	5-carboxi-amidotriptamina 8-HO-DPAT LP44 Metergolina Pimozida	SB 269970	[ <sup>3</sup> H]-5-CT [ <sup>125</sup> I]LSD	Gs	5-ht <sub>7</sub>	h 455aa 7TM(a) h 432aa 7TM(b) m 448aa 7TM r 448aa 7TM r 435aa 7T gp 446aa7TM r 7TM(c)# r 7TM(d) #

\*Solamente se denominó 5-HT<sub>1D/β</sub> a la forma procedente de no roedores. # La secuencia no ha sido publicada. Para más información consúltase: Hoyer y Martin, 1997; Martin, 1994; Connor y cols. 1995; Eglen y cols. 1995; Roberts y cols. 1997.

## 1.6. Actividad de la serotonina

La serotonina juega un papel importante en numerosas situaciones fisiológicas y fisiopatológicas. Fundamentalmente el papel de la serotonina ha sido descrito en los procesos en los que participa el sistema nervioso central, entre los que se encuentran las alteraciones de la conducta y la depresión, así como en los que participa el tracto gastrointestinal, entre los que se incluye la regulación mediada por el sistema nervioso entérico. Por ello vamos a describir la actividad de la serotonina desarrollando estos dos aspectos.

### 1.6.1. Papel de la serotonina en el sistema nervioso central

En lo que se refiere al papel de la 5-HT en el sistema nervioso central, se ha demostrado que la 5-HT está involucrada en diferentes funciones, incluyendo el sueño, apetito, temperatura, ansiedad, actividad motora, ritmo biológico, aprendizaje y memoria. La serotonina está presente en una gran variedad de zonas del cerebro. La mayoría de las vías serotoninérgicas se originan de las neuronas del rafe o de la región medial del puente y la corteza cerebral.

En la mayoría de las áreas del sistema nervioso central, la 5-HT tiene una acción inhibitoria fuerte. Esta acción es mediada por los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y está asociada a una hiperpolarización de la membrana causada por un aumento en la conductancia del potasio. La alteración de la actividad serotoninérgica en el sistema nervioso central, parece estar involucrada en la aparición de diversas patologías neuropsiquiátricas, tales como desórdenes afectivos, conductas obsesivo-compulsivas, pánico, depresión y afectación estacional (De Montigny y cols. 1985; Frazer, 1997; Pecknold y cols. 1994; Yura y cols. 1996).

El transportador de serotonina (SERT), que es la proteína de membrana encargada de introducir dentro de la célula la 5-HT, y que en consecuencia reduce la disponibilidad de 5-HT en el medio extracelular, se ha convertido en la principal diana farmacológica para el tratamiento de las patologías psiquiátricas en las que el sistema serotoninérgico se encuentra alterado. Este es el caso de diversos tipos de antidepresivos, como los tricíclicos, que impiden la recaptación de noradrenalina y serotonina, y los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRIs) (Frazer,



1997). Estos inhibidores, inhiben la recaptación de serotonina inmediatamente. Sin embargo el efecto terapéutico se alcanza después de un tratamiento largo y repetitivo.

### **1.6.2. Papel de la serotonina en la regulación de la actividad gastrointestinal**

Tal y como hemos comentado anteriormente, el 95% de la serotonina del organismo está en el tracto gastrointestinal, principalmente en las células enterocromafines (86%) y en menor proporción (9%) en las neuronas del sistema nervioso entérico.

El tracto gastrointestinal presenta una estructura tisular compleja y por ello la fisiología gastrointestinal presenta una gran diversidad de procesos. La actividad en este tracto incluye funciones de digestión, absorción de nutrientes y secreción de agua y electrolitos, así como funciones motoras para el mezclado y propulsión de los contenidos gastrointestinales.

En lo que se refiere al papel de la 5-HT en la fisiología gastrointestinal, se ha visto la implicación de la serotonina en la regulación de la totalidad de la actividad gastrointestinal. Así, respecto a los procesos de absorción intestinal, diversos estudios han mostrado que la 5-HT modula el transporte transepitelial de sustratos en el intestino delgado. En este sentido, la 5-HT ha sido descrita como un potente secretagogo, es decir aumenta la secreción de electrolitos ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) y agua a la luz intestinal (Borman y Burleigh, 1997; Hansen y Jaffe, 1994; Kellum y cols. 1994). El efecto secretagogo intestinal se produce por una inhibición en el intercambio  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  y una estimulación del intercambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  en las vellosidades. Además, la 5-HT estimula la secreción de  $\text{HCO}_3^-$  en las criptas del íleon (Sundaram y cols. 1991). La inhibición de la absorción de  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  producida por la 5-HT parece que está mediada por el receptor 5-HT<sub>4</sub> (Hardcastle y cols. 1981; Siriwardena y cols. 1993).

La 5-HT también modifica la absorción intestinal de nutrientes. Diversos estudios han demostrado que la 5-HT produce una inhibición del transporte  $\text{Na}^+$  dependiente de D-galactosa y L-leucina a través del yeyuno de conejo (Arruebo y cols. 1989; Salvador y cols. 1996). Este efecto puede deberse a procesos intracelulares mediados por proteína cinasa C (PKC). Se ha descrito que los receptores 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> y 5-HT<sub>4</sub> podrían participar en la inhibición del transporte de L-leucina (Salvador y cols. 1997).

El papel de la 5-HT en la regulación de la motilidad y de la sensibilidad del tracto gastrointestinal, se lleva a cabo a través de la activación de numerosos receptores distribuidos ampliamente. Sus acciones son muy complejas y puede producir contracción del músculo liso al estimular neuronas colinérgicas, o relajación del mismo por estimulación de neuronas inhibitoras, que liberan óxido nítrico (Kim y Camilleri 2000). La 5-HT que se libera en la mucosa desde las células enterocromafines accede a las proyecciones mucosales de neuronas aferentes primarias. Entre éstas se encuentran neuronas extrínsecas, que transmiten la sensación de náusea al sistema nervioso central, y neuronas aferentes primarias intrínsecas submucosales, que inician el peristaltismo y reflejos secretores (Cooke y cols. 1997; Pan y Gershon, 2000) y neuronas aferentes primarias intrínsecas mientéricas (Nagakura y cols. 2002) que inician contracciones de migración fuertes. La 5-HT secretada por neuronas mientéricas produce una neurotransmisión excitatoria rápida y lenta que está implicada en la regulación de la motilidad gastrointestinal (Gershon, 2004).

Los receptores 5-HT<sub>4</sub> están localizados en las células enterocromafines, musculares lisas y en las neuronas. La liberación de 5-HT de las células enterocromafines, es uno de los factores iniciadores del peristaltismo a través de los receptores 5-HT<sub>4</sub>. Los receptores 5-HT<sub>3</sub> están distribuidos en las neuronas motoras entéricas, terminales periféricas de aferencias viscerales y en el sistema nervioso central (Camilleri, 2001; De Ponti y Tonini 2001).

Dada la gran magnitud que presenta la actividad reguladora de la 5-HT en el tracto gastrointestinal, la alteración de la actividad serotoninérgica ha mostrado estar implicada en un grupo de afectaciones gastrointestinales crónicas, entre las cuales cabe destacar el síndrome del colon irritable (IBS, Irritable Bowel Syndrome) y las enfermedades inflamatorias (IBD, Inflammatory Bowel Disease) como la colitis ulcerosa (Coates y cols. 2004) y la enfermedad de Crohn (Belai y cols. 1997). Tanto el IBS como el IBD, representan dos de los grupos de patologías crónicas intestinales que están adquiriendo mayor relevancia en las últimas décadas, por su prevalencia y por su aparición a edades cada vez más tempranas.

Algunos de los síntomas del IBS son los calambres, diarrea, gas y mucosidad en la materia fecal. No se conoce todavía en profundidad la causa de la enfermedad, aunque se piensa que el origen puede ser multifuncional (Gershon, 2003). El papel de la serotonina en este trastorno tampoco ha sido establecido con claridad y los resultados

resultan en muchos casos contradictorios. Así, recientes estudios han mostrado que existe un aumento de serotonina en las células enterocromafines del colon de pacientes con IBS, y se han detectado mayores niveles post-prandiales de serotonina en estos pacientes, comparado con sujetos sanos (Bearcroft y cols. 1998; Spiller y cols. 2000). Sin embargo, otros estudios detectan reducción en la población de células enterocromafines y reducción de la 5-HT mucosal en IBS e IBD (Coates y cols. 2004)

Dado que la serotonina parece que puede jugar un papel mediador en la sensibilidad visceral y en la alteración de la actividad motora en el IBS, se probó la eficacia de nuevos medicamentos dirigidos a los receptores de serotonina. El éxito de esta terapia demostró que la 5-HT juega un papel fundamental en la fisiopatología del IBS. Así, en pacientes con IBS en los que predomina la diarrea (IBS-d), el alosterón, un antagonista del receptor 5-HT<sub>3</sub>, disminuye el tránsito intestinal y modula la sensibilidad visceral reduciendo los síntomas de dicha patología. Igualmente se ha demostrado, que bloquea la actividad en la amígdala y el hipocampo, zonas donde se encuentra la mayor concentración de serotonina en el cerebro.

Por otra parte, el tegaserod, un agonista del receptor 5-HT<sub>4</sub>, ha mostrado ser de gran eficacia terapéutica en pacientes afectados con IBS en los que predomina el estreñimiento (IBS-c). Así, este fármaco ha demostrado acelerar el tránsito gastrointestinal y modular la sensibilidad visceral en estos pacientes. Asimismo, un muy reciente trabajo de Ismail y cols. (2007) ha mostrado que el tegaserod también inhibe el transportador de serotonina.

Más recientemente, los antidepresivos que actúan sobre los niveles de 5-HT a nivel central y modulan la sensibilidad y la motilidad intestinal, se están convirtiendo en una terapia alternativa de elección en los pacientes con IBS (Creed y cols. 2003; Gorard y cols. 1995). No obstante, se ha planteado dudas sobre el efecto gastrointestinal de estos fármacos, achacando su éxito a la actividad antidepresiva y reconfortante sobre el paciente.

## **I.2. EL TRANSPORTADOR DE SEROTONINA (SERT)**

Hace casi 5 décadas Axelrod (1961) introdujo el concepto de recaptación para explicar cómo la noradrenalina (NA) era internalizada por las terminales nerviosas simpáticas. Desde entonces multitud de trabajos se han centrado en el estudio de las propiedades funcionales y farmacológicas de los sistemas de recaptación de monoaminas, fundamentalmente los situados en el sistema nervioso central.

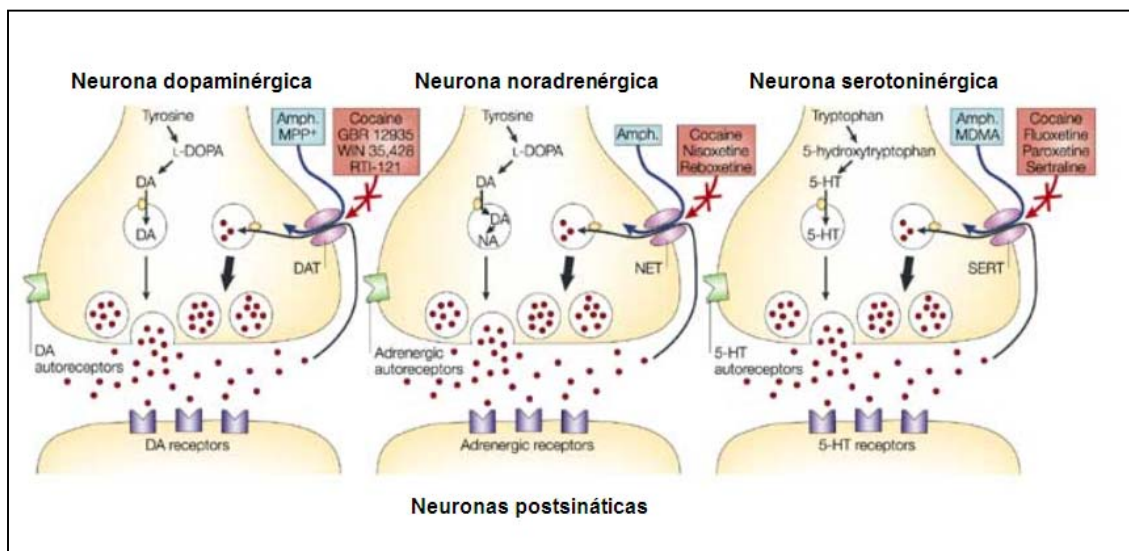
La neurotransmisión representa el lenguaje químico entre neuronas y tiene lugar en una estructura anatómica bien definida, la sinapsis. La neurotransmisión finaliza cuando el neurotransmisor se retira de la hendidura sináptica. Este proceso puede ser llevado a cabo mediante la recaptación del mismo por la propia terminal que lo liberó, o por las células gliales que están a su alrededor. Para ello es necesario la actividad de transportadores especializados. Posteriormente el neurotransmisor puede ser almacenado para su reutilización o bien ser degradado produciéndose un compuesto inactivo.

La recaptación es un importante proceso por el cual se finaliza la neurotransmisión, de hecho, se han descrito transportadores específicos para el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), la adrenalina, la noradrenalina (norepinefrina, NE), la dopamina (DA), la serotonina (5-HT) y para muchos aminoácidos, a los que, precisamente por estas características, se les ha conferido la propiedad de neurotransmisores (Figura 3).

## 2.1. Estructura y características generales de los transportadores de monoaminas

La clonación de la proteína que codificaba el transportador de noradrenalina (NET) llevada a cabo en 1991 por Pacholczyk y cols. supuso un avance considerable en el conocimiento de la biología de los transportadores de monoaminas. Asimismo, al comparar la secuencia de aminoácidos de NET con la del transportador de GABA clonado, se observó una significativa identidad entre ambos. Ello llevó a la identificación de una nueva familia de genes para las proteínas transportadoras de neurotransmisores.

Los transportadores de la membrana plasmática para las monoaminas dopamina (DA), noradrenalina (norepinefrina NE), y serotonina (5-HT), que además incluye a los transportadores del GABA y la glicina, pertenecen a la familia transportadora de solutos SLC6 (solute carrier family) dependientes de  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ . Asimismo, estos transportadores DAT (de DA), NET (de NE) y SERT (de 5-HT) se caracterizan por ser las principales dianas de sustancias psicoestimulantes y adictivas como son la cocaína y anfetaminas (Figura 3).



**Figura 3.** Esquema de la actividad sináptica de las monoaminas biógenas. Tomado de Torres y cols. 2003.

La recaptación del neurotransmisor por estos transportadores está acoplada al contranporte de iones de sodio aprovechando su gradiente de concentración. La entrada de un sustrato va acompañada de la entrada de uno o dos iones de  $\text{Na}^+$  (según de qué transportador se trate) y de un ión  $\text{Cl}^-$ , pero el transporte también depende, en algunos casos, de la concentración de  $\text{K}^+$  presente en el compartimento citoplasmático del transportador.

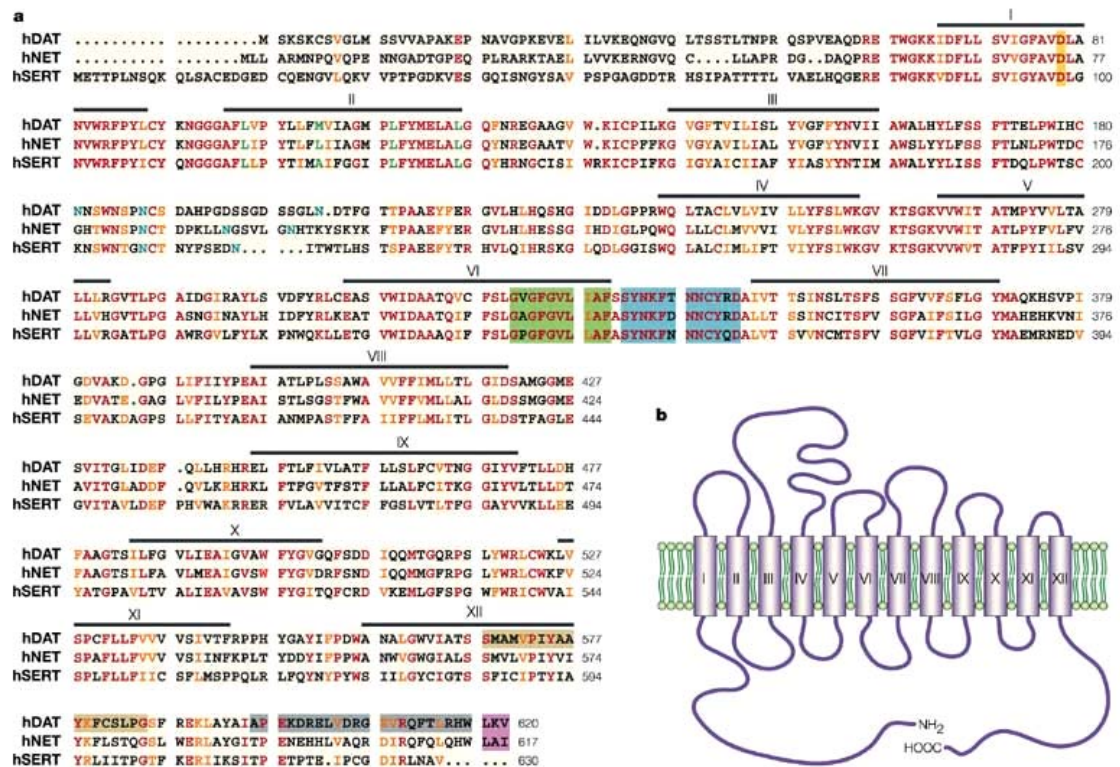
El transportador para el GABA de rata se clonó mediante el empleo de oligonucleótidos sintéticos procedentes de secuencias de tripletes obtenidos a partir del conocimiento de la proteína purificada. La gran homología entre los transportadores de GABA y noradrenalina constituyeron la base para el aislamiento de clones de ADNc de los transportadores de dopamina de rata (Kilty y cols. 1991; Shimada y cols. 1991) y bóvido (Usdin y cols. 1991).

La clonación del transportador de serotonina (SERT) (Blakely y cols. 1991; Hofmann y cols. 1991) se llevó a cabo mediante el empleo de oligonucleótidos degenerados correspondientes a zonas de elevada similitud entre los transportadores de GABA y noradrenalina. Estos oligonucleótidos sirvieron como base para crear nuevas sondas mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permitieran posteriormente realizar una criba de librerías de ADNc.

Todos estos transportadores poseen 12 dominios transmembrana (Figura 4) con 20-24 residuos hidrofóbicos. Debido a la ausencia de secuencia señal, parece ser que tanto el grupo amino como el carboxi-terminal están situados en el citoplasma. Según el modelo propuesto, existen cinco bucles intracelulares y seis extracelulares bastante cortos (Pacholczyk y cols. 1991; Hoffman y cols. 1991). Hay un bucle extracelular grande entre los dominios transmembrana 3 y 4 que presenta diversos sitios de glicosilación.

Más concretamente y con relación a la serotonina, los trabajos de investigación realizados acerca del transportador de serotonina (SERT) han permitido determinar la secuencia codificante, el gen que expresa la proteína y su caracterización. Así, esta proteína ha mostrado tener 12 dominios transmembrana, poseer grupos amino y carboxi-terminal intracelulares y ser dependiente de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  para transportar serotonina al interior celular, tal como hemos mencionado antes de modo general. También depende de la concentración de  $\text{K}^+$  en el medio intracelular. Especial interés

presenta el trabajo realizado por Rammamoorthy y cols. (1993), cuyos resultados han conducido a la clonación, expresión y localización cromosómica del transportador de serotonina humano. El gen humano para SERT (SLC6A4) se encuentra en el cromosoma 17q11.2, se extiende a lo largo de 37.8 kb y contiene 14 exones, cuya transcripción y posterior traducción da lugar a una proteína de 630 aminoácidos. La secuencia de la proteína humana presenta una homología del 92% con la de rata (Lesch y cols. 1993).



**Figura 4.** Información molecular y estructural de los transportadores de DA, NE y 5-HT humanos. **a)** Secuencia de aminoácidos de los transportadores. En rojo se indican los residuos idénticos, en naranja se indican los residuos similares. Los residuos de asparragina que forman parte de las secuencias consenso ligadas a N-glicosilación se muestran en azul. **b)** Topología propuesta para los transportadores de monoaminas mostrando los 12 dominios transmembrana conectados por bucles intra y extracelulares. Tomado de Torres y cols. 2003.

## 2.2. Análisis de la relación entre la estructura y la función de SERT

La función de SERT es transportar la 5-HT desde el compartimento extracelular al interior celular. La identificación de los residuos y dominios que participan en la unión del sustrato y la traslocación está siendo motivo de multitud de estudios. Para ello, en muchos casos se ha aplicado técnicas de análisis de transportadores quiméricos, métodos de acceso a la sustitución de cisteína (SCAM) y mutagénesis dirigida.

Los resultados han indicado que el ácido aspártico del dominio transmembrana 1 es crucial para reconocer al sustrato. Asimismo, el dominio transmembrana 12 ha mostrado ser determinante en la afinidad por los compuestos tricíclicos (Barker y cols. 1994), mientras que el dominio transmembrana 1 parece determinar la selectividad de SERT por el citalopram (Barker y cols. 1998). Los dominios transmembrana 1 y 2 y el extremo amino terminal son importantes en la sensibilidad por la cocaína (Sandhu y cols. 2002) y los residuos metionina 180, tirosina 495 y fenilalanina 513 parecen intervenir en la interacción de inhibidores (Mortensen y cols. 2001). También el dominio transmembrana 3 parece ser crucial para la unión de 5-HT y de cocaína, y se encuentra localizado en la vía de traslocación (Chen y cols. 1997).

## 2.3. Mecanismo de transporte

El transportador SERT co-transporta el sustrato con un ión  $\text{Na}^+$  y un ión  $\text{Cl}^-$ , y la traslocación implica la salida de un ión  $\text{K}^+$ . La unión del  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y 5-HT a SERT induce un cambio conformacional en el transportador, lo cual permite exponer el sitio de unión hacia el otro lado de la membrana con la consiguiente traslocación del sustrato y los iones. La reorientación del transportador supone un paso adicional que implica la unión y salida de iones  $\text{K}^+$  intracelulares.

Además del clásico mecanismo de transporte de sustrato, SERT también ha mostrado actividad tipo canal. Mediante técnicas electrofisiológicas se ha determinado la existencia de conductancias que no se explican a partir de la estequiometría fijada en la traslocación del sustrato (Mager y cols. 1994). No se ha determinado si estas conductancias son suficientes para alterar el potencial de membrana.



## 2.4. Localización del transportador de serotonina

Previamente a la clonación y establecimiento de la secuencia del transportador SERT, ya se había descrito la existencia de transporte de serotonina en la membrana plasmática de las terminales presinápticas de cerebro (Axelrod y Inscoe, 1963) y de las plaquetas (Sneddon, 1973; Rudnick, 1977).

Cuando en 1991, Blackely y cols. en cerebro de rata, y Hoffman y cols. en células RBL (células basofílicas obtenidas de ratas con leucemia), clonaron el transportador SERT, detectaron que el ADN correspondiente a esta proteína poseía características funcionales de transporte similares a las descritas en plaquetas y sinaptosomas de cerebro.

Además, estudios posteriores concluyeron que la secuencia del ADNc de SERT obtenido bien de tejido neuronal o no neuronal, era idéntica dentro de la misma especie animal y era codificado por el mismo gen (Ramamoorthy y cols. 1993; Lesch y cols. 1993).

Numerosos estudios han tratado de determinar la localización y funcionalidad de SERT en diversos tejidos de diferentes especies animales. Así, se ha detectado la presencia de SERT funcional en cerebro de ratón (Chang y cols. 1996) y de mono (Miller y cols. 2001), en placenta humana (Ramamoorthy y cols. 1993) y en células cromafines adrenales (Blakely y cols. 1996).

Especial mención requiere el estudio de Chen y cols. (1998) en el que se realizó la clonación y localización de SERT en intestino de cobaya, mostrando además por hibridación *in situ* e inmunohistoquímica la expresión de SERT en las neuronas entéricas y en el epitelio que reviste toda la longitud de la vellosidad intestinal, desde la cripta.

También se ha realizado la clonación y estudiado la expresión de SERT en bóvidos y los resultados han mostrado que SERT se expresa en placenta, cerebro, médula ósea, riñón, corazón, glándula adrenal, hígado, glándula paratioridea, tiroides, intestino delgado y páncreas de bóvido (Mortensen y cols. 1999).

Por tanto, parece que la expresión del transportador SERT presenta una amplia distribución, si bien la actividad del mismo ha sido fundamentalmente estudiada en el sistema nervioso central y el tracto gastrointestinal.

## **2.5. Regulación fisiológica del transportador de serotonina**

### **2.5.1. Oligomerización del transportador**

Uno de los aspectos estudiados es la oligomerización de SERT. Aunque la mayor parte de los modelos de transportadores son considerados como monómeros para desarrollar su función, algunos estudios han revelado una cierta naturaleza oligomérica de SERT. Así, la expresión heteróloga de concatámeros de SERT mostró actividad transportadora en dímeros y tetrámeros (Chang y cols. 1998) y también otros autores han detectado en la membrana plasmática de células HEK la existencia de oligómeros de SERT (Schmidt y cols. 2001)

### **2.5.2. Regulación post-traducciona**

El análisis de la secuencia de aminoácidos de transportadores de monoaminas ha revelado la presencia diversos sitios consenso para la fosforilación de la proteína mediante cinasas dependientes de AMPc, PKC y/o cinasas dependientes de  $Ca^{2+}$ /calmodulina.

La expresión del transportador de serotonina, SERT, está regulada por la estimulación de los receptores, por la producción de segundos mensajeros, y la activación de cinasas. Así, diversos autores (Blakely y cols. 1998; Thome y cols. 2000; Bryan-Lluka y cols. 2004) han mostrado que la expresión génica de SERT esta regulada “in vitro” por vías dependientes de AMPc, de  $Ca^{2+}$  intracelular a través de la Calmodulina, del óxido nítrico y de la guanosina monofosfato. Por otro lado, resultados obtenidos “in vivo” muestran una regulación del transportador de serotonina mediada por antidepresivos (Benmansour y cols. 1999) y hormonas esteroideas (Wihlback y cols. 2001).

Se han realizado numerosos trabajos respecto a la regulación post-traducciona de SERT. Así, esta proteína presenta tres sitios potenciales de fosforilación para la PKC: serina 8, serina 277 y treonina 603. Blakely y cols. (1998) mostraron que SERT puede ser fosforilado tras la activación por PKC y que dicho efecto conduce a la disminución de la actividad de dicho transportador debido a la internalización de la proteína. Sin embargo, en otros resultados obtenidos mediante técnicas de mutagénesis

se ha observado que ninguno de los residuos susceptibles de fosforilación por PKC parece estar directamente implicado en la regulación por esta cinasa (Sakai y cols. 1997).

En diversos trabajos realizados en células HEK-293, transfectadas con el ADNc de SERT humano, se ha visto que la PKC conduce a una internalización de la proteína de superficie celular hSERT, reduciendo la recaptación de 5-HT (Qian y cols. 1995). Este efecto se debe a que los activadores de la PKC aumentan el nivel de fosforilación del transportador hSERT. De modo similar, los inhibidores de la proteína fosfatasa (PP1/PP2A) producen disminución del transporte de 5-HT y aumentan significativamente la incorporación de  $^{32}\text{P}$  al transportador SERT, es decir, de nuevo la fosforilación del transportador SERT reduciría la disponibilidad del mismo y disminuiría su actividad.

Sin embargo, el efecto de la fosforilación de SERT sobre su modulación no parece ser tan evidente cuando la incorporación del fosfato es por la vía del AMPc. Ello abre el campo de estudio acerca de este efecto y sus consecuencias.

Por otro lado, y dentro de la regulación fisiológica de SERT, cabe mencionar el efecto producido por el propio sustrato de 5-HT. Así, diversos estudios han demostrado que la 5-HT, a tiempo corto de exposición, previene la fosforilación dependiente de PKC en SERT y su internalización. En un estudio realizado por Ramamoorthy y Blakely (1999), se demostró que la fosforilación de SERT mediada por la PKC, en células transfectadas (HEK-293SERT) se redujo sustancialmente en presencia de 5-HT y, consecuentemente, los niveles de expresión de SERT en la superficie celular aumentaron. Esta acción de la 5-HT extracelular podría ser debida a la actividad sobre el propio transportador y estaría asociado a cambios conformacionales de SERT, según estos autores.

Otro aspecto que se ha estudiado es el papel de la glicosilación en la expresión del transportador. Se han descrito diversas secuencias consenso para la glicosilación en el bucle largo que se encuentra entre los dominios transmembrana 3 y 4, y aunque la glicosilación parece ser importante para la expresión normal de SERT en la membrana, no afecta a la unión del ligando ni a la traslocación del sustrato (Tate y cols. 1994).

### 2.5.3. Interacciones proteína-proteína

El hecho de que SERT sea un transportador cuyo tráfico intracelular esté regulado, parece indicar la posibilidad de que exista interacción entre SERT y otras proteínas que pudieran mediar este proceso. Además, SERT contiene zonas de la secuencia que participan en la interacción directa proteína-proteína, tales como leucinas repetidas en el dominio transmembrana 2, un sitio PDZ de unión en el extremo carboxilo, y tirosinas y di-leucinas que contribuyen a la internalización.

Mediante el uso de técnicas de co-inmunoprecipitación y del sistema de dobles híbridos en levaduras, se han detectado un gran número de interacciones, aunque el significado fisiológico de muchas de ellas no se conoce. Bauman y cols. (2000) mostraron que la proteína fosfatasa 2A (PP2A) co-inmunoprecipitaba con SERT, y esta interacción estaba regulada por la inhibición de la fosfatasa, la activación de PKC y el transporte de sustratos. Aunque no se conoce si PP2A se une directamente a SERT, esta asociación podría ayudar a explicar los procesos moleculares responsables de la fosforilación del transportador y su internalización.

Otra interacción que se ha descrito “in vitro” es la del extremo carboxi terminal de SERT con MARKS (myristoylated alanine-rich C kinase substrate) (Jess y cols. 2002), sin embargo se desconoce si esta unión se produce “in vivo”.

Otros resultados (Haase y cols. 2001) sugieren que la proteína syntaxina I perteneciente a la familia de proteínas SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-attachment protein receptor) podría estar involucrada en los efectos moduladores de la PKC. Asimismo, resultados obtenidos por Torres y cols. (2001) apuntan hacia la posible asociación del transportador de serotonina con proteínas que interaccionan con la PKC, como mecanismo de regulación de su anclaje en la membrana.

## 2.6. Estudios genéticos de la actividad de SERT

La alteración genética del gen que codifica SERT utilizando ratones y la tecnología de producción de “knockouts” (SERT-KO: ratones en los que se anula la expresión del gen de SERT), ha proporcionado la oportunidad de estudiar el papel de SERT “in vivo”.

El ratón SERT-KO (no se expresa SERT), muestra una elevación extracelular de 5-HT de hasta 6 veces y una disminución marcada (60-80%) del contenido tisular de 5-HT en diversas regiones del cerebro (Bengel y cols. 1998). Las notorias alteraciones neuroquímicas que se han observado en el ratón mutante indican que SERT es crucial en la homeostasis presináptica en dos aspectos. Primero: Constituye el principal mecanismo que finaliza la neurotransmisión extrayendo 5-HT de la hendidura sináptica. Segundo: La recaptación es el principal mecanismo de restitución de los almacenes intracelulares de 5-HT.

Además de los cambios en la homeostasis de 5-HT, el análisis de SERT-KO ha mostrado alteraciones en la respuesta a los receptores post-sinápticos. Así, estos receptores resultaron regulados a la baja (down-regulation) (Fabre y cols. 2000). Esto es consecuencia del elevado nivel de 5-HT extracelular que se produce como consecuencia de la falta de funcionalidad de SERT.

Además de plantear la transgénesis como técnica para el estudio de la actividad de SERT, recientes estudios han mostrado que la actividad transcripcional del gen de SERT (SLC6A4) está modulada por un elemento polimórfico repetitivo (5-HTTLPR, 5-HT Transporter gene-linked polymorphic region) (Figura 5) localizado con anterioridad al sitio de inicio de la transcripción (Haddley y cols. 2007). Asimismo, se han descrito variaciones en la región 5' no traducida (5'UTR), causadas por empalme alternativo del exón 1B y 1C, en el intrón 2 (un número variable de 16/17 pares de bases repetidas en tándem, VNTR-17), y en la región 3' no traducida (3'UTR) (Lesch, 2001).

La estructura distinta de la región 5-HTTLPR da lugar a la formación de una estructura secundaria de ADN que tiene el potencial de regular la actividad transcripcional del promotor asociado al gen de SERT. Existen dos variantes alélicas de la región 5-HTTLPR, la variante corta (s) y la variante larga (l) que modulan de modo distinto la actividad transcripcional del promotor del gen de SERT (Lesch, 1996). Estos polimorfismos consisten en un tándem multialélico de 17 bp repetidas y la



## **2.7. Patologías en las que existe alteración de la actividad serotoninérgica: Papel de SERT**

La serotonina ha mostrado ser un neuromodulador implicado en la regulación de un gran número de procesos en el organismo. Sin embargo, la implicación de la alteración del sistema serotoninérgico en procesos patológicos ha sido fundamentalmente descrita, como ya se ha comentado anteriormente, para dos tipos de patologías:

- 1.- Las asociadas a alteraciones de la conducta en el sistema nervioso central
- 2.- Las enfermedades inflamatorias crónicas del tracto gastrointestinal.

### **2.7.1. Alteraciones de la conducta e implicaciones serotoninérgicas**

Diversos estudios neurobiológicos y neuroanatómicos indican la importancia de los cambios en el sistema noradrenérgico y serotoninérgico en las patologías asociadas a trastornos de la conducta (Purselle y Nemeroff, 2003; Tiihonen y cols. 1997; Malison y cols. 1998).

El papel del sistema serotoninérgico viene determinado por el nivel disponible de 5-HT, lo cual está en parte modulado por SERT, y la expresión de los receptores, especialmente a nivel postsináptico. Se ha descrito que el número de sitios de recaptación de 5-HT presinápticos (SERT) se encuentra disminuido y que la expresión de receptores postsinápticos está aumentada en pacientes con depresión, sin embargo en otros estudios se han obtenido resultados contrarios (Nestler, 1998). Asimismo, se han descrito niveles menores de 5-HT y una reducción en la recaptación de 5-HT y en los niveles de SERT en plaquetas de pacientes con depresión (Quintana, 1992). La densidad de SERT en corteza prefrontal de víctimas de suicidio, y en corteza occipital e hipocampo de pacientes con depresión fue menor que en individuos normales (Stanley y cols. 1982; Perry y cols. 1983), aunque algunos resultados de otros estudios parecen ser contradictorios (Gross-Isseroff y cols. 1989).

En lo que se refiere a la densidad de receptores, los 5-HT<sub>2</sub> presentan una densidad más alta en la corteza prefrontal, hipocampo y plaquetas de pacientes con depresión y víctimas de suicidio, que en individuos normales (Arora y Meltzer, 1989). Asimismo, la densidad de receptores 5-HT<sub>1A</sub> parece ser más alta en corteza prefrontal

de pacientes depresivos (Matsubara y cols. 1991). En ambos casos también se han obtenido resultados contradictorios en otros estudios.

Las variaciones que presenta el sistema serotoninérgico en estas patologías relacionadas con trastornos de la conducta han conducido a la teoría serotoninérgica que defiende que en los pacientes con depresión hay una disminución generalizada de la actividad serotoninérgica (Feldman y cols. 1997). Además, el hecho de que el tratamiento antidepresivo con inhibidores de la recaptación de 5-HT sea efectivo, avala esta teoría. No obstante, y a pesar de que estos fármacos inhiben inmediateamente la recaptación de 5-HT, el efecto no se observa a corto plazo, sino que requiere un tratamiento repetitivo y largo en el tiempo.

El papel de la serotonina en las patologías asociadas a trastornos de la conducta parece evidente pero no es el único factor que contribuye a ellas. De hecho se ha descrito que la depresión no es exclusivamente de origen neuroquímico, sino que está asociada a dificultades en las vías de señalización que regulan la neuroplasticidad y la supervivencia celular. En este sentido, se ha postulado que en situación de estrés y de depresión se encuentra disminuida la plasticidad celular neuronal, en parte debido a la reducción en los niveles de BDNF (brain derived neurotrophic factor) que promueven la supervivencia celular. Así, la administración crónica de antidepresivos actuaría por esta vía aumentando la expresión de BDNF en el cerebro (Manji y cols. 2001).

### **2.7.2. Alteraciones de la actividad gastrointestinal e implicaciones serotoninérgicas**

La serotonina es un neuromodulador sintetizado mayoritariamente en el tracto gastrointestinal, que actúa como vía de transducción de la información sensitiva desde la luz intestinal hasta los plexos nerviosos, la musculatura y el epitelio intestinal. La 5-HT liberada desde las células enterocromafines y actuando a través de diversos tipos y subtipos de receptores localizados en la mucosa y en los plexos submucoso y entérico, contribuye al normal funcionamiento del tracto gastrointestinal.

Las alteraciones del sistema serotoninérgico gastrointestinal producen afectación de un gran número de procesos en este tracto, sin embargo, el papel de la 5-HT en las patologías infecciosas e inflamatorias crónicas gastrointestinales (IBD, Inflammatory Bowel Disease; IBS, Irritable Bowel Syndrome) ha sido el más estudiado y el que ha adquirido mayor relevancia. Se desconoce el origen de estas patologías, sin embargo



está demostrado que la actividad serotoninérgica mediada por receptores en los plexos nerviosos intestinales está implicada en la sintomatología de las mismas (diarrea y/o estreñimiento, dolor y malestar).

La secreción de 5-HT en el tracto gastrointestinal es enorme y requiere el sistema de recaptación e inactivación que proporciona el transportador de 5-HT. De este modo, se evita la desensibilización de los receptores y la 5-HT puede ejercer sus efectos moduladores. No obstante, y en ausencia de actividad de SERT se ha visto que otros transportadores, como los de cationes orgánicos y el transportador de dopamina, proporcionan transporte de 5-HT pero con baja afinidad y alta capacidad (Chen y cols. 2001). Estos transportadores compensan la falta de SERT, pero el grado de compensación no es suficiente para mantener una funcionalidad normal.

El estudio del papel del transportador SERT en las patologías gastrointestinales tipo IBD e IBS, se ha llevado a cabo mediante el uso de ratones en los que se ha suprimido la expresión génica de SERT (SERT-KO). Así, se ha visto que estos ratones muestran un aumento de la actividad cólica y presentan un aumento del contenido de agua en las heces, y además sufren un patrón alternante de diarrea y estreñimiento (Chen y cols. 2001).

En modelos experimentales de inflamación intestinal se ha detectado una reducción de la transcripción de SERT (Linden y cols. 2003) que también aparece reducida en pacientes con IBD o IBS (Coates y cols. 2004). En estas condiciones la respuesta del tracto gastrointestinal no fue distinta de la que mostraba el ratón SERT-KO. La reducción de la transcripción de SERT inducida por la inflamación lleva a pensar que existe un defecto común en la expresión mucosal de SERT que conduciría a los síntomas observados tanto en pacientes de IBD como de IBS. Esta idea es compatible con la posibilidad de que una o más alteraciones de la señalización entérica de 5-HT puedan contribuir a la patogénesis del IBS. (Gershon y Tack, 2007).

Además de las alteraciones de SERT detectadas en IBD e IBS, también hay otros parámetros relacionados con el procesamiento de la 5-HT que parecen estar afectados. Así, en la colitis ulcerosa, el número de células enterocromafines parece estar disminuido y el nivel de ARNm de TpH-1 (enzima triptófano hidroxilasa, factor limitante de la síntesis de 5-HT) y la inmunoreactividad a SERT también fueron menores (Coates y cols. 2004). Sin embargo en el plexo mientérico del íleon de

pacientes con enfermedad de Crohn parece existir un aumento de inmunoreactividad a la 5-HT (Belai y cols. 1997).

Asimismo, diversos estudios han mostrado que en pacientes con la modalidad de IBS en la que predomina el estreñimiento, existe una reducción de la expresión de TpH-1, SERT y de inmunoreactividad a SERT (Cotaes y cols. 2004) así como una reducción del nivel de 5-HT sérico post-prandial (Atkinson y cols. 2006). Sin embargo, en el IBS en el que predomina la diarrea (IBS-d) se ha descrito un aumento de los niveles plasmáticos de 5-HT (Atkinson y cols. 2006).

La hipótesis de que la serotonina participa en la fisiopatología del IBS requiere un perfecto conocimiento del papel de la 5-HT en la fisiología gastrointestinal. El problema que se plantea es que el papel de la 5-HT sobre este tracto es tan extenso y variado que es difícil determinar cuáles de las acciones de 5-HT están comprometidas en las patologías.

La idea más defendida respecto al papel de la 5-HT en las patologías gastrointestinales, es la alteración de la actividad motora mediada por 5-HT en las mismas. Los estímulos detectados en la mucosa provocan la liberación de 5-HT desde las células enterocromafines. Así, la 5-HT puede activar las neuronas aferentes intrínsecas o extrínsecas en la mucosa, modulando la respuesta motora. Las neuronas extrínsecas están activadas por receptores 5-HT<sub>3</sub> y transmiten la sensación de malestar al sistema nervioso central. Por ejemplo, los agentes quimioterápicos anticancerosos liberan 5-HT desde las células enterocromafines que activa las neuronas aferentes extrínsecas para inducir náuseas y vómito.

Otros subtipos de receptores implicados en la respuesta de 5-HT gastrointestinal son los 5-HT<sub>3</sub> y los 5-HT<sub>7</sub> que estimulan las neuronas primarias aferentes intrínsecas, que a su vez inician los reflejos peristálticos y secretores (Cooke y cols. 1997; Tonini y cols. 2005). Los receptores 5-HT<sub>4</sub> también están implicados en los procesos motores gastrointestinales. Estimulan la motilidad y la secreción, pero a través del aumento de la liberación de ACh de neuronas motoras excitatorias y de interneuronas (Prins y cols. 2000).

## **2.8. Regulación farmacológica del transportador de serotonina**

A pesar de que el mecanismo de recaptación de neurotransmisores (DA, NE, 5-HT) se conoce desde hace varias décadas, la disponibilidad de fármacos selectivos que actúan sobre estos transportadores es bastante reciente. La mayor parte del conocimiento sobre los sistemas de recaptación de neurotransmisores se ha obtenido mediante la medida de neurotransmisores marcados radiactivamente en cortes histológicos o en sinaptosomas de cerebro. Asimismo, la clonación de los transportadores y la posibilidad de expresarlos en células no neuronales está permitiendo un mayor conocimiento del mecanismo de acción de los diferentes transportadores, así como la posibilidad de encontrar nuevos fármacos selectivos que afecten a su actividad.

El descubrimiento de la implicación de la serotonina en patologías del sistema nervioso central y del tracto gastrointestinal, así como el hecho de que estas patologías muestren una incidencia creciente en el mundo occidental, ha acentuado enormemente el interés por el desarrollo de sistemas farmacológicos que actúen sobre el sistema de recaptación de 5-HT mediados por SERT. Este transportador se ha convertido en la diana efectiva para distintos tratamientos farmacológicos, como es el caso de las sustancias inhibitoras de la recaptación de serotonina (SSRIs) (Crowell, 2001; Lesch, 2001; Gareri y cols. 2000; Pace y cols. 1995).

Diversos trabajos científicos han demostrado que la alteración de la actividad serotoninérgica cerebral es una de las causas que conduce a trastornos del comportamiento y que está implicada en la neurobiología de la depresión (Feldman y cols. 1997), en la drogodependencia (Sora y cols. 1998), y en las patologías asociadas. Por ello se planteó el tratamiento de estos desórdenes conductuales con fármacos inhibidores de la recaptación de la serotonina.

Actualmente, los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRIs) son los antidepresivos más utilizados en el mundo occidental. Una ventaja que presentan estas sustancias es que, además de tener efectos antidepresivos, son eficaces en otros trastornos centrales como en las crisis de pánico, las alteraciones compulsivo-obsesivas y la bulimia. Además los SSIRs han supuesto un gran avance y han revolucionado el tratamiento de la depresión ya que, al igual que los inhibidores de la MAO (monoamina oxidasa) incrementan la disponibilidad de 5-HT, pero a diferencia

de éstos, los SSRI son fármacos más seguros y mejor tolerados, carecen de toxicidad cardíaca y de efectos secundarios colinérgicos.

Asimismo, diversos estudios sugieren un potencial papel terapéutico de los SSRI en el tratamiento de patologías gastrointestinales crónicas inflamatorias como es el IBS (Masand y cols. 2005)

Todos estos efectos se atribuyen al perfil farmacológico de estos compuestos cuyo mecanismo de acción consiste en causar una potente desinhibición de la neurotransmisión serotoninérgica, presumiblemente en todas las vías serotoninérgicas a nivel central y periférico.

No obstante, los efectos de los SSRI no se detectan de modo inmediato, sino que requieren un periodo de administración prolongado para obtener resultados antidepresivos. Ello ha hecho pensar que la acción terapéutica de estos fármacos no se debe exclusivamente al efecto directo que conduce al aumento de la actividad serotoninérgica, sino que pueden existir respuestas a más largo plazo que se generan a partir de este primer efecto (Lesch, 2001).

Por último es necesario indicar que los transportadores de dopamina (DAT), noradrenalina (NET) y serotonina (SERT), no sólo son dianas importantes para agentes terapéuticos, incluyendo los antidepresivos, sino que también son susceptibles de resultar afectados por psicoestimulantes y neurotoxinas.

En este sentido, la cocaína y las anfetaminas son dos sustancias psicoestimulantes que interactúan con dichos transportadores. La cocaína es un inhibidor competitivo de los transportadores de monoaminas, en cambio, las anfetaminas son sustratos de los propios transportadores de monoaminas (Figura 3), y una vez dentro de la célula provocan una liberación masiva de monoaminas al espacio extracelular. Como resultado, tanto la cocaína como las anfetaminas aumentan los niveles de monoaminas en el espacio extracelular. Ello conduce a la alteración de la conducta a corto plazo, a las alteraciones neuropsíquicas en la drogadicción, al síndrome de abstinencia y a la conducta adictiva.

En resumen, y en lo que a los efectos farmacológicos sobre SERT, este transportador se expresa en numerosas células neuronales y no neuronales, incluyendo las plaquetas (Rudnick, 1977), células epiteliales del intestino (Wade y cols. 1996) y células cromafines adrenales (Schroeter y cols. 1997). SERT es una diana de alta

afinidad para antidepresivos tricíclicos como es la imipramina, para inhibidores específicos de la recaptación de serotonina (SSRIs) como es la fluoxetina, que bloquea el transportador e intensifica la señal serotoninérgica, y para estimulantes no selectivos como la cocaína y las anfetaminas (Reith, 1997; Barker y Blakely, 1995). Estas sustancias, actúan elevando la concentración extracelular de 5-HT potenciando la acción sináptica de la 5-HT, provocando una desensibilización de los receptores de 5-HT, lo que en conjunto afecta a la actividad serotoninérgica general.



## **II. OBJETIVOS**





La 5-HT es un neuromodulador que regula la fisiología de diversos órganos en el ser vivo. De especial relevancia es la implicación de la 5-HT en el sistema nervioso central, en el cual está demostrada la importancia de la actividad serotoninérgica para poder desarrollar y modular aspectos de la conducta, y en el tracto gastrointestinal, donde la 5-HT modula diferentes aspectos de la fisiología de dicho tracto, tanto en lo que se refiere a la actividad motora, como a los procesos de absorción de nutrientes y secreción de agua y electrolitos.

Asimismo, se ha demostrado que la alteración de la actividad serotoninérgica parece estar implicada en el origen y/o persistencia de patologías crónicas relacionadas tanto con la actividad del sistema nervioso central (alteraciones de la conducta, depresión, ansiedad, etc.), como del tracto gastrointestinal (síndrome del colon irritable, IBS, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn). Todas estas patologías además, presentan una incidencia creciente en el mundo occidental.

La actividad que desarrolla la 5-HT está mediada por su unión a receptores específicos localizados en la membrana de las células diana, de los cuales se han descrito hasta 14 tipos distintos. Asimismo, la función de la serotonina mediada por sus receptores se encuentra condicionada por la disponibilidad de dicho neuromodulador, de tal modo que un exceso de 5-HT conduce a la regulación a la baja (down-regulation) de los receptores en la membrana.

La disponibilidad de 5-HT en el medio intersticial depende de la función de dos sistemas: por un lado del sistema liberador de 5-HT desde la célula que la sintetiza (sistema "ON") y del sistema de recaptación de la 5-HT, mediante el transportador de serotonina (sistema "OFF").

El transportador de serotonina (SERT) es una proteína de membrana clonada en 1991, y que se expresa tanto en las neuronas del sistema nervioso central como en sistemas celulares periféricos (plaquetas, enterocitos, sistema nervioso entérico, etc.). El papel que desarrolla SERT en la regulación de la disponibilidad de 5-HT ha convertido a esta proteína en una muy importante diana farmacológica para el tratamiento de patologías crónicas en las que se encuentra implicada la 5-HT, especialmente en el caso de la depresión. Así, el hecho de que moléculas inhibitoras específicas de la recaptación de 5-HT (SSRIs) hayan mostrado un efecto antidepressivo eficaz, ha incrementado enormemente el interés del mundo científico en el conocimiento funcional y molecular del transportador de serotonina, especialmente en la especie humana.

Desde la clonación de SERT, y una vez demostrada la implicación de esta proteína en patologías crónicas humanas de incidencia creciente, una parte importante de la actividad científica se ha centrado en el establecimiento de modelos animales y celulares que permitieran realizar estudios extrapolables a la situación humana, especialmente en lo que se refiere al SERT humano (hSERT) en el sistema nervioso central y el tracto gastrointestinal. Así, existen modelos de ratas con síntomas de depresión (Overstreet, 1993) y se han utilizado tratamientos químicos (TNBS, DSS, etc) para simular procesos patológicos inflamatorios crónicos intestinales en diversos animales de experimentación.

No obstante, han sido los modelos celulares los que en gran medida han permitido desarrollar el conocimiento de hSERT en su aspecto molecular. Especialmente frecuente ha sido el uso de líneas celulares transfectadas con el ADNc que codifica hSERT para este fin. Sin embargo estos modelos celulares, aún siendo de gran utilidad, presentan la dificultad de no expresar endógenamente hSERT, lo cual los distancia de la situación fisiológica real.

El hecho de que la mayor parte de 5-HT (95%) del organismo se sintetice en las células enterocromafines del tracto intestinal (sistema “ON”) y de que se haya demostrado la actividad moduladora de 5-HT sobre la fisiología intestinal, ha conducido a la idea de que dicho tracto debería disponer de un sistema de aclaramiento de 5-HT del medio intersticial (sistema “OFF”). Ello condujo a la clonación y caracterización de SERT en la mucosa de intestino delgado de cobaya realizada por Chen y cols. (1998). Este resultado abrió la posibilidad de contar con un sistema de expresión endógena de

SERT en sistemas periféricos que podría ser útil para profundizar en la caracterización molecular de dicha proteína.

Con todo ello, y dado que nuestro grupo de investigación ha desarrollado una parte de su actividad investigadora en el estudio de la actividad serotoninérgica intestinal, y aprovechando la disponibilidad de la línea celular humana de tipo enterocitario Caco-2 y el establecimiento en nuestro laboratorio de la metodología para su uso con fines científicos, se plantearon los siguientes objetivos científicos relativos al estudio de hSERT, que a continuación pasamos a detallar:

- 1. Determinar la expresión endógena de hSERT en las células Caco-2.**
- 2. Caracterizar molecular y funcionalmente hSERT en células Caco-2 estableciendo patrones de expresión con la diferenciación celular.**
- 3. Determinar los sistemas de regulación intracelular que modulan la función de hSERT.**
- 4. Estudiar la regulación fisiológica de hSERT mediada por el propio sustrato, 5-HT, así como la implicación de receptores 5-HT en este efecto en las células Caco-2.**
- 5. Determinar la regulación farmacológica de hSERT, mediada por el tratamiento con fluoxetina (SSRI) en las células Caco-2.**



## **III. MATERIAL Y MÉTODOS**



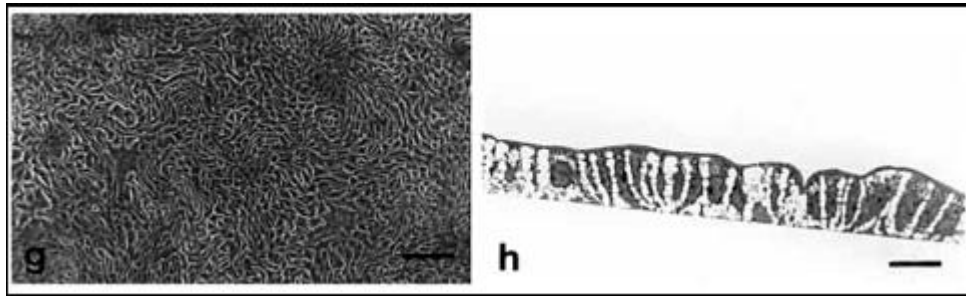
### **III.1. MODELO EXPERIMENTAL: LA LÍNEA CELULAR CACO-2**

Para realizar nuestro estudio de identificación y caracterización del transportador de serotonina, hemos utilizado la línea celular humana Caco-2 como modelo experimental “in vitro”. En concreto hemos usado el clon TC7 derivado de la línea celular madre por dilución límite (Chantret y cols. 1988), que nos ha sido cedido por la Dra. Edith Brot-Laroche de la Unidad 505 del INSERM (París, Francia).

La línea celular Caco-2 fue establecida en 1974 a partir de un adenocarcinoma de colon humano (Fogh y cols. 1975). Esta línea celular es la única capaz de desarrollar, de forma espontánea, una diferenciación morfológica y funcional de tipo enterocitario en las condiciones estándar de cultivo (Meunier y cols. 1995; Pinto y cols. 1983; Rousset, 1986). Las células son indiferenciadas durante toda la fase de crecimiento exponencial, y su diferenciación sólo ocurre tras alcanzar la confluencia celular, durante su fase estacionaria. Las células diferenciadas forman una monocapa de células polarizadas, presentando microvillosidades en su parte apical y separándose del dominio basolateral por fuertes uniones estrechas (Figura 6). Estas células expresan hidrolasas, transportadores de hexosas y otras proteínas enterocitarias. Estas y otras observaciones realizadas sobre esta línea celular resaltan su interés como modelo de estudio del funcionamiento de la célula enterocitaria, a pesar de su origen cólico (Zweibaum, 1991).

La heterogeneidad presente dentro de la línea celular Caco-2, como ocurre en casi todas las líneas celulares establecidas, indujo a la obtención de clones a partir de la línea parental de diferentes pasajes mediante la técnica de dilución límite (Chantret y cols. 1988). Entre los clones obtenidos, el clon TC7 (Figura 6), presenta unas características morfológicas y funcionales enterocitarias similares a línea parental

(Chantret y cols. 1988; Mahraoui y cols. 1994), con una mayor homogeneidad (Grès y cols. 1998), por lo que fue elegido para este trabajo.



**Figura 6.** Imágenes microscópicas de células Caco-2/TC7 confluentes en contraste de fases (izda.) y en sección perpendicular al soporte plástico (dcha.) (Chantret y cols. 1988).

### 1.1. Material y equipo de cultivo celular

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

En nuestro caso, hemos utilizado una cabina de flujo laminar recirculante vertical de clase II (TELSTAR AV-100). Este tipo de cabinas ofrecen protección al operario y la esterilidad necesaria para la manipulación de los cultivos celulares (Figura 7). Cada día, y previo a la utilización de la campana, ésta era esterilizada con luz ultravioleta, y posteriormente limpiada la superficie de trabajo con etanol al 70%. Asimismo, el flujo de aire de la cabina era conectado y mantenido durante un tiempo anterior a la manipulación celular para permitir su estabilización y asegurar el trabajo en condiciones de esterilidad.

Asimismo, se dispuso de un microscopio de luz invertida (Olympus CK2) para visualizar y examinar, en contraste de fases, el tapiz celular de las cajas de cultivo, y para realizar el recuento de las células en suspensión antes de una nueva siembra (Figura 7).

Las células son mantenidas en cultivo en una estufa de CO<sub>2</sub> (Haeraeus BB 16) (Figura 8). En ella se mantiene la temperatura constante a 37°C, y una atmósfera humidificada, con un 95% de aire y un 5% de CO<sub>2</sub>.





**Figura 7.** Fotografías de la cabina de flujo laminar (izda.) y del microscopio de luz invertida (dcha.) utilizados para la manipulación y el examen visual de las células respectivamente.



**Figura 8.** Estufa de incubación a CO<sub>2</sub> (izda.). Caja de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (dcha. superior), y placa de 24 pocillos utilizada para estudios de transporte (dcha. inferior).

## 1.2. Cultivo de la línea celular Caco-2/TC7

Las células fueron cultivadas en cajas de plástico de 25 ó 75 cm<sup>2</sup> de superficie, o bien en placas de 24 pocillos de 2 cm<sup>2</sup> cada pocillo (Figura 8). Las cajas de 25 y 75 cm<sup>2</sup> fueron utilizadas para el mantenimiento de la línea, para la preparación de homogenados celulares y vesículas de membrana apical, y también para la extracción de ARN. Las placas de 24 pocillos fueron utilizadas para los experimentos de medida de transporte. Siempre se utilizó material plástico estéril de uso único (Sarstedt).

El medio de cultivo utilizado fue el Medio Esencial Mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM) que contenía 25 mM de glucosa, suplementado con un 20% de suero fetal bovino (SFB), previamente descomplementado durante 30 minutos a 56°C. Además, el medio de cultivo fue completado con: 1% de Penicilina (10.000 UI/ml) – Estreptomicina (10 mg/ml); 1% de aminoácidos no esenciales 10 mM; y 2% de L-glutamina 200 mM. El medio de cultivo y las soluciones utilizadas fueron suministradas por Gibco-Invitrogen.

El medio de cultivo así preparado se conserva en frigorífico a 4°C. Previamente a su uso es precalentado a 37°C en un baño termostático, para evitar un choque térmico sobre las células.

El volumen de medio de cultivo adicionado al cultivo celular fue de 0,2 ml/cm<sup>2</sup> de superficie, correspondiendo por lo tanto a 5 y 15 ml para las cajas de 25 y 75 cm<sup>2</sup>, respectivamente. En las placas de 24 pocillos se añadió un volumen de 1 ml para contrarrestar la tensión superficial de las paredes próximas del pocillo. El cultivo fue mantenido en una estufa de CO<sub>2</sub> a una temperatura de 37°C, en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub> humidificada, siendo mantenidos y controlados todos estos parámetros por el propio incubador.

Para iniciar el cultivo de las células, se parte de un vial congelado que contiene 1-3x10<sup>6</sup> células, en un volumen de 1,5 ml de medio de cultivo con un 30% de SFB y un 10% de glicerol. Las células se descongelan lentamente introduciendo el vial en agua caliente a 37°C. Una vez que el vial está descongelado, las células son diluidas en 5 ml de medio de cultivo y centrifugadas a 3.000 rpm (950 g). Una vez eliminado el sobrenadante las células son resuspendidas en 5 ml de medio de cultivo y depositadas en una caja de 25 cm<sup>2</sup>.

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

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

### 1.3. Mantenimiento de la línea celular Caco-2

Para el mantenimiento de la línea celular Caco-2 se han utilizado cajas de 25 cm<sup>2</sup>, que eran tripsinizadas semanalmente. Una vez que hayan llegado al 80-90% de confluencia, las células adherentes se separan de la superficie de la caja de cultivo, y se individualizan, utilizando una solución de tripsina-EDTA en solución PBS. La tripsina y el EDTA (0,25% tripsina-1 mM EDTA) se utilizan conjuntamente, ya que las proteínas de adherencia y unión necesitan calcio y magnesio. Así, la tripsina actúa produciendo la digestión de las proteínas de adherencia y el EDTA se encarga de secuestrar los cationes divalentes libres inhibiendo la actividad de proteínas calcio/magnesio-dependientes.

La solución tripsina-EDTA se prepara a partir de soluciones comerciales estériles, o previamente esterilizadas con filtros de 0,2 µm de poro. Las composiciones del PBS (1X) y de la tripsina-EDTA se indican a continuación:

<b>PBS (1X)</b>	<b>Componentes</b>	<b>(g/l)</b>
<i>pH</i> = 7,5	KCl	0,20
	HH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20
	NaCl	8,00
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,15

<b>Tripsina – EDTA</b>	<b>Composición</b>
	PBS 1X
	Tripsina 0,25%
	EDTA 1 mM

#### 1.4. Método de tripsinización y siembra de las células

La individualización se realiza sobre células en multiplicación, es decir, antes de que las células hayan alcanzado la confluencia, cuando las células ocupan el 80-90% de la superficie de su soporte de cultivo.

La tripsinización de las células se realizaba cada 5-6 días. Las células fueron sembradas a una densidad de  $1,2 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>, excepto en las placas de 24 pocillos que lo fueron a  $2 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> para facilitar la correcta homogeneidad de toda la superficie de cultivo dependiente de las paredes circulares del pocillo.

Para una caja de 25 cm<sup>2</sup>, el protocolo seguido es el siguiente:

- 1- Retirar el medio de cultivo y lavar las células 2 veces con 5 ml de PBS (37°C).
- 2- Retirar los 5 ml de PBS y añadir 1 ml de una solución de tripsina/EDTA precalentada a 37°C. Se deja actuar la tripsina durante 5 minutos a 37°C en la estufa de cultivo, con la caja de células completamente cerrada.
- 3- Para levantar las células del soporte plástico, se dan unos pequeños golpes laterales a la caja, y con ayuda de una pipeta estéril y 5 ml de medio de cultivo estándar (para inactivar la tripsina) se realiza la homogeneización e individualización celular, para facilitar su recuento y posterior siembra.
- 4- Las células en suspensión son recuperadas en un tubo cónico estéril, y centrifugadas a 1.000 g durante 5 minutos.
- 5- Se elimina el sobrenadante mediante aspiración, se resuspenden las células en 5 ml de medio de cultivo, y se toma una pequeña muestra para su recuento.
- 6- La densidad celular se determina con la ayuda de una cámara o célula de Malassez (o cámara de Neubauer). Para ello, una muestra de la suspensión celular (50 µl) es diluida en 100 µl de Azul Trypan (dilución 1/3). El azul de Trypan permite diferenciar las células viables de las células no viables, que son teñidas de azul al estar alterada la permeabilidad de su membrana plasmática. Con la ayuda de un microscopio de luz invertida se cuentan las células en una superficie de 1 mm<sup>2</sup>. Para hallar el número de células por ml de suspensión celular, se realiza el siguiente cálculo:

- El número de células se multiplica por 3 (factor de dilución).

- El número resultante se multiplica por 10.000, para extrapolar las células contadas en el volumen de  $0,1 \text{ mm}^3$ , hasta el volumen final de 1 ml ( $1 \text{ cm}^3$ ).
- En resumen:  $n^\circ \text{ células contadas} \times 30.000 = n^\circ \text{ células/ml de suspensión}$ .

7- Conocida la densidad de la suspensión celular, se procede al cálculo del volumen de la suspensión celular necesario para la siembra de nuevas cajas de cultivo.

La densidad celular de siembra fue de  $1,2 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>, es decir, entre  $0,3 \times 10^6$  células en una caja de  $25 \text{ cm}^2$  y 40.000 células por pocillo en las placas de 24 pocillos y en los soportes permeables biocompartimentados (transwell). De esta manera se asegura una distribución celular homogénea sobre todo en las placas multipocillos, que suele estar condicionada por la forma circular del pocillo y la tensión superficial del medio de cultivo sobre las paredes del mismo. Las placas y las cajas con las células fueron depositadas en la estufa de cultivo; las cajas con el tapón en posición entreabierto para permitir el flujo de gas y aire, y de esta manera facilitar la adhesión de las células a la superficie del plástico y su posterior crecimiento. Se cambia el medio de cultivo al tercer día tras la siembra y posteriormente una vez cada dos días.

## III.2. ESTUDIOS DE TRANSPORTE DE 5-HT

### 2.1. Medios necesarios para los estudios de transporte en células Caco-2

Las soluciones y medios utilizados para los experimentos de transporte son los siguientes:

	<b>Tampón I</b> (medio de lavado) (37° C)	<b>Tampón II</b> (medio de incubación) (37° C)	<b>Tampón III</b> (solución stop) (4° C)
NaCl	137,0 mM	137,0 mM	137,0 mM
KCl	4,7 mM	4,7 mM	4,7 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mM	1,2 mM	1,2 mM
MgSO <sub>4</sub>	1,2 mM	1,2 mM	1,2 mM
CaCl <sub>2</sub>	2,5 mM	2,5 mM	2,5 mM
HEPES-Tris pH=7,2	10,0 mM	10,0 mM	10,0 mM
Glutamina		4,0 mM	4,0 mM
BSA		0,1 mg/ml	0,1 mg/ml
Ácido Ascórbico		1 mM	1 mM
[5-HT]		2x10 <sup>-7</sup> M	2x10 <sup>-5</sup> M
[ <sup>3</sup> H-5-HT]		1,5 µCi/ml	

En aquellos experimentos en los que era necesario trabajar en un medio de incubación sin Na<sup>+</sup>, el NaCl fue sustituido isosmóticamente por cloruro de colina. Esta sustitución se realizó en los tampones I, II y III.

La cantidad de radioactividad que se utilizó dependió de la capacidad del transportador, y de su expresión en la célula. La cantidad deberá ser suficiente para poder detectarla correctamente, y variará para cada concentración de sustrato utilizada. En nuestro caso hemos utilizado 1,5 µCi/ml de [<sup>3</sup>H-5-HT] (Perkin-Elmer) para una concentración de 5-HT de 2x10<sup>-7</sup> M.

## 2.2. Medida del transporte de 5-HT en células Caco-2 sobre soporte plástico

En la mayor parte de los estudios de transporte, las células Caco-2 fueron cultivadas en placas de 24 pocillos, donde cada pocillo posee una superficie de 2 cm<sup>2</sup>. Según el tipo de experimento, se utilizaron distintos grados de confluencia celular, aunque la mayoría de los estudios se realizaron al noveno día post-confluencia (14 días después de la siembra).

La metodología utilizada para estos experimentos es la siguiente:

- Las células fueron cultivadas en placas de 24 pocillos según el protocolo descrito en el apartado anterior, y en las condiciones experimentales y tiempo definidas para cada tipo de experimento.
- Antes de realizar el experimento de medida de transporte, las células son incubadas en la estufa a 37°C en medio de cultivo D-MEM sin SFB durante 6 o 48 horas, en función del experimento. El suero fetal bovino fue retirado para evitar interferencias con nuestra sustancia en estudio, la serotonina.
- Tras el tiempo de incubación en ausencia de suero, las células se incuban con el tampón I (1 ml/pocillo, a 37°C en la estufa) durante 20 minutos, tiempo tras el cual las células son lavadas de nuevo con 1 ml de tampón I.
- A continuación, se añaden 0,5 ml de tampón II (medio de incubación) a 37°C, en el que son mantenidas las células durante el tiempo de medida de transporte, que en nuestro caso fue de 6 minutos.
- Transcurrido el tiempo de medida de transporte, las células fueron lavadas dos veces con 1 ml/pocillo de tampón III (solución stop fría).
- Tras el último lavado, el tapiz celular es incubado con 0,5 ml de NaOH 0,1 N durante 2 horas a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C, para romper la membrana celular.
- Posteriormente, con ayuda de una micropipeta, se homogenizó el tapiz celular con la solución de NaOH, y se tomaron muestras para la medida de la radiactividad incorporada a las células durante el tiempo de transporte, y para calcular la concentración proteica (Método de Bradford).

Para medir los valores de radiactividad, cpmM (cpm del medio de incubación) y cpmC (cpm de las células), se cogen 5 µl del tampón II (medio de incubación), y 200 µl del homogenado celular obtenido con el NaOH respectivamente. Sobre estas muestras radiactivas, se añadió 1,5 ml de líquido de centelleo (GE healthcare), y posteriormente se procedió a la lectura de los cpm de [<sup>3</sup>H] en un contador beta (Beckman).

### **2.3. Medida del transporte de 5-HT en células Caco-2 cultivadas en soportes permeables “Transwell”**

Para los estudios de transporte en soportes permeables bicompartimentales (transwell), las células fueron sembradas en placas de 12 pocillos que contienen un compartimento superior, creado por un soporte con una membrana semipermeable de poliéster (PET) de 0,4 µm de poro y una superficie de 1,2 cm<sup>2</sup> (Corning) donde se realiza la siembra celular (40.000 células/0,5 ml) que se encuentra introducido dentro de otro compartimento inferior donde se adiciona el medio de cultivo (1,5 ml). Estos soportes permeables, reproducen un ambiente epitelial muy similar al estado “in vivo” de las células, permitiendo que las células polarizadas se alimenten basolateralmente y, por lo tanto, realicen actividades metabólicas de una manera fisiológica.

La metodología utilizada en estos experimentos es la siguiente:

- 24 horas antes de la siembra las placas con los soportes semipermeables son mantenidas con el medio de cultivo en la estufa de incubación. Antes de realizar la siembra, se procede a medir la resistencia transepitelial entre los compartimentos mediante un sistema de medición de resistencia eléctrica (Millicell<sup>®</sup> ERS Millipore).
- Se realiza la siembra en las condiciones anteriormente indicadas.
- Seis horas antes de realizar el experimento, las células fueron incubadas en la estufa a 37°C en medio de cultivo D-MEM sin SFB.
- Antes de iniciar el experimento se mide la resistencia transepitelial con el fin de garantizar la total integridad del tapiz celular.
- Se lavan las dos cámaras dos veces con tampón I (1,5 ml compartimento inferior y 0,5 ml compartimento superior).



- Se añade el tampón I y se dejan 30 minutos a 37°C en la estufa. Se recogen 4 muestras de 5 µl de tampón II radiactivo como estándar del medio de transporte.
- Para medir el flujo *apical-basal*, se añade 0,5 ml de tampón II radiactivo en la cámara superior y 1,5 ml de tampón II sin radiactividad en la cámara inferior. Para la medición del flujo *basal-apical*, se añade 0,5 ml de tampón II sin radiactividad en la cámara superior y 1,5 ml de tampón II radiactivo en la cámara inferior. El tampón II en ambos casos contiene 5-HT  $10^{-7}$  M.
- Antes de iniciar el proceso de extracción de muestras, se mantienen las células con el medio de incubación durante 10 minutos para permitir la estabilización de los flujos.
- A los 10 minutos, se extraen muestras seriadas de 0,2 ml de cada pocillo donde no se ha añadido radiactividad y se repone este volumen con 0,2 ml de tampón II sin radiactividad. Se realizan como mínimo 9 extracciones.
- Durante el tiempo que transcurre entre la extracción del último pocillo y la extracción siguiente en el primer pocillo, se mantiene la placa a 37°C.
- Después de la última extracción, se extrae también una muestra de 5 µl del compartimento que tiene la radiactividad.
- Se realizan dos lavados con tampón III frío del compartimento superior e inferior.
- Se recorta la membrana que contiene las células y se introduce en 0,5 ml NaOH 0,1 N, y se mantiene a 4°C.
- Al día siguiente se extraen 0,2 ml de muestra del homogenado celular en NaOH, y se realiza el conteo de las cpm, junto con las muestras tomadas del tampón II con radioactividad.
- Se extraen, además, muestras del homogenado con NaOH para cuantificación de las proteínas (Método de Bradford).

## 2.4. Cálculo de la acumulación de 5-HT en células Caco-2 y de sus constantes cinéticas

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

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

donde:

- cpmC: cpm de los 200  $\mu\text{l}$  del homogenado celular.
- $V_m$ : volumen del medio de incubación radioactivo (5  $\mu\text{l}$ ).
- [5-HT]: concentración del sustrato en  $\mu\text{M}$  (0,2  $\mu\text{M}$ ).
- cpmM: cpm de los 5  $\mu\text{l}$  del medio de incubación.
- mg proteína: mg de proteína de los 200  $\mu\text{l}$  de nuestro homogenado celular.

Los estudios cinéticos se realizaron mediante el cálculo de las constantes  $V_{\text{max}}$ ,  $K_m$  y  $K_d$ , a través de la aplicación de una regresión no lineal y la adecuación de los resultados a una ecuación constituida por dos sumandos: el correspondiente a un sistema de transporte mediado más el correspondiente a un sistema de difusión simple:

$$V = \frac{V_{\text{max}} \times [S]}{K_m + [S]} + K_d \times [S]$$

Todos los análisis matemáticos se realizaron mediante el programa informático GraphPad Prism versión 4 (San Diego, USA).

## 2.5. Cálculo del flujo y la acumulación de 5-HT en soportes permeables

El cálculo de la cantidad de sustrato acumulado en las células durante el periodo de incubación con el medio de transporte en las placas transwell, se realizó utilizando la siguiente ecuación:

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

donde:

- cpmC: cpm de los 200  $\mu\text{l}$  del homogenado celular.
- $V_m$ : volumen del medio de incubación radioactivo (5 $\mu\text{l}$ ).
- [5-HT]: concentración del sustrato en  $\mu\text{M}$  (0,1  $\mu\text{M}$ ).
- cpmM: cpm de los 5  $\mu\text{l}$  del medio de incubación.
- mg proteína: mg de proteína de los 200  $\mu\text{l}$  de nuestro homogenado celular.

Para calcular el flujo apical–basal a través de las células durante los 10 minutos, se realizó el siguiente cálculo:

$$\text{pmol 5-HT / 10 min} = \frac{[\text{cpmB} \times V_B / V] - [\text{cpmA} \times V_A / V] \times [5\text{-HT}] \times V_m}{\text{cpmM}}$$

donde:

- cpmB: cpm de los 200  $\mu\text{l}$  del pocillo donde no se ha añadido la radioactividad (basal).
- $V_B$ : volumen del pocillo basal (1,5 ml).
- $V$ : volumen de la muestra extraída (200  $\mu\text{l}$ ).
- cpmA: cpm de los 200  $\mu\text{l}$  del pocillo donde no se ha añadido la radioactividad (basal obtenido en la extracción anterior).
- $V_A$ : volumen del pocillo basal (1,5 ml).
- [5-HT]: concentración del sustrato en  $\mu\text{M}$  (0,1  $\mu\text{M}$ ).
- $V_m$ : volumen del medio de incubación radioactivo (5 $\mu\text{l}$ ).
- cpmM: cpm de los 5  $\mu\text{l}$  del medio de incubación.

Si el flujo fuera basal-apical, el valor del  $V_{A \text{ o } B}$  sería 0,5  $\mu\text{l}$  y las cpmA o cpmB procederían de la extracción del compartimento apical.

### **III.3. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS: MÉTODO BRADFORD**

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

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

La intensidad de color genera absorbancia a una longitud de onda de 595 nm, que puede ser medida con la ayuda de un espectrofotómetro. La medida de absorbancia obtenida será proporcional a la concentración de proteínas en la muestra, mientras se cumpla la ley de Lambert-Beer.

La relación existente entre absorbancia y la concentración de proteínas se establece experimentalmente mediante el análisis de distintas concentraciones conocidas y crecientes de una proteína de referencia, en nuestro caso la albúmina sérica bovina (BSA), a las que se les aplica, de forma paralela a las muestras problema, el mismo método analítico.

Tras la adición del colorante, se mantienen en reposo los tubos durante 5 minutos, a continuación se lee la absorbancia de las mismas en un espectrofotómetro a 595 nm de longitud de onda.

### 3.1. Técnica del método de Bradford

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

<b>Componentes</b>	<b>Volúmenes (en <math>\mu\text{l}</math>), para un volumen final de 20 <math>\mu\text{l}</math></b>				
BSA (1mg/ml)	0	5	10	15	20
NaOH 0,1 N	20	15	10	5	0

Para medir la proteína de nuestra suspensión celular, se extraen 20  $\mu\text{l}$  de cada pocillo (correctamente homogeneizada con micropipeta). Se adiciona 1 ml del reactivo de Bradford (BioRad) y se mezcla inmediatamente las soluciones con un agitador de tubos. Se dejan reaccionar 5 minutos a temperatura ambiente, y se realiza la lectura en un espectrofotómetro a 595 nm. Mediante la aplicación de la ecuación de la recta, obtenida a partir de nuestra recta patrón, y sobre las absorbancias de las muestras se obtiene la cantidad de proteína presente en el homogenado celular.

### III.4. PREPARACIÓN DE VESÍCULAS DEL BORDE EN CEPILLO DE LAS CÉLULAS CACO-2

#### 4.1. Soluciones necesarias

SOLUCIONES	CONCENTRACIONES FINALES
Tampón Tris/Manitol: pH 7,1	Tris 2 mM Manitol 50 mM
Tampón de fosfato potásico pH 6,8 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> y K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM
Cl <sub>2</sub> Ca	20 mM
Azida de Sodio	0,02 %
PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonil)	100 μM
Benzamidina	25 μg/ml

#### 4.2. Técnica para preparar vesículas de borde en cepillo de células Caco-2

Todas las manipulaciones se efectuaron a 4°C, trabajando sobre hielo, para evitar la degradación proteica.

Partimos de cultivos celulares realizados en cajas de 25 o 75 cm<sup>2</sup>, que fueron congeladas y conservadas a -80° C. Las cajas son descongeladas lentamente sobre hielo, y posteriormente se procede según el siguiente protocolo:

- Se adicionan 2 ml de tampón Tris/Manitol con PMSF, benzamidina y un cóctel de inhibidores de proteasas (Roche) y azida de Na<sup>+</sup> sobre el tapiz celular. Con la ayuda de una micropipeta, o de una pipeta Pasteur, se resuspende el tapiz celular.
- La resuspensión celular se transfiere a un homogeneizador de vidrio cónico, previamente enfriado en hielo. La caja de plástico es lavada, de nuevo, con 1

ml de tampón Tris/Manitol (con inhibidores de proteasas), que luego también es transferido al homogeneizador.

- Con la ayuda de la varilla de vidrio se homogeniza la resuspensión celular con unos 15 movimientos de homogeneización.
- El homogenado obtenido se transfiere a un tubo de hemólisis para su posterior sonicación. Para recoger toda la mezcla del homogeneizador, se vuelve a adicionar 500  $\mu$ l de tampón Tris/Manitol con antiproteasas al homogeneizador, para posteriormente mezclarlo todo en el tubo de hemólisis. La sonicación se realiza mediante 15 pulsaciones de 1 segundo, al 30% de potencia.
- Del homogenado obtenido tras la sonicación, se separa un volumen de 250  $\mu$ l que es conservado a  $-80^{\circ}\text{C}$  como muestra de homogenado celular.
- Al resto del homogenado se le adiciona un volumen de  $\text{CaCl}_2$  200 mM, para obtener una concentración final de  $\text{CaCl}_2$  de 20 mM.
- Se deja el tubo en hielo durante 10 minutos agitando suavemente cada 2-4 minutos y se somete a una centrifugación a 950 g, a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos.
- El sobrenadante obtenido se vuelve a centrifugar a 33.500 g durante 30 minutos.
- Del resultado de esta última centrifugación eliminamos el sobrenadante y se recoge el precipitado. El precipitado obtenido, que corresponderá a la membrana apical, se resuspende cuidadosamente con la ayuda de una micropipeta con 100-300  $\mu$ l de tampón fosfato, dependiendo de la cantidad de cultivo celular de partida.
- Una vez finalizado todo el protocolo, se cuantifica la concentración proteica mediante el método de Bradford, tanto del primer homogenado celular obtenido tras la sonicación, como de la resuspensión del precipitado obtenido tras la segunda centrifugación, que corresponde a la membrana celular enriquecida de borde en cepillo.
- Tanto el homogenado celular como la membrana en borde en cepillo fueron almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis por western blot.

### III.5. BIOTINILACIÓN DE PROTEÍNAS DE SUPERFICIE CELULAR

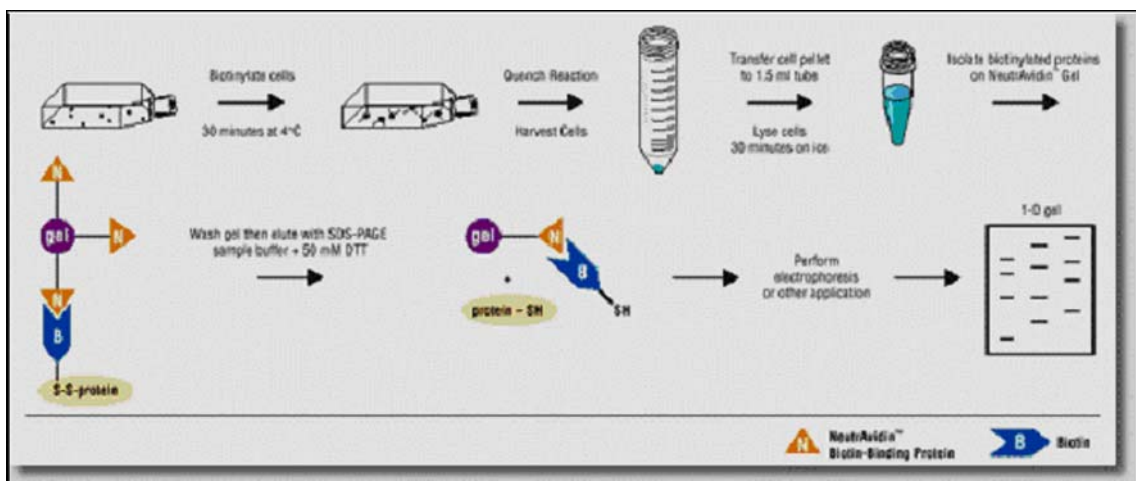
La biotinilación de proteínas se llevó a cabo mediante un kit de biotinilación y purificación de proteínas de superficie celular (Pierce) (Figura 9). En esta técnica, las proteínas de superficie celular son marcadas con biotina (EZ-Link-Sulfo-NHS-SS-Biotin), que reconoce los grupos amino de las proteínas. Las proteínas marcadas se aíslan mediante la neutravidina, que se une a la biotina.

Partimos de cultivos celulares en cajas de 25 cm<sup>2</sup> y se siguió el siguiente protocolo:

- Se lavan las células dos veces con PBS frío y se incuban con 7 ml de biotina (Sulfo-NHS-SS-Biotin) durante 90 minutos a 4°C.
- Se adiciona 300 µl de la solución “Quenching” y se deja incubar durante 20 minutos a 4°C.
- Se recogen las células en un tubo cónico y se centrifugan a 500 g durante 3 minutos.
- El precipitado obtenido se resuspende en 5 ml de TBS (tampón de lavado) y se vuelve a centrifugar a 4°C, a 500 g durante 3 minutos.
- Se descarta el sobrenadante y el precipitado se resuspende en 300 µl de tampón de lisis.
- Se sonica mediante 5 pulsaciones de 1 segundo. Del homogenado obtenido tras la sonicación, se separa un volumen de 20 µl que es conservado a -80°C como muestra de homogenado celular.
- El homogenado se centrifuga a 4°C a una velocidad de 15.000 g durante 10 minutos.
- El sobrenadante se lleva a una columna que contiene el gel de neutravidina inmobilizado, y se deja en incubación durante 1 hora.
- La mezcla se centrifuga a 1.000 g durante 1 minuto, y se descarta el eluyente.



- La columna se lava con 500 µl de TBS junto con los inhibidores de proteasas, y se centrifuga a 1.000 g durante 1 minuto. Este paso se repite tres veces consecutivas, eliminando el eluyente.
- Se adiciona el tampón SDS-PAGE, que contiene 50 mM de DTT, al gel que está en la columna y se incuba durante 1 hora.
- La columna se centrifuga a 1.000 g durante dos minutos y el eluyente obtenido corresponderá a las proteínas de superficie celular.
- Tanto el homogenado celular como las proteínas biotiniladas fueron almacenadas a -80°C hasta su posterior utilización para el análisis de proteínas mediante western blot.



**Figura 9.** Esquema de la técnica de biotinylación.

## III.6. ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN BLOT

El western blot es una técnica que se basa en la separación de las proteínas por su tamaño molecular, mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE), y su posterior transferencia a una membrana (PVDF), mediante la aplicación de una corriente eléctrica. Las proteínas transferidas son entonces fijadas en dicha membrana y se procede a la detección de la proteína de interés mediante el uso de un anticuerpo primario que específicamente la reconoce (inmunodetección).

Posteriormente, este primer anticuerpo es reconocido por un segundo anticuerpo que lleva acoplado un sistema para su detección, por ejemplo y en nuestro caso, la peroxidasa de rábano que es detectada mediante quimioluminiscencia. Finalmente, la señal producida es recogida mediante impresión en una película fotográfica sensible, que luego es revelada para su visualización.

Para nuestro estudio hemos utilizado el sistema de western blot en minigeles (BioRad), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las soluciones y sustancias específicas también fueron adquiridas a través de esta casa comercial.

### 6.1. Preparación de muestras

Las muestras que se han utilizado para esta determinación han sido homogenado celular, vesículas de membrana del borde en cepillo de las células Caco-2 y proteínas biotiniladas, obtenidas todas ellas tal como se ha explicado en el apartado anterior. La proteína de estas muestras fue previamente cuantificada para conocer su concentración proteica.

El sistema de minigeles utilizado permite en cada pocillo de migración un volumen máximo de carga de 20  $\mu\text{l}$  o 48  $\mu\text{l}$ , en función que el espesor del gel utilizado sea de 0,75 mm o 1,5 mm respectivamente. Se recomienda que la muestra contenga entre 60-100  $\mu\text{g}$  de proteína por lo que nuestras muestras deben tener una concentración aproximada de 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

Se calculan los  $\mu\text{g}$  de proteína que queremos cargar en cada pocillo del gel junto con el volumen de tampón de carga necesario, y se lleva a un volumen final no superior al de 20  $\mu\text{l}$  o 48  $\mu\text{l}$ . Deben mantenerse las muestras en hielo todo el tiempo para evitar la acción de las proteasas. Como controles positivos, se han utilizado homogenados de cerebro y de mucosa intestinal de rata.

La composición del tampón de carga es la siguiente:

<b>TAMPÓN DE CARGA (6X SDS SAMPLE BUFFER)</b>	
0,5 M Tris-Cl 4% SDS pH 6,8	7 ml
Glicerol	3 ml
SDS	1 g
Azul de bromofenol	1,20 mg

## 6.2. Preparación de geles

Se van a preparar dos tipos de geles: gel de separación (parte inferior) y gel concentrador (parte superior). El porcentaje de acrilamida fue del 8% en el caso de hSERT dado que presenta un tamaño aproximado entre 60-90 kDa. En la siguiente tabla se muestran los volúmenes y las disoluciones que hay que añadir, así como el orden de adición, para obtener los dos geles:

<b>COMPONENTES</b>	<b>GEL DE SEPARACIÓN (8%)</b>	<b>GEL CONCENTRADOR</b>
H <sub>2</sub> O mili Q	4,68 ml	4,24 ml
1,5 M Tris, pH= 8.8	2,50 ml	--
0,5 M Tris, pH= 6.8	--	1,90 ml
Acrilamida/Bis Stock (30%)	2,67 ml	1,25 ml
SDS 20%	0,05 ml	0,04 ml
Amonio persulfato APS 10%	0,10 ml	0,07 ml
TEMED	6 $\mu\text{l}$	8 $\mu\text{l}$

En primer lugar se prepara en un vaso el gel de separación, añadiendo los volúmenes en el orden indicado anteriormente y se introduce, con la ayuda de una pipeta Pasteur, entre los dos cristales que tenemos encajados en un soporte de geles. Una vez alcanzada la altura deseada, se añade un pequeño volumen de SDS 0,1% y se espera a que polimerice el gel. Cuando el gel ha polimerizado, se extrae el SDS. Se prepara entonces el gel concentrador, se adiciona sobre el primer gel y se colocan los peines en la parte superior del gel, dejando polimerizar a temperatura ambiente.

Una vez polimerizado todo el gel se retira el peine con cuidado, quedando visibles los diferentes pocillos de carga. Luego, se introducen en la cubeta de electroforesis y se añade el tampón de electroforesis, que es preparado cada día y cuya composición se muestra a continuación:

<b>TAMPÓN DE ELECTROFORESIS</b>	<b>COMPONENTES</b>	<b>CANTIDAD</b>
	Tris base (0,125 M final)	1,05 g
	Glicina (0,96 M final)	4,97 g
	SDS 20% (0,5 % final)	1,75 ml
	<i>Agua destilada, csp</i>	<i>350 ml</i>

Una vez preparado todo el sistema, con la ayuda de una micropipeta se cargan las muestras motivo de estudio en su pocillo correspondiente, así como el marcador de tamaños moleculares de proteínas (BioRad).

Se conecta la cubeta a una fuente eléctrica a un amperaje constante de 20 mA (10 mA/gel). Una vez que las muestras han pasado el gel concentrador, y en consecuencia estén compactadas y penetrando en el gel de separación, se aumenta el amperaje a 30 mA. Las muestras en el gel se dejan migrar en estas condiciones hasta alcanzar la parte inferior del gel de separación.

Transcurrido el tiempo suficiente para la separación de proteínas, se detiene la electroforesis. A continuación y de forma inmediata, los minigeles son dispuestos en el sistema de electrotransferencia en contacto con la membrana PVDF a la cual van a ser transferidas las muestras proteicas del gel, adicionando a continuación el tampón de electrotransferencia a las cubetas, cuya composición se detalla a continuación:

<b>TAMPÓN DE ELECTROTRANSFERENCIA</b>	<b>COMPONENTES</b>	<b>CANTIDAD</b>
	Glicina	14,4 g
	Tris base	3 g
	Metanol	200 ml
	<i>Agua destilada, csp</i>	<i>1000 ml</i>

Para iniciar la transferencia el sistema se conecta a una fuente eléctrica con un amperaje constante de 200 mA (100 mA/gel) durante 2 horas. Las proteínas migran desde el polo negativo hacia el polo positivo, de manera que el gel y la membrana de PVDF deben estar en paralelo y colocadas adecuadamente.

Transferidas las proteínas, se desmonta el sistema para recoger las membranas, que se lavan durante 5 minutos en PBS-T (PBS + 0,1% Tween 20).

Si se desea visualizar las proteínas transferidas en la membrana, ésta puede ser teñida con una disolución de rojo Ponceau, realizando posteriormente 2 lavados con PBS-T (15 ml/membrana) de 5 minutos.

<b>SOLUCIÓN COLORANTE ROJO PONCEAU</b>	
Ponceau S	0,5 g
Ácido acético glacial	1 ml
<i>Agua miliQ, hasta</i>	<i>100 ml</i>

El siguiente paso es el bloqueo de las membranas con una solución PBS-T + 4% leche en polvo descremada y 1% de albúmina sérica bovina (BSA) durante dos horas a temperatura ambiente en agitación, o bien durante toda la noche a 4°C. Las proteínas de la leche y de la BSA ocupan los espacios vacíos de la membrana, evitando así la unión no específica del anticuerpo primario en ella.

Una vez bloqueadas las membranas, se lavan dos veces durante 5 minutos con PBS-T y se ponen en contacto con el anticuerpo primario diluido en PBS-T + 1% leche

en polvo desnatada durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación. En nuestro caso se utilizaron dos anticuerpos primarios: un anticuerpo monoclonal anti-SERT humano de ratón (MAb Technologies, Inc) a una concentración de 1:500 y otro anticuerpo policlonal anti-SERT de conejo (AB1594, Chemicon, Temecula, CA, USA) a la concentración de 1:5.000. Ambos anticuerpos reconocen la proteína SERT humana.

Tras la incubación con el anticuerpo primario, las membranas son lavadas dos veces con PBS-T de forma rápida, y después se realizan dos lavados de 15 minutos con PBS-T a temperatura ambiente en agitación. Finalmente, las membranas se vuelven a lavar 3 veces, durante 5 minutos con el tampón de lavado PBS-T.

A continuación, se añade el anticuerpo secundario, diluido también en PBS-T + 1% de leche en polvo desnatada, y se incuba durante 1 hora y media a temperatura ambiente. En nuestro caso fue un anticuerpo secundario anti-ratón ligado a la HRP (peroxidasa de rábano) o anti-conejo ligado también a la HRP, según el anticuerpo primario utilizado. Finalizada la incubación, se realizan 2 lavados de 15 minutos, seguidos de otros tres lavados de 5 minutos cada uno con PBS-T

Finalmente, se prepara la solución de detección de quimioluminiscencia (ECL Plus, GE Healthcare), en la que las membranas se incuban durante 5 minutos, según el protocolo de la casa comercial. Se sacan las membranas y una vez escurridas, se envuelven en plástico transparente para posteriormente realizar la detección mediante impresión sobre una película fotosensible, que es revelada de forma clásica para su estudio y análisis.

### **6.3. Detección de la $\beta$ -actina mediante western blot**

Para analizar y cuantificar los posibles cambios observados en la expresión de nuestra proteína y verificar si eran debidos a los tratamientos a los que son sometidas las células o por el contrario se debían a variaciones en la concentración total de proteínas o a fallos de pipeteo en la carga del gel, se determinó en las mismas membranas la expresión de  $\beta$ -actina (46 kDa) mediante la técnica de western blot.

Tras la determinación de nuestra proteína hSERT, las membranas se sometían a un decapado con una solución que eliminaba de éstas el bloqueo de las membranas, el anticuerpo primario y el anticuerpo secundario, y poder así volverlas a incubar con un

anticuerpo anti- $\beta$ -actina. Para ello se mantenían durante 30 minutos en una solución 200 mM de glicina con 0,4% de SDS, a pH 2,5, y finalmente se lavaban 2 veces durante 15 minutos con PBS-T. A partir de este momento, las membranas son manipuladas para la detección de la actina, y para ello se incubaban con la solución PBS-T + 4% leche en polvo descremada y 1% BSA durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras un lavado de 10 minutos con PBS-T las membranas eran incubadas toda la noche a 4°C o bien 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo primario policlonal anti- $\beta$ -actina humana generado en cabra (Santa Cruz), diluido 1:10.000 en PBST + 1% de leche desnatada en polvo. Pasado este tiempo, se lavaban con PBS-T, 2 veces durante 15 minutos y 3 veces durante 5 minutos y a continuación se incubaban con un anticuerpo secundario anti-IgGs de cabra ligado a la HRP (Santa Cruz) diluido 1:5.000 en el mismo buffer que el anticuerpo primario, durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras dos lavados de 15 minutos con PBS-T, las membranas se incubaban con el reactivo de quimioluminiscencia y se revelan tal y como se ha indicado anteriormente.

### III.7. EXTRACCIÓN DEL ARN TOTAL

Para la extracción del ARN de las células Caco-2 se emplearon dos métodos. El primero se realizó por medio del método de la extracción fenólica con Trizol (Reagent Invitrogen™ Life Technologies) que se basa en separar las moléculas de ARN en un sistema de fenol y precipitación con alcohol. El segundo método fue mediante el kit comercial RNeasy Mini Kit (Qiagen). En ambos métodos el material y las disoluciones estaban libres de RNasas.

El método de Trizol se basa en el uso de una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina para la lisis de las células y la separación de la muestra en dos fases (acuosa y orgánica), seguida de la extracción y precipitación del ARN total con cloroformo e isopropanol respectivamente a partir de la fase acuosa.

Para dicha extracción, se utilizaron cajas de 25 cm<sup>2</sup> donde se adicionó 2,5 ml de Trizol por caja. Las células se homogeneizaron manualmente mediante una ligera agitación. El homogenado se distribuye en distintos tubos eppendorf y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se adicionaron 0,5 ml de cloroformo frío y se agitaron vigorosamente los distintos tubos durante 15 segundos. Al cabo de este tiempo, se incubaron durante 3 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente, las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a una velocidad de 12.000 g a 4°C. En este paso se forman dos fases (separadas por un interfase) por diferencia de densidad: la fase inferior orgánica, que contiene ADN y restos de proteínas desnaturalizadas, y la fase superior acuosa, que contiene ARN en cloroformo. Esta fase se transfirió a otro tubo eppendorf y se adicionó 1,25 ml de alcohol isopropílico en el que precipitará el ARN. Seguidamente, se realizó una incubación a 15-30°C durante 10 minutos y se centrifugó a 4°C durante 10 minutos a una velocidad de 12.000 g. El ARN precipitado se lavó con 2,5 ml de etanol al 75%, se agitó en un vortex y a continuación se centrifugó a 4°C durante 5 minutos a una velocidad de 7.500 g. Cuidadosamente, se eliminó el sobrenadante y el ARN se resuspendió en 25 µl agua libre de RNasas (tratada con DEPC). Se tomó una alícuota para cuantificar y determinar la integridad de ARN total y el resto se almacenó a -80°C para los futuros análisis.



Para la extracción del ARN mediante el RNeasy Mini Kit de Qiagen, se siguió el protocolo establecido por la casa comercial. Así, inicialmente las células fueron lisadas bajo condiciones desnaturalizantes. Posteriormente, la muestra se colocó en una columna de afinidad a la cual se va a unir el ARN, mientras que los contaminantes son eliminados mediante lavados. El ARN puro es liberado de la columna con la adición de agua. Todos los pasos a seguir de este protocolo, se hicieron a temperatura ambiente. Para llevar a cabo esta técnica, se utilizaron cajas de 25 cm<sup>2</sup> donde primeramente se adicionó al tapiz celular 1 ml del tampón RNeasy Lysis RTL. Manualmente se hacen pequeños giros y cuidadosamente se homogeneizó la suspensión con una micropipeta hasta la pérdida de su viscosidad. El homogenado inicial se depositó en distintas columnas de QUIAshredder que tienen aplicado un tubo colector de 2 ml de capacidad y se centrifugó durante 2 minutos a 13.000 rpm para conseguir una perfecta homogenización celular. Se comprobó que todo el lisado homogenizado permanece en el tubo colector y se adicionaron 600 µl de etanol al 70% (por cada 600 µl de homogenado) para que precipiten los ácidos nucleicos. El precipitado se resuspendió utilizando una micropipeta y la suspensión se transfirió a las columnas RNeasy, que fueron centrifugadas a 10.000 rpm durante 15 segundos. Se desechó el eluyente de la parte inferior y se lavó la columna con 700 µl del tampón RW1 por centrifugación a 10.000 rpm durante 15 segundos. Se volvió a descartar el líquido eluido del tubo colector y se aplicó un tubo colector nuevo a la columna RNeasy. Se adicionaron 500 µl de tampón RPE y se volvió a centrifugar a 10.000 rpm durante 15 segundos. Se desechó el sobrenadante y se adicionaron otros 500 µl de buffer RPE a la columna RNeasy y se volvió a centrifugar a 10.000 rpm durante 2 minutos. Se descartó el eluyente y nuevamente se centrifugó durante 1 minuto a 10.000 rpm. Por último, se transfirió la columna RNeasy a un tubo eppendorf y se adicionaron 30 µl de H<sub>2</sub>O libre de RNasas (DEPC) y se centrifugó a 10.000 rpm durante 1 minuto. Se añadieron de nuevo otros 30 µl de H<sub>2</sub>O libre de RNasas para centrifugar durante 1 minuto a la misma velocidad. De esta manera, se obtuvo el ARN diluido en un volumen final de 60 µl de agua.

## 7.1. Determinación de la concentración, pureza e integridad del ARN total

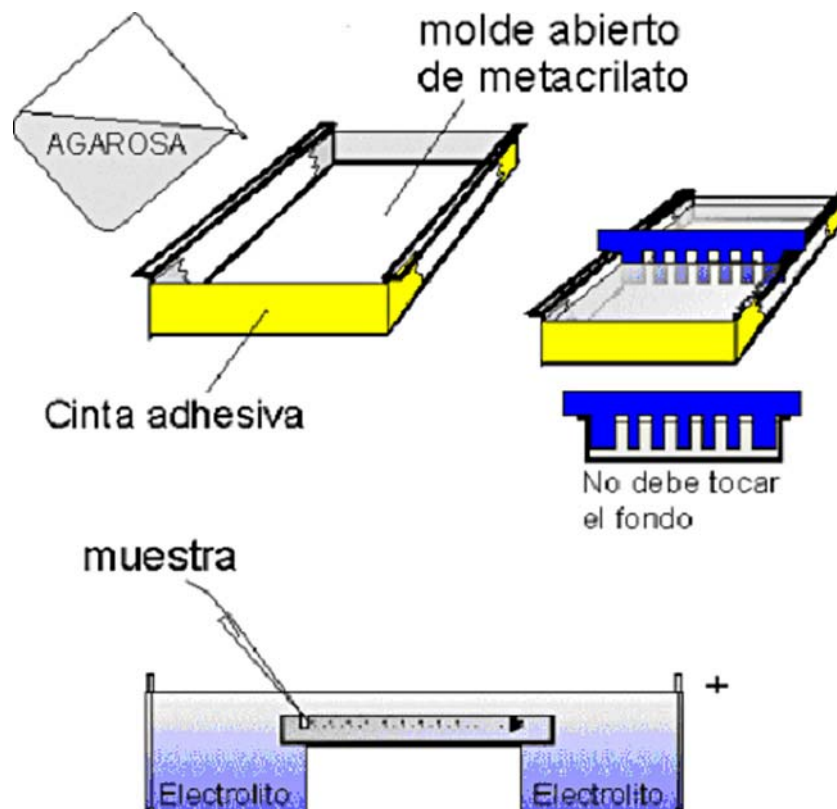
Para determinar la concentración del ARN total, 2  $\mu\text{l}$  de ARN fueron diluidos hasta un volumen final de 70  $\mu\text{l}$  con agua miliQ autoclavada. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Uvikon Spectrophotometer) mediante cubetas de cuarzo a 260 nm y 280 nm. Una vez que se han obtenido los valores de absorbancia y teniendo en cuenta que  $1 \text{ DO}_{260} = 40 \mu\text{g/ml}$  de ARN, se determinó su concentración a partir de la siguiente ecuación.

$$\mu\text{g}/\mu\text{l ARN} = \text{DO}_{260} \times 40 \times \text{FD}/1000 \quad \text{FD: factor de dilución}$$

Como criterio de calidad se usó la relación de absorbancias ( $A_{260}/A_{280}$ ), que para una preparación de alta calidad se encuentra entre 1,8 y 1,9.

Para determinar la integridad del ARN total extraído, se somete una muestra del mismo a electroforesis en gel de agarosa al 1%, conteniendo bromuro de etidio para poder visualizar los ácidos nucleicos migrados. El bromuro de etidio se comporta como un agente intercalante y, además de disminuir la densidad de la molécula, tiene la capacidad de emitir luz cuando se le excita con luz ultravioleta.

La técnica de electroforesis se basa en el desplazamiento, en este caso del ARN, a través de una matriz porosa formada por la agarosa polimerizada (Figura 10). Al aplicarle una corriente eléctrica a través del gel, los ácidos nucleicos que poseen una carga negativa conferida por los grupos fosfatos, migraran hacia el polo positivo. Dado que la fuerza impulsora es proporcional a la carga eléctrica, el parámetro que rige el avance es realmente la relación carga/masa. Como resultado neto, la electroforesis separa los fragmentos de ácido nucleico según su tamaño o longitud, expresado en nucleótidos.



**Figura 10.** Esquema de la realización del gel de agarosa.

En nuestro caso se mezclaron 1  $\mu\text{l}$  de la muestra de ARN con 8  $\mu\text{l}$  de agua mili Q y 1  $\mu\text{l}$  de tampón de carga 10X (0,4% Azul Bromofenol, 50% glicerol). La electroforesis se llevó a cabo a 50 V. Posteriormente, el ARN se observó en un transiluminador con luz UV. La radiación es absorbida por el ARN y emitida por el bromuro de etidio que a su vez reemite la radiación a 590 nm en la región rojo-naranja del espectro visible. Se tomó una fotografía de las muestras del ARN, en la que se visualizaban las dos bandas de ARN ribosómico (28S y 18S) con nitidez y sin estelas detectables, lo cual era indicación de la integridad del ARN.

## III.8. DETECCIÓN Y DETERMINACIÓN MEDIANTE RT-PCR DE LA SECUENCIA CODIFICANTE

La RT-PCR (Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction) permite la amplificación de una cantidad pequeña de moléculas diana de ARNm con gran especificidad, mediante la transcripción reversa de ARNm a ADNc (ADN complementario), que posteriormente es amplificado mediante una reacción en cadena de la polimerasa.

### 8.1. Síntesis de la primera cadena de ADNc: transcripción reversa (RT)

Para la realización de esta técnica, se utilizó el kit comercial Superscript II (Invitrogen, USA) y se siguió el protocolo marcado por la casa comercial.

Así, a partir del ARN total obtenido se sintetizó la primera cadena de ADNc, donde las moléculas de ARNm funcionan como molde y los oligo(dT) actúan como cebadores. Se requiere la presencia de dNTP's que funcionan como sustrato para la transcriptasa reversa, de lo que resultan cadenas de ADN complementario. La síntesis de la primera cadena de ADNc se realiza en dos pasos:

Paso 1: Desnaturalización.

10 mM dNTP mix	1 $\mu$ l
Oligo dT	1 $\mu$ l
RNA	2 $\mu$ g (en $\mu$ l)
Agua DEPC, hasta	10 $\mu$ l

En el primer paso, el ARN junto con los cebadores, se someten a un ciclo de desnaturalización a 65°C durante cinco minutos en un termociclador (PTC-100<sup>m</sup> Programmable Thermal Controller. Peltier-Effect Cycling, MJ Research, Inc). Transcurrido el tiempo, el tubo que contiene la reacción se pone en hielo durante un minuto para evitar su renaturalización y se agrega la mezcla de reacción, para la transcripción reversa.

**Paso 2:** Realización de la mezcla de reacción.

10X RT buffer	2 $\mu$ l
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4 $\mu$ l
0,1 M DTT	2 $\mu$ l
RNase OUT	1 $\mu$ l

Se adicionan 9  $\mu$ l de la mezcla de reacción y se incuba a 42°C durante dos minutos. Pasado este tiempo, se adiciona 1  $\mu$ l de SuperScript II (transcriptasa reversa, Invitrogen) y se incuba la mezcla a 42°C, durante 50 minutos. A continuación, se somete un ciclo a 70°C durante 15 minutos y después se mantiene en hielo. La mezcla se centrifuga suavemente y se le adiciona 1  $\mu$ l de RNase H (con el fin de degradar el ARN restante), y posteriormente se incuba a 37°C durante 20 minutos. Una vez que termina todo el proceso, el ADNc se almacena a -20°C o se utiliza para llevar a cabo la reacción de PCR.

**8.2. Amplificación del ADNc: PCR**

La técnica PCR consiste en la amplificación exponencial de un segmento definido de ADN mediante cebadores exclusivamente diseñados con este fin. Para amplificar las regiones transcritas, los ensayos de PCR fueron realizados con los siguientes reactivos:

Agua DEPC	17,9 $\mu$ l
10X High Fidelity PCR buffer	2,5 $\mu$ l
50 mM MgCl <sub>2</sub>	1,0 $\mu$ l
10 mM dNTP mix	0,5 $\mu$ l
10 $\mu$ M cebador sentido	0,5 $\mu$ l
10 $\mu$ M cebador antisentido	0,5 $\mu$ l
ADNc (10% de la reacción con RT)	2 $\mu$ l
ADN polimerasa (Eco- Taq)	0,1 $\mu$ l

Los cebadores específicos para el SERT humano (Genbank **NM 001045**) fueron diseñados para la amplificación de la secuencia codificante completa:

Cebador sentido (5'-3') AAATCCAAGCACCCAGAGAT

Cebador anti-sentido (5'-3') AGACTGTGTCCCTGTGGAGA

El tamaño del producto obtenido tras la amplificación por PCR es de 2105 bp.

La amplificación de SERT se realizó bajo las siguientes condiciones:

- i.** 94°C, 2 minutos
- i.i.** 30 ciclos de:
  - 94°C, 30 segundos (desnaturalización)
  - 56°C, 30 segundos (unión del cebador)
  - 68°C, 2 minutos y 30 segundos (extensión)
- i.i.i.** 68°C, 10 minutos (extensión final)

La reacción en cadena de la polimerasa consta de un primer paso de calentamiento hasta 94-95°C durante 2-10 minutos, en el cuál se activa la ADN polimerasa. Posteriormente tiene tres pasos que se repiten entre 20 y 40 veces.

En primer lugar, se desnaturaliza el ADNc (se separan las dos hebras de las cuales está constituido). Este paso puede realizarse de diferentes modos, siendo el calentamiento (94-95°C) de la muestra la forma más habitual. A continuación se producirá la hibridación del cebador, es decir, el cebador se unirá a su secuencia complementaria en el ADN molde. Para esto es necesario que la temperatura descienda (generalmente, a 55°C, aunque se puede variar según sea la composición de nucleótidos de los cebadores entre 45°C y 65°C). Estos cebadores actuarán como límites de la región de la molécula que va a ser amplificada. Por último actúa la ADN polimerasa, tomando el ADNc molde para sintetizar la cadena complementaria y partiendo del cebador como soporte inicial necesario para la síntesis del nuevo ADN. Se aumenta la temperatura hasta 68°C, temperatura a la cual la ADN polimerasa presenta su máximo de actividad, produciéndose una copia del fragmento que se desea amplificar.

Una vez completados todos los ciclos, se finaliza con dos pasos, uno de extensión de la cadena a la temperatura óptima de la ADN polimerasa, y un último donde se enfría la muestra a 4°C para su conservación.

Los productos de amplificación de la PCR obtenidos se someten a electroforesis en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio a 50V. De los 25  $\mu$ l del volumen total de la reacción de la PCR se tomaron 22,5  $\mu$ l y se mezclaron con 2,5  $\mu$ l de tampón de carga 10X (0,4% Azul Bromofenol, 50% glicerol). Asimismo, se depositó una muestra de indicador de tamaño de DNA (DNA Ladder 1 Kb) para poder determinar el tamaño de la muestra amplificada por PCR. El producto amplificado se observó en un transiluminador con luz UV (Vilber Lourmat, Francia).

### **8.3. PCR semi-cuantitativa**

En aquellos experimentos en los que era necesario estudiar efectos sobre el nivel de expresión del ARNm mediante la comparación entre las bandas amplificadas tras la RT-PCR, se realizó una determinación RT-PCR semi-cuantitativa.

Para ello tras la RT, se realizaron una serie de amplificaciones por PCR sometiendo a las muestras a un número variable de ciclos, entre 20 y 30 ciclos, con el fin de elegir las condiciones de amplificación a las cuales el ARNm (ADNc) analizado no ha alcanzado la meseta máxima de amplificación, ya que en estas condiciones de máxima amplificación no es posible discernir variaciones en el nivel de ARNm entre las distintas condiciones a las que son sometidas las células.

Las condiciones óptimas de amplificación seleccionadas fueron de 27 ciclos para hSERT y de 25 ciclos para la  $\beta$ -actina, que fue utilizada como control.

### III.9. DETERMINACIÓN DE LA AMINOPEPTIDASA N (L-ALANINA) POR COLORIMETRÍA

Esta técnica determina la actividad de la aminopeptidasa N mediante la formación de p-Nitroanilina (PNA) a partir del sustrato L-alanina-p-nitroanilina (Figura 11). En nuestro caso se ha realizado esta determinación con el fin de controlar que las células no sufren alteraciones funcionales tras ser sometidas a los tratamientos experimentales.

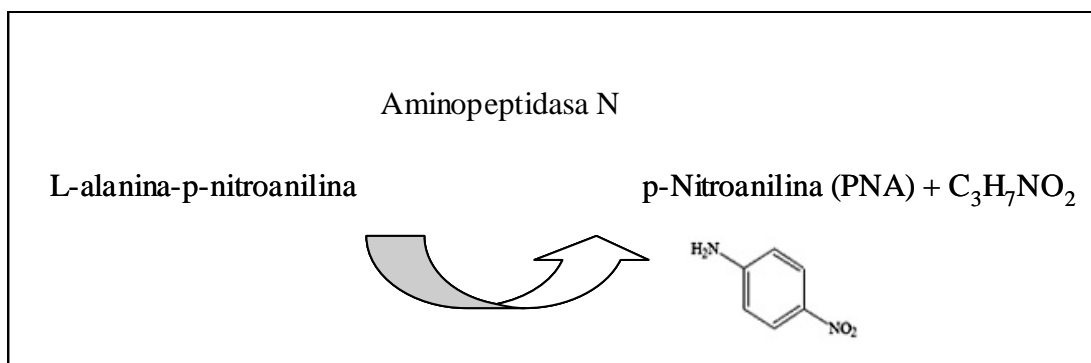


Figura 11. Reacción catalizada por la enzima aminopeptidasa N.

#### 9.1. Reactivos necesarios

- Tampón fosfato de Na 0,05 M, pH = 7,30
- Sustrato: L-alanina-p-nitroanilina 3 mM (Sigma A 9325)
- Producto para la recta patrón: 13,8 mg de p-Nitroanilina (PNA) en 100 ml de tampón (1mM).

En primer lugar, se prepararon 8 tubos (por duplicado) para realizar una recta patrón con cantidades de PNA conocidas, con los siguientes volúmenes:



<b>PNA (1 mM) (μl)</b>	0	10	20	25	50	75	100	200
<b>Tampón fosfato de Na (μl)</b>	1100	1090	1080	1075	1050	1025	1000	900
<b>CH<sub>3</sub>COOH (μl)</b>	100	100	100	100	100	100	100	100

Para medir la actividad de la aminopeptidasa, se prepararon en distintos tubos 1 ml de sustrato L-alanina-p-nitroanilina y se adicionó a distintos tiempos (30, 60 y 90 minutos) la muestra proteica obtenida mediante la técnica descrita en apartados anteriores. La reacción se detuvo mediante la adición de ácido acético y se procedió a la lectura en un espectrofotómetro a 410 nm.

A continuación, se calculó la actividad de la aminopeptidasa, mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad específica (mU/ml muestra)} = \text{DO muestra/tiempo(min.)} \times V_m \times \text{estándar}$$

donde,

- $V_m$  = volumen de la muestra.
- Estándar = factor de concentración que relaciona la DO/nanomolar p-nitroanilina.

### **III.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS**

Todos resultados de medida de transporte han sido procesados según las ecuaciones descritas en el apartado III.2. El análisis estadístico de los resultados obtenidos se ha realizado aplicando la t de Student para valores pareados y comparando las diferentes condiciones, considerando un 95% de grado de significación, es decir  $p < 0,05$ .

Los resultados, salvo indicación concreta, han sido expresados como la media  $\pm$  el error estándar.

Todos los análisis, tanto los estadísticos como cinéticos se realizaron mediante el programa GraphPad Prism versión 4 (San Diego, USA).

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



Para la exposición de los resultados del presente trabajo de investigación, éstos han sido agrupados en tres grandes apartados en función de los objetivos planteados y de las conclusiones a que conducen los resultados obtenidos relativos a los mismos. Con todo ello se pretende facilitar la comprensión del desarrollo experimental del presente trabajo de investigación.

Estos tres apartados son:

- 1.** Caracterización molecular y funcional del transportador de serotonina humano (hSERT) en las células Caco-2 (Objetivos 1, 2 y 3).
- 2.** Estudio de la regulación fisiológica de hSERT en las células Caco-2 (Objetivo 4).
- 3.** Estudio de la regulación farmacológica de hSERT mediada por el tratamiento a largo plazo de las células Caco-2 con fluoxetina (Objetivo 5).

## **IV.1. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FUNCIONAL DEL TRANSPORTADOR DE SEROTONINA HUMANO (hSERT) EN LAS CÉLULAS CACO-2**

Tal como se ha indicado anteriormente, el origen de este apartado surgió de la conveniencia y necesidad de establecer nuevos modelos celulares para el estudio de hSERT que expresen endógenamente esta proteína. Resultados previos de otros autores que demostraban la expresión de SERT en la mucosa intestinal de animal de experimentación (Chen y cols. 1998) nos indujeron a explorar en líneas celulares epiteliales enterocitarias.

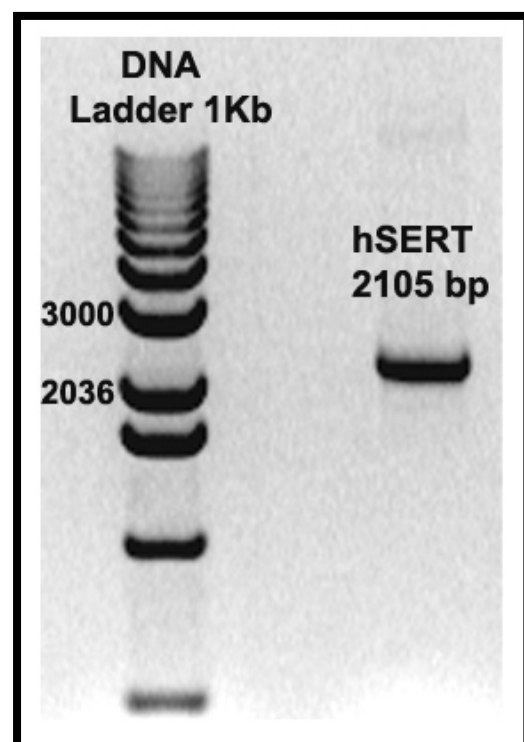
Por ello, y con el fin de aproximar los estudios a la situación experimental serotoninérgica humana, se inició el presente estudio partiendo de la hipótesis de que los enterocitos humanos pueden constituir el sistema “OFF” de aclaramiento o extracción de 5-HT del medio intersticial, tras la liberación de 5-HT desde las células enterocromafines intestinales (sistema “ON”). La comprobación de esta hipótesis se realizó utilizando la línea celular Caco-2, que corresponde a células humanas de tipo enterocitario.

### 1.1. Determinación de la expresión del ARNm de hSERT: Amplificación por RT-PCR y secuenciación

El presente trabajo se inició con la determinación de la existencia del ARNm de hSERT en Caco-2. Este paso era fundamental para poder continuar con el estudio, y validar la línea celular como modelo de expresión de hSERT.

El ARN total fue obtenido y purificado a partir del cultivo celular Caco-2 con un grado de diferenciación correspondiente al día 9 post-confluencia (14 días desde la siembra) mediante un kit de extracción de ARN total y mediante la técnica de RT-PCR se amplificó la secuencia codificante de hSERT. Para ello, se diseñaron los cebadores específicos a partir de la secuencia conocida del transportador de serotonina aislada a partir de cerebro humano (Genbank **NM\_001045**). Los detalles de esta técnica han sido descritos en el apartado de Materiales y Métodos.

Tal y como se muestra en la Figura 12, el resultado muestra la amplificación de una banda de 2105 bp, que corresponde al tamaño esperado del producto de amplificación para hSERT en función de los cebadores utilizados. Este producto de PCR, fue secuenciado y, tras la búsqueda en la base de datos BLAST, la secuencia de nucleótidos resultó ser idéntica al SERT de cerebro humano. Esa secuencia, se encuentra depositada en GeneBank con el número de acceso: **AY902473**.



**Figura 12.** Expresión del ARNm de hSERT de las células Caco-2. El análisis de RT-PCR fue realizado a partir del ARN total de células Caco-2 mediante el uso de cebadores específicos de SERT humano, tal y como se describe en el apartado de Material y Métodos. El producto de PCR (2105 bp) fue sometido a electroforesis en un gel de agarosa, y visualizado con la adición de bromuro de etidio al gel y utilizando un transiluminador UV.

## 1.2. Detección mediante western blot de la expresión proteica del transportador hSERT en células Caco-2

El resultado anteriormente expuesto sugiere la posible expresión en las células Caco-2 de la proteína transportadora hSERT. Sin embargo, resultaba necesario confirmar este dato mediante la identificación de la proteína transportadora en las células Caco-2. Para ello se utilizó la técnica de SDS-PAGE, electrotransferencia e inmunodetección (western blot).

La obtención de un resultado a este respecto nos permitirá en primer lugar, como acabamos de mencionar, corroborar la existencia de la proteína hSERT en las células Caco-2, y en segundo lugar, disponer de una herramienta adicional para el estudio experimental de este transportador.

Para la realización de estos experimentos, primeramente hubo que preparar las muestras de material celular. Para ello las células Caco-2, en estadio de diferenciación correspondiente al día 9 post-confluencia (14 días tras la siembra), fueron sometidas a homogeneización, sonicación y centrifugación diferencial con el fin de purificar el material membranoso celular. Esta técnica, así como los tampones utilizados, se encuentran descritos en el apartado correspondiente de Material y Métodos.

Una vez cuantificada la concentración proteica de las muestras, éstas fueron preparadas para ser sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS con el fin de obtener su separación según el peso molecular, y posteriormente fueron electrotransferidas a una membrana de PVDF mediante electroforesis húmeda. La membrana con las proteínas fue sometida a la acción de un anticuerpo primario anti-SERT de rata que reacciona específicamente también con hSERT y un anticuerpo secundario ligado a un sistema que permitiera la detección por quimioluminiscencia (HRP) (ver apartado de Material y Métodos). Como control positivo de expresión de proteína hSERT, se utilizaron homogenados de intestino delgado y sinaptosomas de cerebro, ambos obtenidos de rata.

El sistema de detección permitió impresionar una película sensible, cuya imagen aparece reflejada en la Figura 13. En ella se observa que tanto en el homogenado de células Caco-2 como en las vesículas membranosas obtenidas de Caco-2 aparece una banda específica correspondiente al tamaño de la banda detectada en cerebro de rata e intestino delgado de rata. Esta banda aparece en torno al valor de 70-80 kDa.

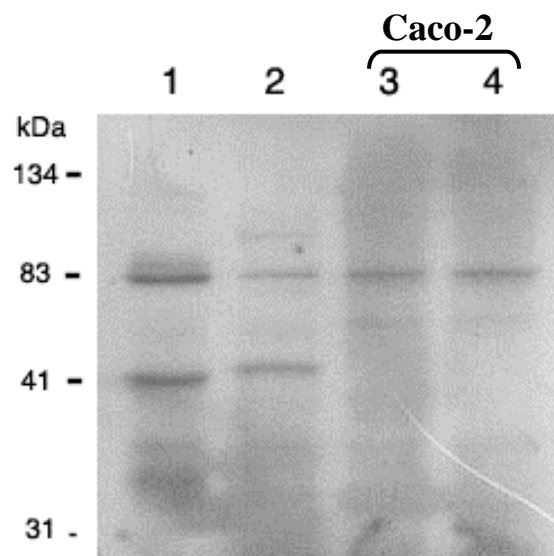


Estudios previos han descrito el tamaño molecular de la proteína transportadora SERT en distintos órganos y especies animales mediante técnicas de inmunodetección. Así, en cerebro de rata se ha detectado un tamaño de 76 kDa (Quian y cols. 1995), 94 kDa en plaquetas de rata y 80 kDa en tejido pulmonar. En cerebro humano la proteína SERT es inmunodetectada en una banda correspondiente al tamaño de 76 kDa (Ramamoorthy y cols. 1998). Los diferentes tamaños descritos de esta proteína en los distintos órganos podrían ser debidos a posibles modificaciones post-traduccionales, como la glicosilación.

Como se puede observar en la Figura 13, en cerebro e intestino de rata también aparece otra banda con un valor de tamaño molecular de alrededor de 40 kDa. Desconocemos el significado de dicha banda, ya que el tamaño de 80 kDa del transportador SERT corresponde a un monómero y no a un dímero de 40 kDa. No obstante, dicha banda no aparece en la carga proteica correspondiente a las células Caco-2.

Estos resultados parecen confirmar el hecho de que las células Caco-2 expresan el transportador hSERT, y que este transportador presenta un tamaño molecular coincidente con el ya descrito en otros tejidos como intestino o cerebro de rata. Además hay que tener en cuenta que, la proteína parece expresarse no sólo en el homogenado celular, sino también en la membrana de las células. Por tratarse de un transportador de membrana, este dato apunta que hSERT en Caco-2 puede ser una proteína funcional, lo cual permitió seguir profundizando en el estudio de la misma.

**Figura 13.** Expresión del transportador hSERT detectado por SDS-PAGE, electrotransferencia e inmunodetección (western blot). A la izquierda se indican los tamaños de masa molecular obtenidos por la migración en paralelo de un marcador de pesos moleculares. Línea 1: sinaptosomas de cerebro de rata (40 µg); Línea 2: homogenado de intestino delgado de rata (40 µg); Línea 3: homogenado de células Caco-2 (70 µg); Línea 4: vesículas membranosas de Caco-2 (60 µg). Las células Caco-2 utilizadas se encontraban en estadio de diferenciación correspondiente al día 9 post-confluencia (14 días tras la siembra).



### **1.3. Estudio del transporte de 5-HT en células Caco-2 en función del estadio de diferenciación**

Los resultados de los apartados anteriores muestran que las células Caco-2 expresan tanto el ARNm como la proteína correspondiente a hSERT. Sin embargo, nos faltaba por demostrar que además dicha proteína es funcional, para lo cual nos planteamos la medida del transporte de 5-HT en estas células.

Resultados obtenidos por Chantret y cols. (1988) han demostrado que las células Caco-2 desarrollan una diferenciación morfológica y funcional a lo largo del cultivo. Los resultados de estos autores muestran que en estadio preconfluyente (3<sup>er</sup> día de siembra) las células se agrupan en islotes celulares en los que las células presentan polarización, pero el borde en cepillo está poco desarrollado. Sin embargo, las células Caco-2 post-confluentes forman una monocapa celular con una diferenciación enterocitaria típica: son células polarizadas con el núcleo situado en la base de la célula; presentan uniones estrechas intercelulares en la parte apical, y un borde en cepillo diferenciado. Al mismo tiempo que se establece la diferenciación morfológica celular, se pone en marcha una diferenciación de su capacidad funcional que no es completada hasta que han transcurrido varios días tras la confluencia celular.

El hecho de que la proteína hSERT se exprese en la membrana de las células Caco-2, ha conducido a plantear uno de los objetivos prioritarios del presente trabajo de investigación, que es la caracterización del transporte de 5-HT mediado por la proteína transportadora hSERT en las células Caco-2, con el fin de establecer un modelo celular humano para el estudio del transportador SERT. Por ello, y teniendo en cuenta las características descritas por Chantret y cols (1988) respecto a la diferenciación celular y funcional de las células Caco-2, como primer paso, se ha estudiado la funcionalidad del transportador hSERT según el grado de diferenciación de dichas células.

Para realizar el presente grupo de experimentos, se utilizaron células Caco-2 que fueron sembradas en placas multipocillos de cultivo. Cada experimento se realizó sobre células del mismo pasaje, sembrando una placa para cada grado de diferenciación planteado en el estudio. El grado de diferenciación ha sido expresado en función de los días transcurridos a partir de la confluencia, considerando como día 0 el día en que han logrado confluir las células al 100%, y los días sucesivos 2, 5, 10 o 12, son los días de diferenciación post-confluencia. Debemos indicar, que el día 0 corresponde al día 5 de

cultivo desde la siembra, y éste fue un valor homogéneo dado que las células eran sembradas con una densidad celular constante en todos los experimentos realizados.

El experimento realizado para estudiar el transporte de 5-HT en función del grado de diferenciación, fue completado con el estudio del transporte de 5-HT en presencia de los inhibidores: 5-HT ( $2 \times 10^{-5}$  M), Fluoxetina ( $10^{-6}$  M) e Imipramina ( $10^{-3}$  M). Estos inhibidores son específicos del transporte mediado por el transportador SERT y permiten determinar la especificidad de la captación de 5-HT en las células Caco-2, así como cuantificar el transporte de 5-HT mediado por SERT respecto a la captación de 5-HT total. Asimismo, los experimentos fueron realizados en presencia y en ausencia de  $\text{Na}^+$  (sustituido equimolecularmente por cloruro de colina) para estudiar el grado de dependencia del transporte de 5-HT del ión  $\text{Na}^+$ .

El experimento pretende informar del efecto del estadio de diferenciación de las células Caco-2 sobre el transporte específico de 5-HT mediado por hSERT. Asimismo, determinar para cada estadio la posible contribución de hSERT al transporte de 5-HT y confirmar en estas células la dependencia de  $\text{Na}^+$  y la especificidad de los inhibidores del transporte de 5-HT, lo cual permitirá confirmar la posibilidad de que el transporte de 5-HT medido se deba efectivamente a la actividad del transportador hSERT.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 14. Tal como se observa en los resultados, incluso en estadio de preconfluencia, las células son capaces de transportar específicamente 5-HT, y a medida que las células se van diferenciando, adquieren mayor capacidad para el transporte. El incremento del transporte de 5-HT se hace muy marcado en el momento en el que las células alcanzan la confluencia si se compara con el valor del transporte en preconfluencia. Se observa también que a partir del día 5 post-confluencia el aumento del transporte celular de 5-HT se hace menos marcado, alcanzando un valor máximo (plateau) el día 12 post-confluencia (Figura 14A).

Este resultado indica que la diferenciación celular conduce a un aumento de la captación de 5-HT. De este modo, hemos podido seleccionar el estadio de desarrollo celular adecuado para futuros experimentos, eligiendo el periodo entre el día 5 y el 10.

El transporte observado en condiciones control muestra en todos los casos el funcionamiento del transportador específico hSERT, ya que un elevado porcentaje del transporte total resultaba inhibido, tanto por la presencia de inhibidores específicos, como en condiciones de ausencia de  $\text{Na}^+$  (ver Figura 14B). Debemos señalar que el

porcentaje de inhibición, y por tanto, el posible aporte de hSERT al transporte total, aumenta drásticamente cuando las células inician su diferenciación (día 0 de confluencia) y sigue aumentando hasta el día 5 post-confluencia. Ello de nuevo corrobora que la disponibilidad del transportador específico en la membrana celular está directamente relacionada con el grado de diferenciación.

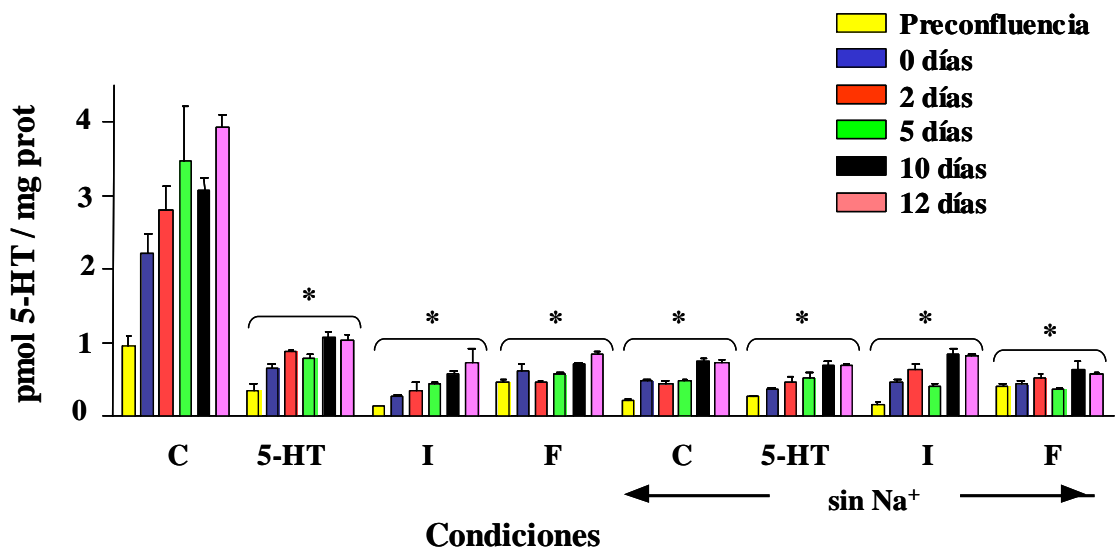
Aunque la capacidad de transporte de 5-HT de las células Caco-2 es reducida durante la preconfluencia, se detecta cierta posible actividad del transportador hSERT, dado que en presencia de los inhibidores específicos o en ausencia de  $\text{Na}^+$ , se obtiene disminución significativa de la captación de 5-HT. Ello podría en parte indicar que hSERT se expresa tempranamente en las células intestinales, con anterioridad a adquirir la diferenciación enterocitaria típica necesaria para ejercer sus funciones de transporte y digestivas. Este fenómeno en parte vendría corroborado por los resultados obtenidos por otros autores (Wade y cols. 1996) que han descrito la existencia del transportador SERT en células de las criptas intestinales, en las cuales el grado de diferenciación es menor, dado que dichas células lo adquieren a medida que transitan hacia la vellosidad.

También la expresión temprana de hSERT en las células Caco-2 podría, en parte, ser debida a la posibilidad de que la membrana total celular de las células Caco-2 presente cierta capacidad de transporte de serotonina. En este sentido, algunos autores han obtenido resultados que muestran la localización basolateral de los transportadores de aminas biógenas (noradrenalina, dopamina y serotonina) en células MDCK transfectadas con el ADNc que codifica dichos transportadores (Blakely y cols. 1998) lo cual daría en parte explicación a este resultado.

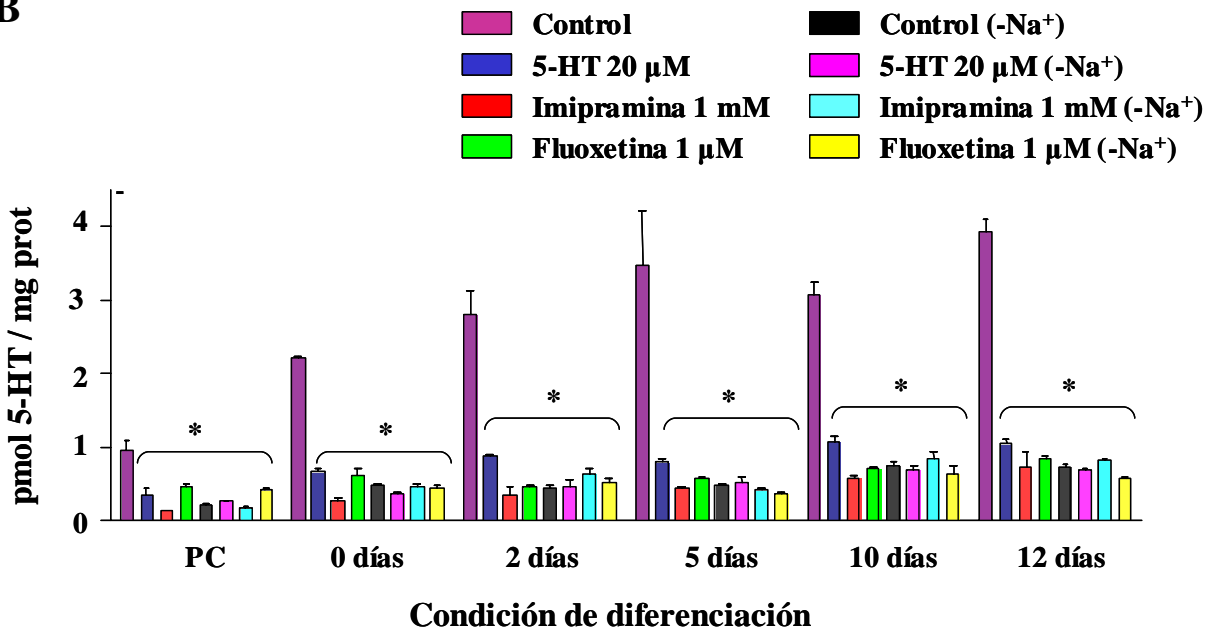
Otra conclusión, interesante a destacar, y extraíble de estos primeros resultados, es que las células Caco-2 mantienen la expresión del transportador hSERT después de la confluencia durante al menos 7 días. Ello hace que dichas células puedan constituir una herramienta interesante a la hora de establecer estudios de efectos a largo plazo (días) sobre dicho transportador.

En consecuencia, estos resultados demuestran que las células Caco-2 transportan serotonina a través de hSERT, y que desarrollan una mayor capacidad de transporte de 5-HT a medida que incrementan su diferenciación celular como célula epitelial intestinal. Asimismo, para futuros experimentos, permiten seleccionar un periodo entre los días 5 y 10 post-confluencia para trabajar en niveles funcionales óptimos de hSERT.

A



B



**Figura 14.** Efecto de grados crecientes de diferenciación de las células Caco-2 y diferentes inhibidores sobre el transporte de 5-HT. El transporte de 5-HT se estudió en función de la diferenciación indicada como días post-confluencia. El tiempo de incubación en el experimento de transporte fue 6 minutos. La concentración de 5-HT fue  $2 \times 10^{-7}$  M. A) Las condiciones experimentales son: C = control; 5-HT =  $2 \times 10^{-5}$  M; I = imipramina  $10^{-3}$  M; F = fluoxetina  $10^{-6}$  M. B) En abscisas están indicados los días post-confluencia como indicativo de distintos grados de diferenciación celular: PC (preconfluencia); 0, 2, 5, 10 y 12 días post-confluencia. En las condiciones indicadas con o - Na<sup>+</sup>, se estudió el transporte en ausencia de Na<sup>+</sup> en el medio de incubación, que fue sustituido equimolecularmente con cloruro de colina. Los datos mostrados son pmol 5-HT / mg proteína y corresponden a la media  $\pm$  el error estándar de 6 experimentos independientes. \* $p < 0,05$  comparado con el valor control correspondiente.

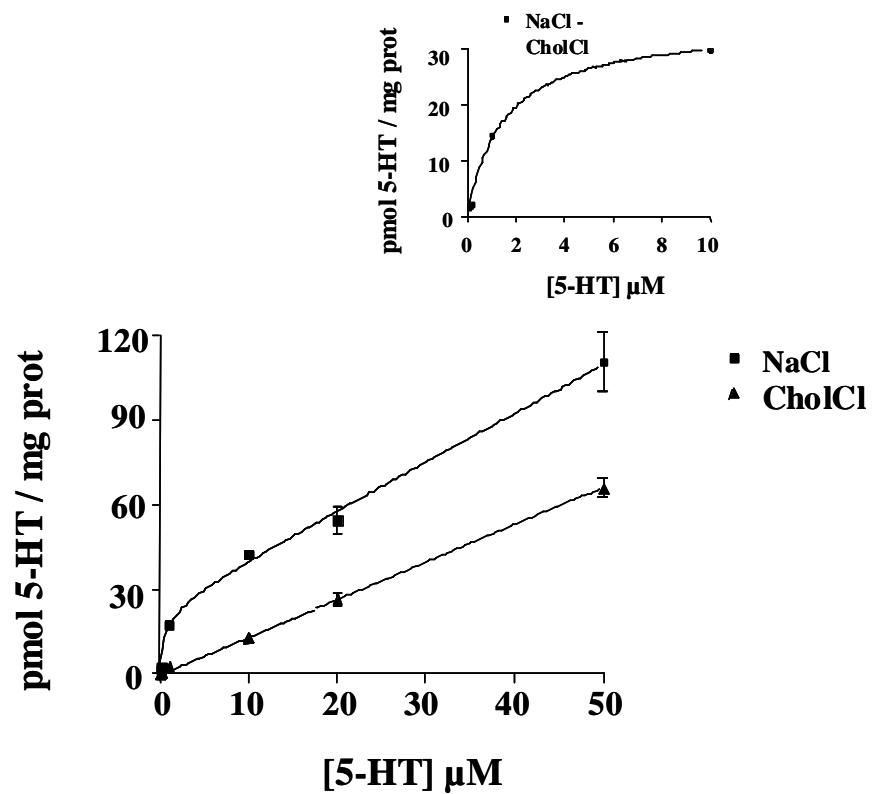
#### 1.4. Estudio cinético del transporte de serotonina en células Caco-2

Los resultados anteriores indican la existencia de captación de 5-HT en células Caco-2 con una significativa participación en la misma de un sistema de transporte específico que era inhibido por imipramina y fluoxetina, que presenta especificidad por el sustrato 5-HT y que además es dependiente de  $\text{Na}^+$ . En consecuencia, los resultados apuntaban a la participación del transportador hSERT en la captación de 5-HT en las células Caco-2. Sin embargo, nos pareció necesario profundizar en la caracterización funcional de dicho sistema de transporte con el fin de aproximar la posibilidad de la participación del transportador hSERT a la realidad funcional de estas células. Para ello, propusimos abordar la caracterización cinética del transporte específico de 5-HT sobre el estadio de diferenciación idóneo.

Los experimentos han sido realizados en células Caco-2 en estadio de diferenciación correspondiente al día 9 post-confluencia. Se ha realizado la determinación del transporte de 5-HT a distintas concentraciones de sustrato en un rango entre  $5 \times 10^{-8}$  y  $5 \times 10^{-5}$  M, con el fin de trabajar en el entorno de valores próximos a la  $K_t$  calculada por otros autores en otros modelos celulares y animales (Ramamoorthy y cols. 1993; Chen y cols. 1998). El transporte ha sido medido en presencia y ausencia del ión  $\text{Na}^+$ , con el fin de poder calcular el componente del transporte correspondiente al sistema  $\text{Na}^+$ -dependiente y  $\text{Na}^+$ -independiente, sustrayendo al transporte total el transporte en ausencia de  $\text{Na}^+$ . Tal como ya se ha indicado en el apartado de Material y Métodos, los cálculos de las constantes cinéticas  $V_{\text{max}}$ ,  $K_t$  y  $K_d$  se realizaron a partir de los resultados obtenidos del transporte total mediante una regresión no lineal y la adecuación de los mismos a una ecuación con dos términos, uno correspondiente a un sistema de transporte saturable y el otro a una difusión simple. Los valores de captación de 5-HT obtenidos en ausencia de  $\text{Na}^+$ , se adecuaron a una recta (componente de difusión) y se calculó el valor de  $K_d$ . De este modo se comprobó la coincidencia del valor de  $K_d$ , bien fuera calculado a partir del transporte total o a partir de la ausencia de  $\text{Na}^+$ . Los resultados obtenidos están presentados en la Tabla 2 y la Figura 15.

**Tabla 2.** Estudio cinético del transporte de 5-HT y valores de las constantes cinéticas obtenidas en células Caco-2. Las constantes cinéticas  $V_{max}$  y  $K_t$  han sido calculadas a partir de 5 experimentos.

CONSTANTES CINÉTICAS	
$V_{max}$ (pmol / mg prot)	$24,78 \pm 3,46$
$K_t$ (nM)	$767 \pm 179$
$K_d$ ( $\mu$ l / mg prot)	$1,71 \pm 0,09$



**Figura 15.** Estudio cinético del transporte de 5-HT en células Caco-2. En la parte inferior se muestran los resultados de las cinéticas de transporte en presencia ( $\text{NaCl}$ ) y ausencia de  $\text{Na}^+$  ( $\text{CholCl}$ ). En las condiciones de ausencia de  $\text{Na}^+$ , este ión fue sustituido con cloruro de colina ( $\text{CholCl}$ ). En la parte superior, detalle de la cinética obtenida al restar los valores en ausencia de  $\text{Na}^+$ , a los valores totales, obteniendo entonces los valores correspondientes al transporte dependiente de  $\text{Na}^+$ . Los valores presentados corresponden a pmol 5-HT / mg proteína y son el resultado de la media  $\pm$  el error estándar de 6 experimentos independientes.

Diversos autores, han determinado valores cinéticos de  $V_{max}$  (velocidad máxima) y  $K_t$  (constante de transporte) de SERT en diversos modelos experimentales. Así, Blakely y cols. (1991) detectaron que el transporte de 5-HT en células HeLa transfectadas con el ADNc de SERT de rata presentaba una  $K_t$  de  $320 \times 10^{-9}$  M; Hoffman y cols. (1991) obtuvieron en células CV-1 transfectadas con el ADNc de SERT de células basofílicas de rata con leucemia un valor de  $K_t$  de  $529 \pm 07 \times 10^{-9}$  M. También Ramamoorthy y cols. (1993) obtuvieron los valores de transporte  $K_t = 463 \times 10^{-9}$  M para el transporte de 5-HT en células HeLa transfectadas con el ADNc correspondiente al transportador SERT humano. Finalmente, Chen y cols. (1998) en estudios realizados en células HeLa transfectadas con el ADNc codificante del transportador SERT de mucosa intestinal de cobaya, obtuvieron un valor de  $K_t = 618 \times 10^{-9}$  M y  $V_{max} = 2,4 \times 10^{-17}$  mol célula<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>. De acuerdo a estos antecedentes, los valores cinéticos obtenidos en este apartado son coincidentes con los obtenidos por otros autores, siendo el valor de la  $K_t$   $767 \pm 179 \times 10^{-9}$  M. Este resultado parece corroborar el hecho de que el transportador que actúa en el transporte de 5-HT corresponde efectivamente a hSERT.



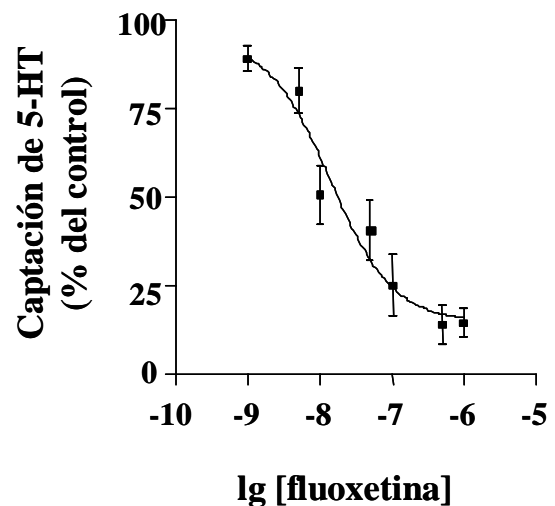
### 1.5. Estudio de la especificidad del transporte de 5-HT en células Caco-2. Inhibición con fluoxetina

Los resultados expuestos en el apartado 1.3. muestran la inhibición del transporte de 5-HT por fluoxetina en las distintas condiciones de diferenciación celular de las células Caco-2 estudiadas. Sin embargo, con el fin de caracterizar más en profundidad el transporte de 5-HT observado en estas células, nos propusimos realizar un estudio de la inhibición del transporte de 5-HT con fluoxetina, calculando una curva de inhibición y caracterizando su perfil inhibitor sobre el transportador de 5-HT.

Los experimentos de transporte fueron llevados a cabo en células Caco-2 con un grado de diferenciación correspondiente al día 9 post-confluencia. La concentración de serotonina utilizada fue de  $2 \times 10^{-7}$  M. Se utilizó esta concentración de 5-HT inferior al valor de  $K_m$  ( $7 \times 10^{-7}$  M) con el fin de que el valor calculado de  $IC_{50}$  se aproximara al valor de  $K_i$ . Los resultados se encuentran representados en la Figura 16. A partir de los datos obtenidos y mediante el programa GraphPad Prism se calculó el valor de  $IC_{50}$  que corresponde a  $17,6 \times 10^{-9}$  M.

La fluoxetina ha sido descrita como un inhibidor específico de la recaptación de serotonina (SSRI) mediada por el transportador SERT neuronal. El valor de  $IC_{50}$  obtenido en el presente trabajo muestra una gran similitud con los valores descritos por otros autores en estudio de SERT en distintos modelos experimentales de rata, cobaya, bóvido, mono y humano (Blakely y cols. 1991; Inazu y cols. 2001; Mortensen y cols. 2001).

**Figura 16.** Estudio de la inhibición específica de fluoxetina sobre el transporte de 5-HT en células Caco-2. La concentración de serotonina empleada fue  $2 \times 10^{-7}$  M. Tiempo de incubación 6 minutos. El grado de diferenciación de las células fue el correspondiente al noveno día post-confluencia. Los valores vienen referenciados al valor 100% de transporte de 5-HT correspondiente al obtenido en condiciones control (ausencia de inhibidor). Los valores presentados son el resultado de 6 experimentos, expresando la media  $\pm$  error estándar de los mismos.



Recapitulando los resultados hasta el momento obtenidos podemos resumir que, en lo que se refiere a la caracterización molecular, éstos muestran que la secuencia codificante de hSERT en Caco-2 es idéntica a la ya descrita para el transportador de serotonina neuronal cerebral humano. Asimismo, mediante el uso de un anticuerpo específico se ha logrado detectar una proteína con un peso aproximado de 80 kDa, tanto en la proteína total (homogenado celular) como en la membrana apical de las células Caco-2. Este peso molecular obtenido resultó similar al descrito por otros autores en otros modelos celulares y animales. Además, todos los resultados acerca de la expresión funcional de hSERT y de su caracterización obtenidos hasta el momento, nos permiten indicar que las células Caco-2 transportan 5-HT mediante un mecanismo de transporte específico dependiente de  $\text{Na}^+$ , saturable, con constantes cinéticas similares a las descritas para el transportador SERT correspondiente a cerebro humano, de mono y de rata así como al tracto gastrointestinal de cobaya. Este transportador ha resultado ser inhibido de modo específico por sustancias descritas como inhibidores de la recaptación de serotonina mediada por SERT, tales como la imipramina y la fluoxetina. Además, esta última sustancia, la fluoxetina, ha mostrado un valor de  $\text{IC}_{50}$  también similar al obtenido en estudios realizados en el transportador SERT de origen humano, de mono, rata o cobaya.

Todo ello nos permite concluir hasta el momento que las células Caco-2 expresan hSERT y que esta proteína es funcional. Asimismo, y con el fin de poder establecer un modelo celular humano para el estudio del transportador hSERT, se ha caracterizado la expresión funcional de SERT en función del grado de diferenciación, pudiendo concluir que hSERT se expresa tempranamente, antes de que las células hayan alcanzado la confluencia, y que la actividad de SERT aumenta a medida que las células Caco-2 se diferencian, existiendo un valor máximo de transporte en torno al grado de diferenciación adquirido en el día 12 post-confluencia. Con todo esto se puede concluir, que la línea celular Caco-2 constituye un excelente modelo “in vitro” para el estudio de hSERT y de su regulación a corto y largo plazo, mediada bien por factores fisiológicos o farmacológicos.

Con estos antecedentes, y habiendo obtenido resultados concluyentes respecto al uso de células Caco-2 para el estudio de hSERT, nos propusimos profundizar en el conocimiento de la regulación de la funcionalidad de esta proteína mediada por segundos mensajeros intracelulares en las células Caco-2.

## **1.6. Regulación de la funcionalidad de hSERT mediada por segundos mensajeros intracelulares**

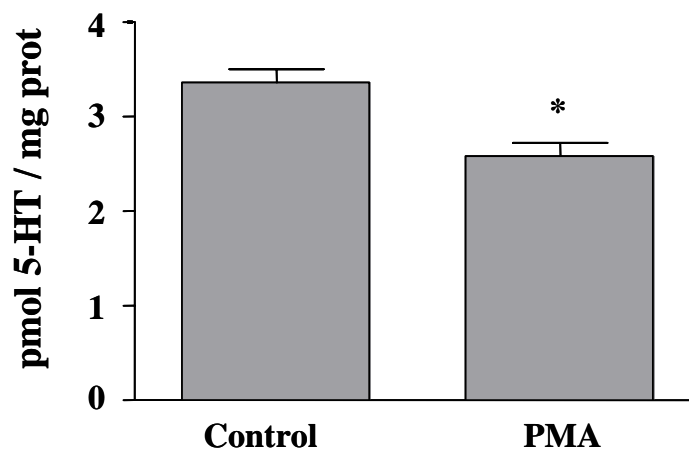
Múltiples trabajos han demostrado que SERT, de forma nativa o expresada heterológicamente en varios modelos celulares, puede ser rápidamente regulada por mensajeros intracelulares. Así, se ha detectado respuesta de la actividad de SERT después de una elevación/depleción aguda de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, del tratamiento con inhibidores de la calmodulina, con activadores de la proteína cinasa C (PKC) o por modificación de la vía NOS/guanosina monofosfato (Bryan-Lluka y cols. 2004; Qian y cols. 1997). Los rápidos cambios en la actividad de SERT o en los niveles de expresión observados tras la activación de segundos mensajeros dependientes de proteínas cinasas, hacen razonable pensar que la fosforilación puede ser una vía de regulación de la actividad de SERT o de la densidad en la superficie celular de este transportador, de un modo similar a la regulación que sufren los receptores acoplados a proteínas G. De hecho, han sido descritos varios sitios susceptibles de fosforilación en la proteína SERT localizados en los dominios citoplasmáticos. Esta fosforilación estaría mediada por PKC, PKA, y PKG (Ramamoorthy y cols. 1998).

El interés científico que representa la regulación de la actividad de hSERT es enorme, no sólo por el hecho de aumentar el conocimiento sobre esta proteína, sino por la posibilidad de determinar implicaciones de estas vías de regulación en diversas patologías, y también por el interés de una posible aplicación terapéutica. Por ello nos propusimos en este trabajo abordar la respuesta de la actividad de hSERT frente a la acción de segundos mensajeros intracelulares.

### 1.6.1. Análisis del efecto de la estimulación de la fosforilación de hSERT mediada por proteína cinasa C (PKC) sobre su funcionalidad

Con el fin de realizar este estudio se utilizó PMA (forbol miristato acetato), un éster forbólico que actúa como estimulador de la actividad PKC. Además, en estos experimentos se ensayaron la estaurosporina y la bisindolilmaleimida II (BIS II), como inhibidores de la actividad PKC.

Con carácter preliminar se realizaron un grupo de experimentos en los que las células Caco-2 fueron sometidas al efecto de PMA a la concentración  $10^{-6}$  M durante 30 minutos previos a la medida del transporte de 5-HT. Se ensayaron estas condiciones de tiempo de preincubación y concentración de PMA, ya que datos publicados en la bibliografía científica indicaban que dicha concentración había mostrado efectos sobre diversos transportadores (Ramamoorthy, 1998). Las células se encontraban en el estadio de diferenciación correspondiente al día 9 post-confluencia. Como se puede observar en la Figura 17, el PMA produjo una disminución significativa del transporte de 5-HT.

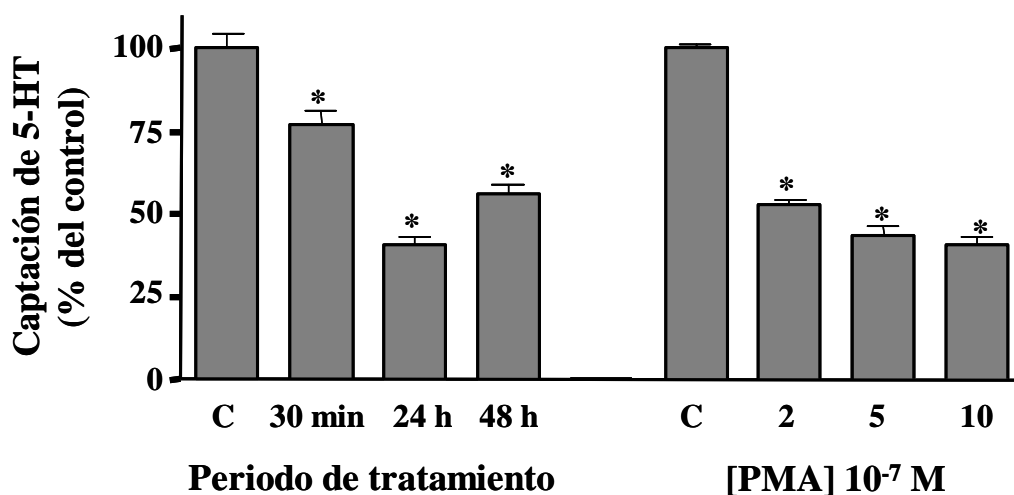


**Figura 17.** Efecto del PMA sobre el transporte de 5-HT en células Caco-2. Las células fueron tratadas con PMA 30 minutos antes del experimento de transporte. Las concentraciones de 5-HT y PMA fueron  $2 \times 10^{-7}$  M y  $10^{-6}$  M respectivamente. En los experimentos de transporte se utilizó una concentración de 5-HT de  $2 \times 10^{-7}$  M y el tiempo de incubación fue de 6 minutos. Las células Caco-2 se encontraban en grado de diferenciación correspondiente a 9 días post-confluencia. Los resultados corresponden a 6 determinaciones y son expresados como la media  $\pm$  error estándar. \*  $p < 0,05$  respecto al valor control.

Una vez determinado el efecto inhibitorio de PMA sobre el transporte de 5-HT, se realizaron una serie de experimentos en los que se ensayaron distintos periodos de tratamiento de las células con PMA con el fin de determinar si el efecto inhibitorio de PMA era dependiente del periodo de tratamiento de las células. Se ensayaron tiempos

de 30 minutos, 24 y 48 horas. Los resultados se muestran en la parte izquierda de la Figura 18 en la cual se puede observar que el efecto inhibitor de PMA ( $10^{-6}$  M) aumenta significativamente con el periodo de tratamiento, hasta llegar a un máximo de inhibición a las 24 horas. El tratamiento de 48 horas no mejoró el efecto observado a las 24 horas. Sin embargo, si se compara la disminución del transporte de 5-HT provocada por el pretratamiento con PMA  $10^{-6}$  M de 30 minutos (23%) frente a la observada con el tratamiento con PMA  $10^{-6}$  M de 24 horas (49%), se observa que dicha inhibición aumenta de forma significativa.

Por tanto, el efecto inhibitor de PMA sobre el transporte de 5-HT parece ser dependiente del periodo de tratamiento, y el periodo de 24 horas mostraba el efecto inhibitor máximo para la concentración de PMA ensayada ( $10^{-6}$  M)



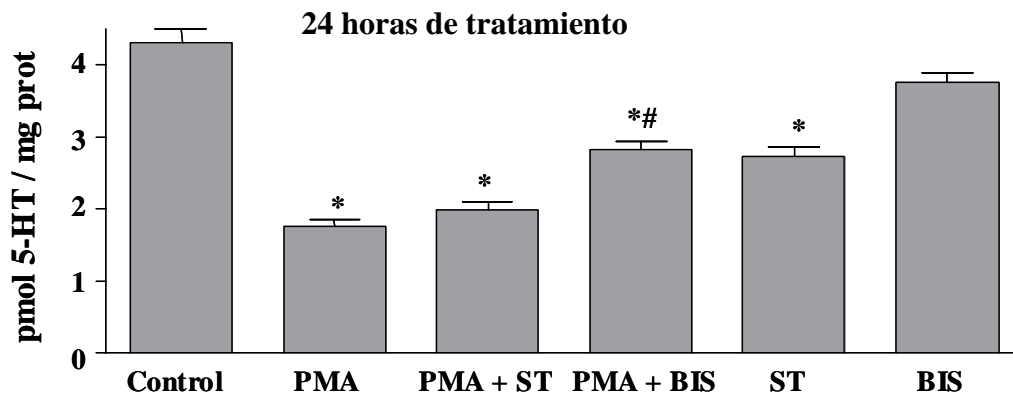
**Figura 18.** Efecto del PMA sobre el transporte de 5-HT en células Caco-2. En la parte izquierda se determina la relación del efecto de PMA ( $10^{-6}$  M) con el periodo de tratamiento (30 min, 24 h o 48 h). En la parte derecha se muestran los resultados obtenidos de la determinación de la relación entre la concentración de PMA (2, 5 y  $10 \times 10^{-7}$  M) y el efecto inhibitorio sobre el transporte de 5-HT. En los experimentos de transporte se utilizó una concentración de 5-HT de  $2 \times 10^{-7}$  M y el tiempo de incubación fue de 6 minutos. En ambos experimentos el grado de diferenciación de las células Caco-2 corresponde a 9 días post-confluencia. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error estándar del % de la captación respecto al control y corresponden a 6 determinaciones. \*  $p < 0,05$  respecto al valor control.

Una vez establecido el periodo de tiempo de efecto inhibitorio máximo de PMA, se determinó si dicho efecto, a ese periodo de tratamiento (24 horas) variaba con la concentración de PMA. Para ello se ensayaron 3 concentraciones de PMA: 2, 5 y  $10 \times 10^{-7}$  M. Los resultados se muestran en la parte derecha de la Figura 18. Como se

puede observar, el efecto inhibitorio de PMA aumenta significativamente con la concentración, obteniéndose el efecto máximo a la concentración de  $10^{-6}$  M. No obstante la diferencia en el efecto inhibitorio entre el tratamiento con PMA  $5 \times 10^{-7}$  y  $10^{-6}$  M no muestra significación, lo cual podría indicar una saturación del efecto. Debemos señalar que incluso cuando se alcanza el máximo efecto del tratamiento con PMA, éste no llega a bloquear completamente todo el transporte mediado por SERT, lo cual indica un efecto parcial de PMA sobre el transporte de 5-HT.

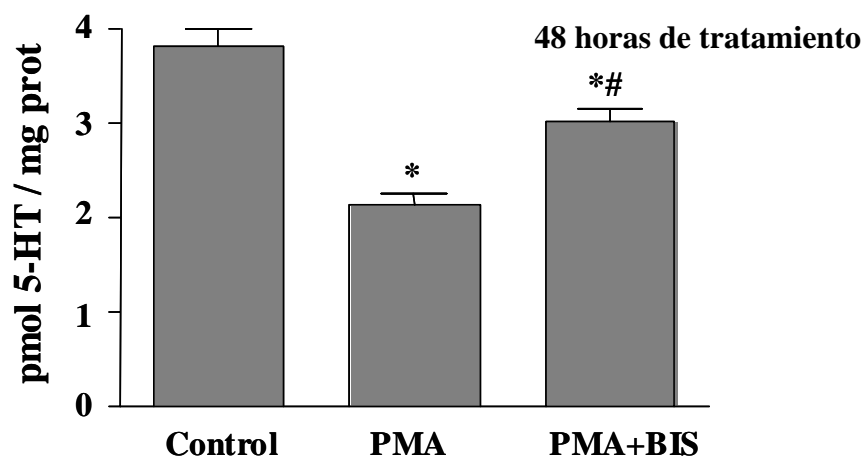
Para corroborar que, efectivamente, el efecto observado por el tratamiento con PMA era mediado por la estimulación de la vía de la PKC, se realizaron una serie de experimentos en los cuales se trataban las células durante 24 horas simultáneamente con PMA y un bloqueante de la actividad de la PKC. Se ensayaron dos inhibidores, estaurosporina y BIS II. La concentración de PMA ensayada fue  $10^{-6}$  M, y el periodo de tratamiento 24 horas, dado que como hemos visto, correspondían a las condiciones en las que se producía el mayor efecto de PMA. Las concentraciones de estaurosporina y de BIS II ensayadas fueron 0,5 y  $2 \times 10^{-6}$  M respectivamente, basándonos en datos extraídos de la bibliografía (Ramamoorthy y cols. 1998).

Los resultados obtenidos son mostrados en la Figura 19. Se observa en ellos, de nuevo, que el PMA disminuye el transporte de 5-HT significativamente, sin llegar a bloquearlo, tras un tratamiento de 24 horas. Como se puede observar, la estaurosporina no revertió el efecto del PMA. La estaurosporina, ha sido descrito como un inhibidor no específico de la PKC, que además altera otros procesos celulares como la inducción de la apoptosis. De hecho, las propias células Caco-2 tratadas durante 24 h con estaurosporina mostraron una reducción en el transporte de 5-HT, sugiriendo un efecto propio de esta sustancia que interfiere con la actividad del transportador, al margen de su acción inhibitoria de PKC. Por ello, ensayamos el tratamiento con un inhibidor específico de la PKC, la BIS II. Los resultados muestran que el tratamiento durante 24 h de las células Caco-2 simultáneamente con PMA y BIS II produce una reversión significativa, del efecto de PMA, recuperándose parcialmente el transporte de 5-HT. Asimismo, el tratamiento de las células exclusivamente con BIS II, no produjo alteración significativa del transporte de 5-HT, lo cual confirmaba que la reversión del efecto de PMA producido por BIS II era exclusivamente debido a su efecto inhibitorio de la PKC, y el efecto inhibitorio del transporte de 5-HT que producía PMA, en consecuencia, se debía a la estimulación de la PKC.



**Figura 19.** Implicación de la vía de la PKC en el efecto inhibitorio del transporte de 5-HT: Estudio del efecto del tratamiento de las células Caco-2 con PMA, durante 24 horas de tratamiento y su reversibilidad con inhibidores. Control (sin tratamiento); PMA = PMA  $10^{-6}$  M; ST = estaurosporina  $5 \times 10^{-7}$  M; BIS II = bisindolilmaleimida II  $2 \times 10^{-6}$  M. Se utilizó una concentración de 5-HT de  $2 \times 10^{-7}$  M y el tiempo de incubación fue de 6 minutos. Los resultados están expresados en pmoles de 5-HT / mg proteína y los valores corresponden a la media  $\pm$  error estándar de 5 experimentos. \*  $p < 0,05$  comparados con el valor control.

Estos resultados se corroboraron con el tratamiento de las células durante 48 horas con PMA y BIS II. Como se puede observar en la Figura 20, el efecto inhibitorio que produce PMA sobre la captación de 5-HT, resultó parcialmente revertido con la adición de BIS II, de manera similar a como habíamos observado con un periodo de tratamiento de 24 h, confirmando de nuevo la participación de PKC en el efecto observado de PMA sobre el transporte de 5-HT.

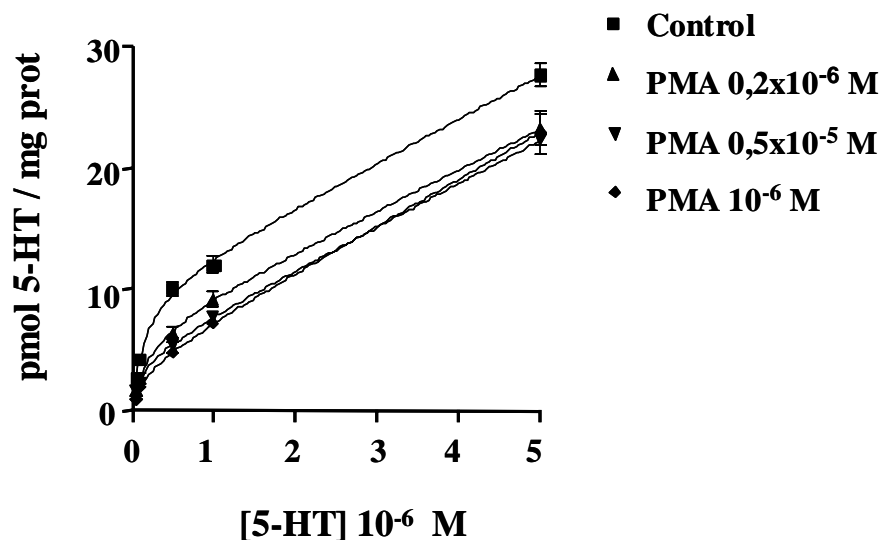


**Figura 20.** Implicación de la vía de la PKC en el efecto inhibitorio de PMA sobre el transporte de 5-HT. Las células Caco-2 fueron tratadas durante 48 h con PMA ( $10^{-6}$  M) y/o BIS II ( $2 \times 10^{-6}$  M). Condiciones: Control; PMA; PMA + BIS II. En los experimentos de transporte se utilizó una concentración de 5-HT de  $2 \times 10^{-7}$  M y el tiempo de incubación fue de 6 minutos. Los resultados han sido expresados como pmol de 5-HT / mg proteína y corresponden a la media  $\pm$  error estándar de 4 experimentos.  $p < 0,05$  en comparación con el valor control. #  $p < 0,05$  comparado con el valor PMA.

Una vez determinado el efecto inhibitor producido como consecuencia de la activación de la enzima PKC, se realizó el estudio cinético de la actividad de hSERT tratando las células a distintas concentraciones de PMA ( $0,2$ ,  $0,5$  y  $1 \times 10^{-6}$  M) durante 48 horas, obteniendo de esta manera las constantes cinéticas  $V_{max}$  y  $K_t$ . Mediante este estudio pretendíamos determinar si el efecto inhibitorio de la PKC afectaba a la capacidad ( $V_{max}$ ), a la afinidad ( $K_t$ ) del transporte o a ambos. Se escogió la duración de 48 horas con el fin de establecer un efecto de tratamiento más a largo plazo, que permitiera diferenciar del efecto a corto plazo, descrito ya por otros autores.

**Tabla 3.** Estudio cinético del efecto del tratamiento durante 48 horas de las células Caco-2 a distintas concentraciones de PMA. Las constantes cinéticas  $V_{max}$  y  $K_t$  han sido calculadas a partir de 5 experimentos. \* $p < 0,05$  comparado con el valor control.

CONDICIONES	$V_{max}$ (pmol 5-HT / mg prot)	$K_t$ ( $\mu$ M)
Control	$10,20 \pm 0,75$	$0,151 \pm 0,030$
PMA $2 \times 10^{-7}$ M	$6,63 \pm 0,50^*$	$0,180 \pm 0,030$
PMA $5 \times 10^{-7}$ M	$4,71 \pm 0,23^*$	$0,157 \pm 0,019$
PMA $10^{-6}$ M	$3,89 \pm 0,24^*$	$0,166 \pm 0,028$



**Figura 21.** Estudio cinético del efecto del tratamiento durante 48 horas de las células Caco-2 con PMA. Las células fueron tratadas durante 48 h con tres concentraciones de PMA:  $2 \times 10^{-7}$ ,  $5 \times 10^{-7}$  y  $10^{-6}$  M. El rango de la concentración de serotonina fue de  $0,05$ - $5 \times 10^{-6}$  M. Los resultados se han expresado en pmoles 5-HT / mg proteína y corresponden a la media  $\pm$  error estándar de 5 determinaciones.



Los resultados obtenidos del estudio cinético han sido representados en la Figura 21, y los valores de las constantes cinéticas calculados por adecuación de los valores de transporte a una ecuación con un componente saturable y otro de difusión, se encuentran indicados en la Tabla 3. Tal como se puede observar, la estimulación de PKC a largo plazo reduce significativamente la  $V_{max}$  (capacidad) del transporte, en función de la concentración de PMA ensayada. Sin embargo, la  $K_t$  (afinidad) parece no resultar afectada por la PKC.

Los resultados obtenidos en este apartado indican que el transporte de 5-HT es inhibido por la activación de la PKC tanto en tratamientos agudos (30 minutos), como en crónicos (24 o 48 horas), produciéndose una reducción del 40% del transporte de 5-HT respecto al obtenido en control. Además, este efecto es dependiente de la dosis. Estos datos coinciden con los obtenidos por Qian y cols. (1997) en experimentos realizados en células HEK-293 transfectadas de modo estable con el ADNc de hSERT, y con los obtenidos por otros autores en plaquetas humanas (Anderson y Horne, 1992), o en células endoteliales de arteria pulmonar bovina (Myers y cols. 1989), si bien todos ellos determinaron el efecto de la estimulación aguda de PKC sobre la actividad de SERT.

Rammoorthy y cols. (1998), han estudiado el efecto de la activación de PKC sobre la función de SERT, y concluyen que la PKC fosforila la proteína transportadora SERT, que provocaría una internalización de la misma. Ello conduce a una disminución de la disponibilidad de la proteína transportadora en la membrana y en consecuencia, del transporte de 5-HT. Los resultados obtenidos en este apartado coinciden con la explicación dada por estos autores, dado que el estudio cinético indica que el efecto de la PKC produce fundamentalmente una reducción de la  $V_{max}$ , es decir, de la capacidad del transporte, que se encuentra directamente relacionada con la disponibilidad de moléculas transportadoras en la membrana.

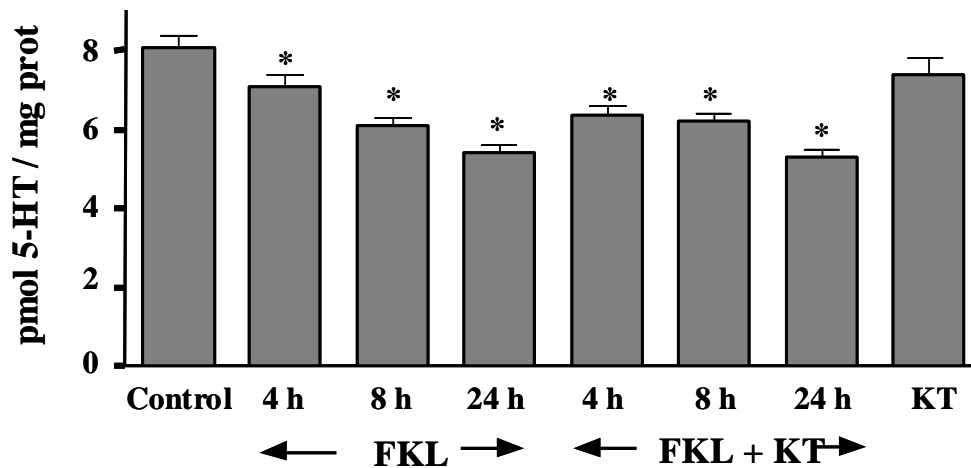
Sin embargo, un reciente estudio de Alrefai y cols. (2004) sobre el transporte de butirato en células Caco-2 concluye que el tratamiento con PMA, durante 24 h, provoca una regulación a la baja (down-regulation) de la expresión y función de la PKC, que a su vez produce una activación del transporte de butirato en estas células. Estos resultados discrepan, en lo que a respuesta a largo plazo de estimulación de PKC se refiere, de los obtenidos en el presente estudio. Además, estos autores no demuestran la alteración descrita para la PKC tras las 24 h de tratamiento con PMA, sino que apuntan esta posibilidad debido a que a tiempos de 30 minutos de tratamiento no obtienen efecto.

### **1.6.2. Análisis del efecto de la estimulación de la fosforilación de hSERT, mediada por AMPc, sobre su funcionalidad**

Dentro de las características de la proteína hSERT, se ha descrito que posee residuos serina capaces de ser fosforilados por la proteína cinasa A (PKA). De hecho, diversos experimentos han mostrado que en células transfectadas de modo estable para expresar SERT, este transportador resulta fosforilado al ser sometidas las células a la acción de la toxina del cólera (activador de la síntesis de AMPc) (Blakely y cols. 1998). Sin embargo, el efecto de la fosforilación de la PKA sobre la regulación de la funcionalidad de SERT ha mostrado resultados contradictorios. Por ello, algunos autores han considerado que el efecto que parecía tener la PKA sobre SERT podría ser un artefacto del sistema de estudio experimental que se produce en los sistemas de expresión heterólogos, ya que “in vivo” no parece tener significación (Ramamoorthy y cols. 1998).

No obstante, otros autores, en estudios en los que se realizaba la administración crónica de agentes que elevaban el AMPc, obtuvieron efectos significativos sobre el transporte de 5-HT en células JAR (coriocarcinoma de placenta humana), de manera que la estimulación de la vía del AMPc provocaba un aumento de dicho transporte (Cool y cols. 1991). Otros autores posteriormente han mostrado alteración en la transcripción génica de hSERT en células BeWo (células de coriocarcinoma de placenta humana) por efecto del AMPc, demostrando que el tratamiento de estas células con dibutilil-cAMP durante periodos de 3 a 24 horas aumenta el nivel de ARNm de SERT y también el transporte de 5-HT en estas células (Morikawa y cols. 1998).

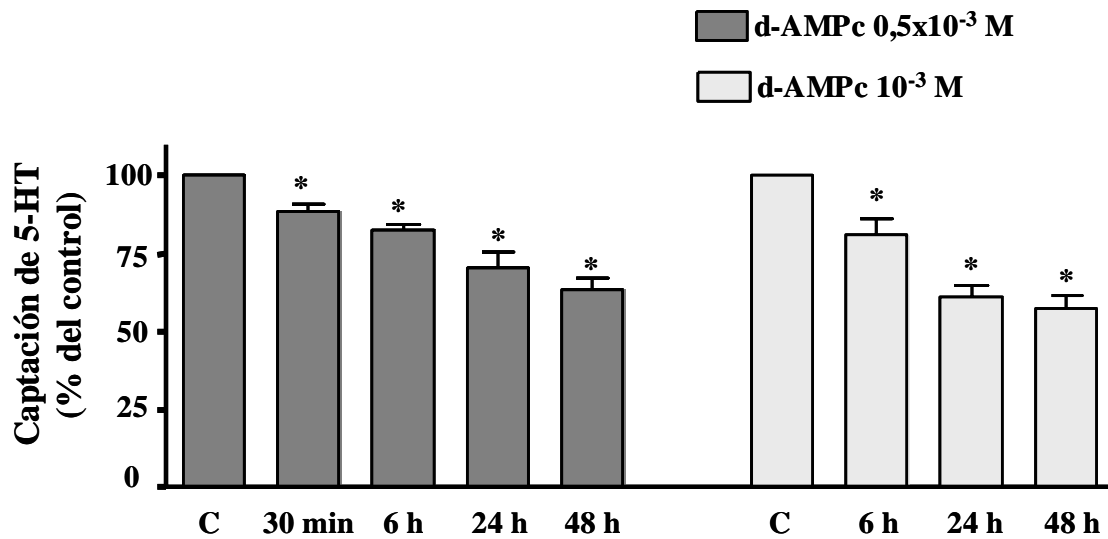
Dada la poca claridad de los efectos producidos por el AMPc sobre el transporte de 5-HT mediado por SERT, nos pareció interesante estudiar si la vía de señalización intracelular del AMPc y de la PKA alteraba el transporte de 5-HT en las células Caco-2. Para ello, realizamos una serie de experimentos en los que las células Caco-2 eran sometidas a la acción de la forskolina (activador de la adenilato ciclasa) durante periodos de tiempo de 4, 8 y 24 horas, con el fin de estudiar el efecto a corto y largo plazo. La concentración ensayada de forskolina fue de  $10^{-4}$  M, ya que trabajos previos realizados en células Caco-2 mostraban alteración de los niveles de AMPc en estas células a dichas concentraciones (Mahraoui y cols. 1994). Los resultados obtenidos se han representado en la Figura 22.



**Figura 22.** Efecto de la forskolina sobre el transporte de 5-HT en células Caco-2: Acción de la PKA. La concentración de 5-HT fue  $2 \times 10^{-7}$  M; la concentración de forskolina (FKL) fue  $10^{-4}$  M; la concentración de KT5720 (KT) fue  $10^{-6}$  M. Tiempo de transporte = 6 minutos. Las células fueron tratadas distintos tiempos: 4, 8 y 24 h con forskolina y/o KT 5720. Las células tratadas exclusivamente con KT, lo fueron durante 8 horas. En los experimentos de transporte se utilizó una concentración de 5-HT de  $2 \times 10^{-7}$  M y el tiempo de incubación fue de 6 minutos. Los resultados se expresan como pmol 5-HT / mg proteína y corresponden a la media  $\pm$  error estándar calculada de 5 experimentos independientes. \* $p < 0,05$  comparado con el valor control.

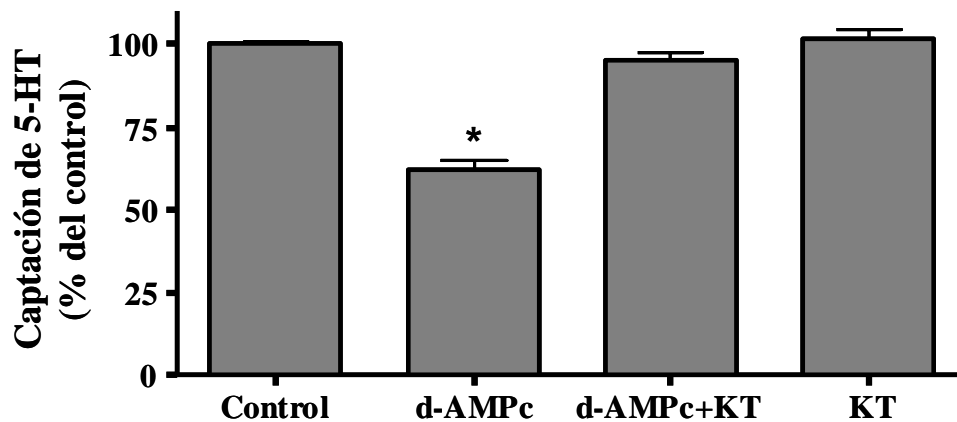
Como se puede observar, la forskolina disminuye de modo significativo el transporte de 5-HT a partir de las 4 h de tratamiento. Con el fin de corroborar la participación de la PKA en el efecto observado con la forskolina, se realizó el tratamiento de las células simultáneamente con forskolina y KT5720, que ha sido descrito como un inhibidor específico de la PKA. Los resultados parecen indicar que el KT 5720 no bloquea el efecto provocado por la forskolina, si bien el KT5720 no afecta de modo significativo el transporte de 5-HT.

Con el fin de aclarar y profundizar más en el efecto del AMPc sobre la funcionalidad de SERT, se estudió el efecto del dibutilil-AMPc, (d-AMPc), una sustancia análoga permeable del AMPc y no metabolizable. Para ello se llevaron a cabo una serie de experimentos a distintos tiempos de tratamiento tanto a corto (30 minutos), medio (6 horas) y largo (24 y 48 horas) plazo, y se ensayaron dos concentraciones de d-AMPc:  $0,5$  y  $1 \times 10^{-3}$  M. Los resultados se muestran en la Figura 23, donde se puede observar que el d-AMPc inhibe el transporte de 5-HT. Dicho efecto aumenta con el periodo de tratamiento y con la dosis.



**Figura 23.** Efecto del d-AMPC sobre el transporte de 5-HT en las células Caco-2. Los experimentos se llevaron a cabo a distintos tiempos de tratamiento y se utilizaron dos concentraciones de d-AMPC:  $0,5$  y  $1 \times 10^{-3}$  M. C = condición control, en el cual las células no han sido tratadas. En los experimentos de transporte se utilizó una concentración de 5-HT de  $2 \times 10^{-7}$  M y el tiempo de incubación fue de 6 minutos. Los resultados se expresan como porcentaje del valor control y corresponden a la media  $\pm$  error estándar de 5 determinaciones independientes. \* $p < 0,05$  respecto al control correspondiente.

Con el fin de garantizar que el efecto producido por el d-AMPC implicaba la vía de PKA se realizaron una serie de experimentos en los cuales se probó el d-AMPC a la dosis y periodo de mayor efecto observado ( $10^{-3}$  M y 48 horas respectivamente) conjuntamente con KT5720  $10^{-6}$  M. Tal como se observa en la Figura 24, el efecto inhibitorio que el tratamiento de d-AMPC produce sobre la captación de 5-HT desaparece cuando el tratamiento incluía KT5720. Este efecto era debido al bloqueo que KT5720 produce sobre la acción del d-AMPC, ya que KT5720 no muestra efecto alguno sobre la captación de 5-HT.

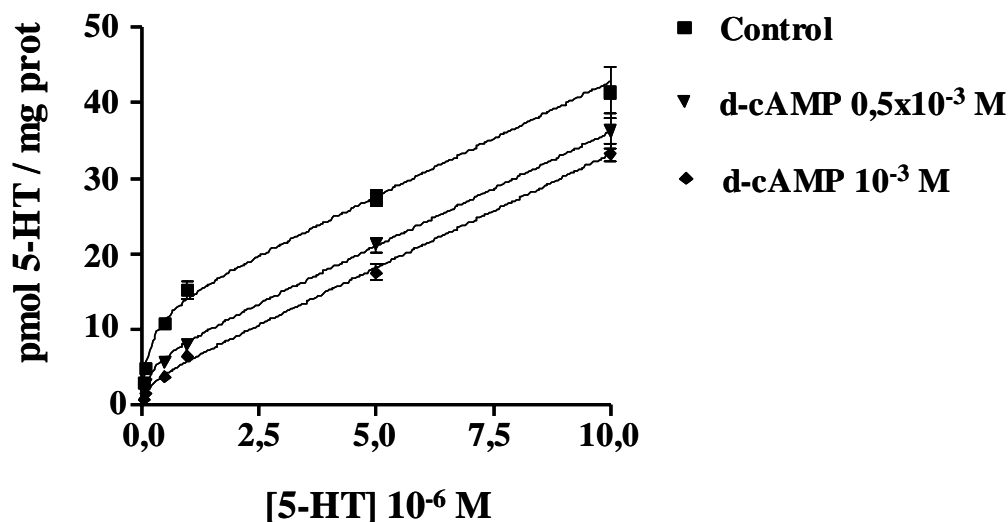


**Figura 24.** Efecto del d-AMPC sobre la captación de 5-HT. Las células fueron tratadas durante 48 h con d-AMPC  $10^{-3}$  M y/o KT5720  $10^{-6}$  M. La concentración de 5-HT utilizada para medir el transporte fue  $2 \times 10^{-7}$  M. En los experimentos de transporte se utilizó una concentración de 5-HT de  $2 \times 10^{-7}$  M y el tiempo de incubación fue de 6 minutos. Los resultados han sido expresados como porcentaje de la captación en condiciones Control. Los resultados son la media  $\pm$  error estándar de 6 experimentos independientes. \* $p < 0,05$  comparado con el valor control.

Con el fin de estudiar más en profundidad el efecto producido por el d-AMPC, se realizó el estudio cinético del transporte de 5-HT tras el tratamiento de las células con d-AMPC. El periodo de tratamiento seleccionado fue de 48 horas, dado que es el periodo que en el experimento previo mostraba mayor respuesta de d-AMPC, y además permitía estudiar el efecto a largo plazo. Se ensayaron dos concentraciones de d-AMPC, 0,5 y  $1 \times 10^{-3}$  M (Figura 25). Mediante este estudio se determinaron las constantes cinéticas  $V_{max}$  y  $K_t$  cuyos valores se muestran en la Tabla 4. Tal como se puede observar el tratamiento de las células con d-AMPC parece reducir de modo significativo y dependiendo de la dosis, el valor de  $V_{max}$  sin afectar el valor de  $K_t$ .

**Tabla 4.** Estudio cinético del efecto del tratamiento durante 48 horas de las células Caco-2 con d-AMPC. Las constantes cinéticas  $V_{max}$  y  $K_t$  han sido calculadas a partir de 5 experimentos independientes.  $p < 0,05$  comparado con el valor control.

CONDICIONES	$V_{max}$ (pmol 5-HT / mg prot)	$K_t$ ( $\mu$ M)
Control	$13,01 \pm 0,82$	$0,170 \pm 0,040$
d-AMPC $0,5 \times 10^{-3}$ M	$6,24 \pm 0,60^*$	$0,160 \pm 0,060$
d-AMPC $10^{-3}$ M	$3,10 \pm 0,39^*$	$0,160 \pm 0,070$



**Figura 25.** Estudio cinético del efecto del tratamiento durante 48 horas de las células Caco-2 con d-AMPC. Las células fueron tratadas durante 48 h con dos concentraciones de d-AMPC:  $0,5$  y  $1 \times 10^{-3}$  M. El rango de la concentración de serotonina fue entre  $0,05$ - $10^{-6}$  M. Los resultados se han expresado en pmoles 5-HT / mg proteína y corresponden a la media  $\pm$  error estándar de cinco determinaciones.

En la determinación llevada a cabo en este apartado, correspondiente al estudio del efecto de la activación de la vía intracelular de AMPc y de la PKA sobre el transporte de 5-HT mediada por SERT, los experimentos se realizaron sobre células diferenciadas que expresaban hSERT y se ensayaron dos condiciones: una de efecto a corto plazo (4 y 8 h), y una condición de efecto a largo plazo (24 y 48 h). En todas las

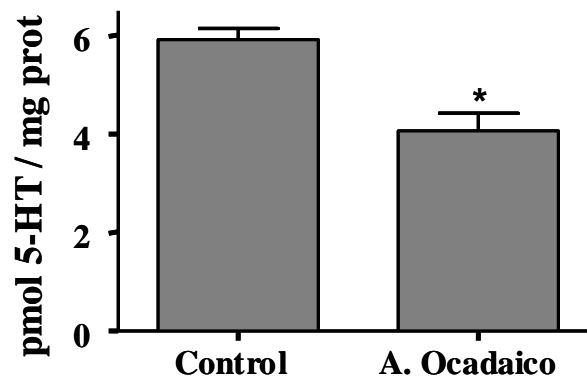
condiciones estudiadas se detectó reducción del transporte de 5-HT. Este efecto indica que la respuesta intracelular producida por el aumento de AMPc conduce a la inhibición del transporte de 5-HT, siendo además el efecto creciente a medida que aumenta la duración y la concentración del tratamiento, lo cual nos induce a pensar que no se detecta regulación a la baja (down-regulation) de la actividad de AMPc como consecuencia del tratamiento a largo plazo. En cuanto al efecto observado con la forskolina, éste podría ser debido en parte a la PKA, y en parte a cambios en el metabolismo de la glucosa, inducidos por la forskolina (Rousset y cols. 1986), si bien la forskolina ha mostrado afectar otros transportadores a través del aumento de AMPc en las células Caco-2 (Mahraoui y cols. 1994). En nuestro caso, el hecho de que el KT5720 no revierta el efecto de forskolina, también podría ser debido a la baja concentración de KT utilizada ( $10^{-6}$  M) frente a  $10^{-4}$  M de forskolina y no a la falta de efecto de PKA mediada por un aumento de AMPc.

El estudio cinético de la actividad de SERT en las células Caco-2 durante el tratamiento con d-AMPc a largo plazo (48h) ha demostrado una reducción de la capacidad de hSERT ( $V_{max}$ ).

Nuestros resultados discrepan de los obtenidos por Cool y cols. (1991) y Morikawa y cols. (1998) en líneas celulares de coriocarcinoma de placenta humana (células JAR o células BeWo), en los que se muestra que la exposición del cultivo celular a un aumento de AMPc provoca estimulación del transporte de 5-HT mediado por hSERT. En ambos casos las líneas celulares expresan constitutivamente hSERT, tal como sucede en Caco-2. Sin embargo, en el caso de los autores antes citados, el contacto con las sustancias modificadoras es continuo, mientras que en nuestro caso la forskolina actuaba durante 24 horas y era extraída del medio de incubación 6 horas antes del experimento, con lo cual no existía tiempo suficiente para un efecto crónico como el que obtienen Cool y cols. (1991) y Morikawa y cols. (1998). El efecto del AMPc sobre la función de hSERT, no obstante, ha mostrado bastantes discrepancias. De hecho, Blakely y cols. (1998) indican que la fosforilación mediada por PKA desencadena efectos pequeños o no afecta la funcionalidad de SERT en la regulación aguda del transportador.

### 1.6.3. Análisis del efecto de la estimulación de la fosforilación de hSERT mediada por inhibidores de las fosfatasa intracelulares

Los datos anteriormente obtenidos muestran el papel regulador de la actividad de hSERT en función del grado de fosforilación, bien sea vía la PKC o el AMPc. Con el fin de corroborar este dato se estudió el efecto que el tratamiento de las células durante dos días con ácido ocadaico producía sobre la actividad de hSERT. El ácido ocadaico es un inhibidor de fosfatasa intracelulares y, en consecuencia, incrementa el grado de fosforilación de las proteínas al disminuir los fenómenos de defosforilación celular.



**Figura 26.** Efecto del tratamiento con ácido ocadaico sobre la captación de 5-HT. Las células fueron tratadas dos días con ácido ocadaico  $5 \times 10^{-7}$  M. La concentración de 5-HT para medir el transporte fue  $2 \times 10^{-7}$  M y el tiempo de incubación fue de 6 minutos. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error estándar de 3 experimentos independientes. \* $p < 0,05$  comparado con el control.

Los resultados muestran, de nuevo, que el aumento del grado de fosforilación de hSERT produce una reducción de la actividad transportadora del mismo (Figura 26). En conclusión, todos estos datos confirmaron la importancia moduladora del grado de fosforilación de la proteína en la actividad de hSERT.



## 1.7. Discusión general

Los resultados obtenidos en este apartado nos han permitido, en primer lugar, establecer la expresión y funcionalidad del transportador de serotonina hSERT en las células Caco-2. Esta línea celular, cuyo origen es un adenocarcinoma de colon humano, ha mostrado ser un buen modelo de célula epitelial intestinal en condiciones de diferenciación en las cuales ya ha sido utilizada como modelo en numerosos estudios relacionados con la fisiología del epitelio intestinal. En nuestro caso, las células Caco-2 han mostrado transcribir el ARNm que codifica hSERT, y sintetizar la correspondiente proteína que ha sido detectada mediante western blot. Esta proteína presenta un tamaño molecular de aproximadamente 80 kDa, coincidente con el descrito por otros autores en diferentes tejidos, salvo pequeñas oscilaciones, posiblemente debidas a diferentes grados de glicosilación.

Asimismo, las células Caco-2 muestran capacidad de transportar 5-HT específicamente, ya desde los primeros estadios de diferenciación, si bien la medición de tasas elevadas de transporte específico se obtuvo tras, al menos, 5 días después de la confluencia. El transporte específico observado es bloqueado por los inhibidores descritos del transportador de 5-HT, indicando que la captación de 5-HT en células Caco-2 es en gran parte debida a la funcionalidad de hSERT. El hecho de que se produzca una expresión temprana del transportador SERT en las células Caco-2, brinda la posibilidad de establecer experimentos de respuesta de hSERT ante condiciones de tratamiento con diversas sustancias que dure diversos días.

Uno de los objetivos principales del presente trabajo era poder establecer un modelo celular humano de expresión de SERT con el fin de poder realizar estudios de regulación y modificación de este transportador en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas. Por ello, el hecho de que las células Caco-2 sean capaces de transportar 5-HT mediante el transportador hSERT es un dato inicial, pero resulta de interés fundamental determinar si las características de este transporte son coincidentes con las ya descritas por otros autores en diferentes tejidos y modelos celulares. Por ello, realizamos una serie de experimentos encaminados por un lado a realizar la caracterización cinética del transporte de 5-HT (cálculo de  $K_t$ ,  $V_{max}$  y  $K_d$ ) y la determinación de la cinética de inhibición del transporte mediante fluoxetina (cálculo de  $IC_{50}$ ). Los resultados obtenidos en el presente trabajo corroboran el hecho de que el

transporte observado en las células Caco-2 presenta unas características cinéticas de transporte de 5-HT y un valor de  $IC_{50}$  para la fluoxetina coincidentes con los ya descritos para el transportador SERT. Todos estos resultados, por tanto, han caracterizado la línea celular Caco-2 como un modelo “in vitro” de expresión y función del transportador SERT humano.

El siguiente paso que se decidió dar con el fin de estudiar el transportador SERT en las células Caco-2, consistió en estudiar la regulación de la actividad del transportador mediada por segundos mensajeros intracelulares. Se analizaron dos tipos de mecanismos intracelulares, el mediado por la PKC y el mediado por el AMPc. Resultados previos obtenidos por otros autores han demostrado que la proteína SERT es susceptible de sufrir fosforilaciones, y que estas fosforilaciones tienen consecuencias en el transporte de 5-HT mediado por SERT. Especialmente, la PKC parece estar implicada en la reducción de la capacidad de transporte de 5-HT en los tejidos tratados debido a la fosforilación e internalización de la proteína. Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la activación de la PKC provoca una reducción de la captación de 5-HT, sin llegar a bloquear el transporte, y este efecto es parcialmente anulado cuando se someten las células al efecto de inhibidores de la PKC. El efecto se detectó tanto a tiempos cortos de exposición (30 minutos), como en tratamiento de 24 ó 48 horas de las células con activadores de la PKC, y además ha mostrado ser dependiente de la dosis de activador administrada. Estos datos corroboran los ya obtenidos por otros autores en otros tejidos respecto al transportador SERT cuando la activación de la PKC se producía a tiempos cortos. Sin embargo, el tratamiento largo (24 o 48 h) muestra una persistencia de la reducción del transporte de 5-HT que de nuevo parece ser dependiente en parte de la activación de la PKC, lo cual discrepa de resultados obtenidos por otros autores en células Caco-2, que han descrito una regulación a la baja (down-regulation) a tiempos largos de exposición de las células a activadores de PKC (Alrefai y cols. 2004).

La estimulación de la PKC a largo plazo se ha visto que afecta a la capacidad ( $V_{max}$ ) del transportador de SERT. Estos resultados corroboran los resultados obtenidos por otros autores (Ramamorthy y Blakely, 1999; Qian y cols. 1997; Jayanthi y cols. 2005), donde a tiempos cortos de tratamiento con activadores de PKC se produce una fosforilación y una posterior internalización, modificando de esta manera la distribución y densidad en la membrana de SERT y por lo tanto, una disminución en

capacidad de transporte. Estudios recientes han demostrado que modificaciones del calcio intracelular mediados por hormonas, pueden ser las responsables de la inhibición de la actividad de SERT (Koldzic y cols. 2004). En nuestro trabajo, hemos demostrado que en las células Caco-2 el efecto de la PKC sobre SERT (disminución de la  $V_{max}$ ), continúa después de un tratamiento a largo plazo.

También se realizó el estudio del efecto de la activación de la vía intracelular de AMPc y de la PKA sobre el transporte de 5-HT mediada por hSERT. Los experimentos se realizaron sobre células diferenciadas que expresaban hSERT y se ensayaron dos condiciones una de efecto a corto plazo (4 y 8 h) y una tercera condición de efecto a largo plazo (24 y 48 h). En todas las condiciones estudiadas se detectó reducción del transporte de 5-HT. Este efecto indica que la respuesta intracelular producida por el aumento de AMPc conduce a la inhibición del transporte de 5-HT siendo el efecto creciente a medida que aumenta la duración del tratamiento, lo cual nos induce a pensar que no se detecta regulación a la baja (down-regulation) como consecuencia del tratamiento a largo plazo. Al igual que se observó con la activación de la PKC, el AMPc afecta fundamentalmente la  $V_{max}$  del transporte de 5-HT mediado por hSERT.

Nuestros resultados parecen estar de acuerdo con el hecho de que la fosforilación de hSERT, bien por PKC o PKA, produce una disminución del transporte de 5-HT mediada por SERT, si bien, tal como afirma Blakely y cols. (1998) el efecto por activación de PKA es menor. La importancia del grado de fosforilación sobre la actividad de hSERT ha quedado asimismo corroborada por el efecto inhibitor que el tratamiento con ácido ocadaico presenta sobre la actividad de hSERT.

## **IV.2. ESTUDIO DE LA REGULACIÓN FISIOLÓGICA DE hSERT EN LAS CÉLULAS CACO-2**

La proteína SERT es la encargada de realizar la recaptación de la serotonina hacia el interior celular, disminuye así la disponibilidad de la misma en el espacio extracelular, reduce la interacción de la 5-HT con sus receptores de membrana en la célula diana, y, en consecuencia, impide o modula los efectos fisiológicos de la 5-HT. La expresión y la actividad de hSERT han sido descritas en los sistemas nerviosos central y entérico (Chen y cols. 2001; Rudnikic y Clark, 1993) y también en células no neuronales, como son las plaquetas (Lesch y cols. 1993) y las células epiteliales de la mucosa gastrointestinal (Chen y cols. 1998; Martel y cols. 2003; Wade y cols. 1996).

La 5-HT está implicada en la etiología de numerosas enfermedades del sistema nervioso central como son la depresión, ansiedad y esquizofrenia (Purselle y Nemeroff, 2003) y también del tracto gastrointestinal, como es el síndrome de intestino irritable y la colitis ulcerosa (Coates y cols. 2004; Gershon 2004). Por este motivo, el transportador de serotonina (SERT) está siendo una diana molecular interesante para sustancias terapéuticas que modifican la disponibilidad de 5-HT inhibiendo la actividad de SERT. Estas sustancias son efectivas en tratamientos repetitivos a largo plazo. La inhibición de la actividad de SERT aumenta la disponibilidad de la serotonina en el medio extracelular, lo cual puede llegar a desensibilizar los receptores de serotonina, alterando la actividad serotoninérgica, tal y como numerosos estudios han demostrado. Asimismo, hipotéticamente también SERT puede ser afectado por el aumento de disponibilidad de 5-HT en el medio extracelular, sin embargo este efecto no ha sido estudiado.

El efecto a largo plazo de la 5-HT sobre SERT permanece sin ser esclarecido. Se han realizado estudios del efecto de la 5-HT sobre SERT a corto plazo. Así, se ha demostrado que la 5-HT disminuye la fosforilación dependiente de PKC y su posterior internalización (Ramammoorthy y Blakely, 1999). También, estudios recientes han propuesto un mecanismo alostérico en SERT por el cual diversos antidepresivos modularían su actividad (Chen y cols, 2005, Neubauer y cols.2006; El Mansary y cols. 2007). En cualquier caso, estos estudios no determinan cómo afecta a la actividad de SERT el tratamiento a largo plazo con 5-HT. En este sentido, únicamente se ha

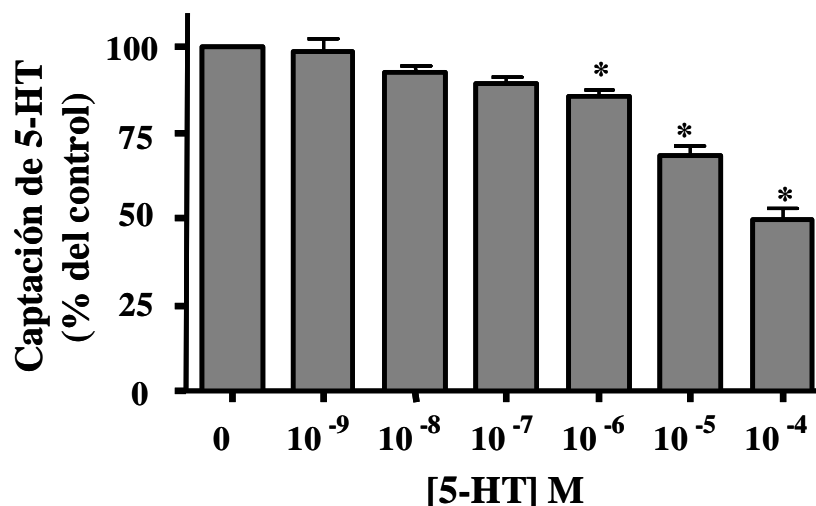
observado una disminución en los niveles de ARNm de SERT cuando se reduce la concentración de 5-HT (Linnet y cols. 1995), por lo que el efecto a largo plazo de la 5-HT sobre SERT permanece sin ser esclarecido.

Dada la ausencia de resultados concluyentes que expliquen el efecto del aumento de la disponibilidad de 5-HT sobre hSERT, nos propusimos estudiar el efecto que ejerce el tratamiento a largo plazo de 5-HT en la actividad y expresión del transportador de serotonina humano, hSERT, utilizando el modelo celular Caco-2, que previamente habíamos validado en el apartado anterior. Este apartado constituye, por tanto, el estudio de la regulación fisiológica de hSERT en las células Caco-2 (Objetivo 4).

## 2.1. Efecto del tratamiento con 5-HT sobre el transporte de serotonina y sus constantes cinéticas

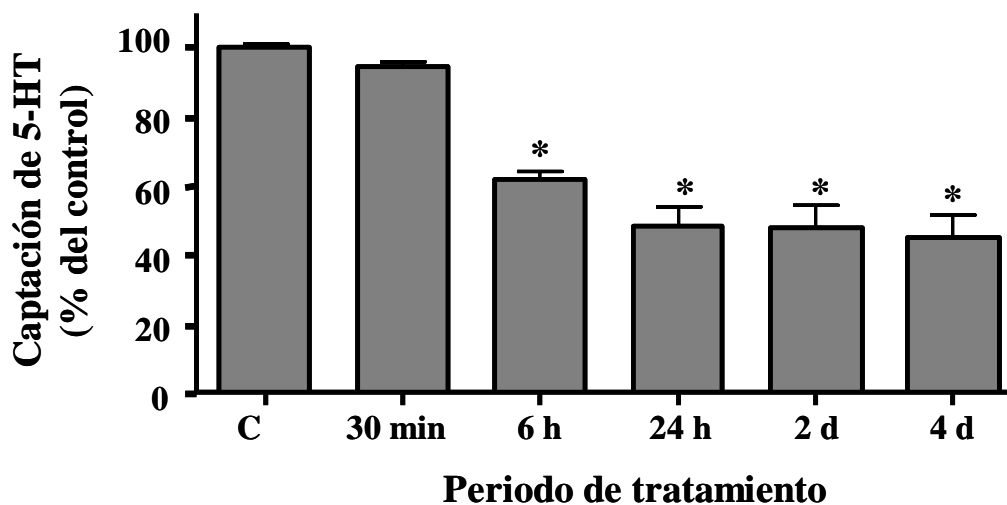
El hecho de que las células Caco-2 expresen de modo significativo el transportador y sea funcional a lo largo de sucesivos días posteriores a la confluencia, tal como hemos demostrado anteriormente, nos ha permitido diseñar experimentos para estudiar el efecto del tratamiento crónico de 5-HT sobre hSERT, mediante su adición al medio de incubación y tras haber seleccionado el estadio de diferenciación celular de inicio y la duración del tratamiento.

En primer lugar nos propusimos estudiar el efecto del tratamiento bajo diferentes concentraciones de serotonina (rango entre  $10^{-9}$  y  $10^{-4}$  M) sobre la captación de 5-HT en las células Caco-2. El tratamiento empezó el día 5 post-confluencia (décimo día de siembra) y duró 4 días. Transcurridos los días de tratamiento, las células se encontraban en un nivel de diferenciación correspondiente al día 9 post-confluencia, y la medida del transporte se llevó a cabo según el método indicado en el apartado de Material y Métodos. El medio de cultivo sin suero fetal, se suministró a las células 48 horas antes del experimento de transporte, para prevenir el efecto de la 5-HT presente en el suero fetal bovino. Esta condición no afectó ni a la diferenciación ni a la actividad de hSERT de las células Caco-2. Los resultados obtenidos son mostrados en la Figura 27.



**Figura 27.** Estudio del efecto del tratamiento de las células Caco-2 bajo distintas concentraciones de serotonina sobre el transporte de 5-HT. El rango de la concentración de 5-HT fue entre  $10^{-9}$ - $10^{-4}$  M. El tiempo de tratamiento fue de 4 días. En los experimentos de transporte se utilizó una concentración de  $2 \times 10^{-7}$  M y el tiempo de incubación fue de 6 minutos. Los resultados se expresan como porcentaje del valor control y corresponden a la media  $\pm$  error estándar de cinco determinaciones independientes. \* $p < 0,05$  respecto al control correspondiente.

Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con 5-HT produce una disminución del transporte de serotonina, siendo significativo sólo cuando las células son tratadas con altas concentraciones de 5-HT ( $10^{-6}$  M a  $10^{-4}$  M). Con el fin de caracterizar este efecto, se estudió la relación existente entre el tiempo de tratamiento de las células y la inhibición del transporte, para lo cual se midió la captación de 5-HT en células sometidas a distintos periodos de tratamiento. La concentración de serotonina que se utilizó fue de  $10^{-4}$  M, dado que es la concentración a la cual se obtuvo el mayor efecto inhibitor. Los resultados han sido representados en la Figura 28.



**Figura 28.** Efecto del tratamiento con 5-HT sobre la captación de 5-HT en las células Caco-2. Los experimentos se llevaron a cabo a distintos tiempos de tratamiento y se utilizó una única concentración de 5-HT:  $10^{-4}$  M. C = condición control, en el cual las células no han sido tratadas. Los periodos de tratamiento fueron: 30 minutos (30 min.), 6 horas y 24 horas (6 h y 24 h), y 2 y 4 días (2 d y 4 d). En los experimentos de transporte se utilizó una concentración de  $2 \times 10^{-7}$  M y el tiempo de incubación fue de 6 minutos. Los resultados se expresan como porcentaje del valor control y corresponden a la media  $\pm$  error estándar de cinco determinaciones independientes. \* $p < 0,05$  respecto al control correspondiente.

Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con 5-HT disminuye la actividad de hSERT. Este efecto es dependiente del tiempo, alcanzando la respuesta máxima después de un día de tratamiento; el efecto se mantiene igual tras 4 días de tratamiento. En cuanto a la concentración de 5-HT, una inhibición significativa se obtiene al tratar las células a una concentración de 5-HT elevada:  $10^{-4}$  M y con tan sólo 6 horas de tratamiento. Con estos resultados podemos concluir que el tratamiento de las células Caco-2 con 5-HT es dosis y tiempo dependiente; a mayor concentración de 5-HT se obtiene una mayor inhibición del transporte de 5-HT y lo mismo ocurre con el tiempo de tratamiento.

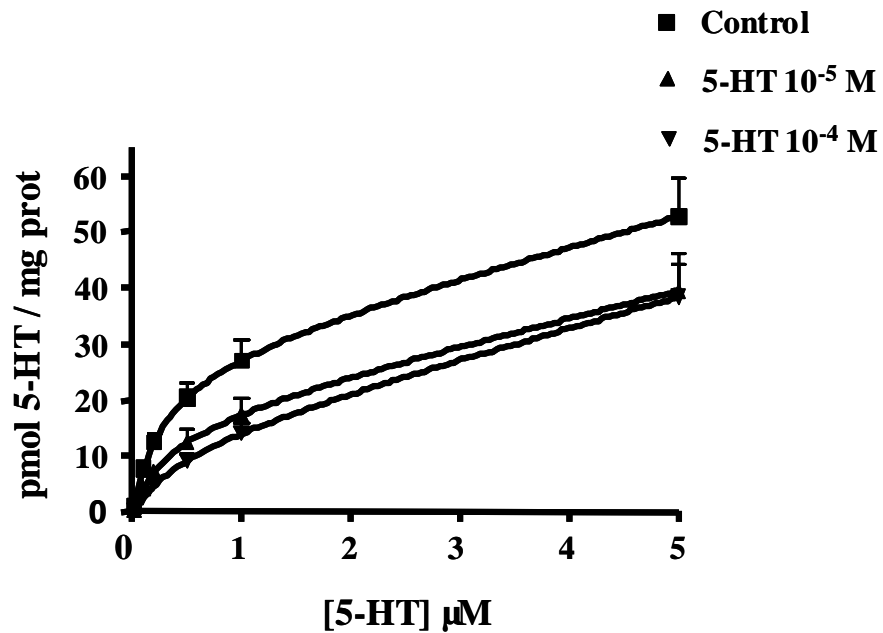
Con el fin de continuar con la caracterización del efecto producido por el tratamiento con 5-HT sobre la actividad de hSERT, y poder determinar más concretamente cual es la afectación del transporte de 5-HT, se llevó a cabo el estudio cinético de dicho transporte en células tratadas con 5-HT.

El estudio cinético nos permite determinar las constantes cinéticas  $V_{max}$ ,  $K_t$  y  $K_d$  en cada condición experimental. La  $K_t$  hace referencia a la afinidad por el sustrato, y la  $V_{max}$  hace referencia a la capacidad del transportador, como ya se ha mencionado anteriormente. Los experimentos se realizaron en células Caco-2 tratadas con 5-HT según el protocolo del apartado anterior, es decir, desde el día 5 post-confluencia hasta el día 9. Se ensayaron dos tratamientos con concentraciones de 5-HT,  $10^{-4}$  M y  $10^{-5}$  M respectivamente. Se midió el transporte de 5-HT en un rango de concentraciones entre  $10^{-6}$  y  $5 \times 10^{-6}$  M tanto en condiciones normales, como en ausencia de  $Na^+$ , (sustituido equimolecularmente con colina), con el fin de determinar el componente saturable  $Na^+$ -dependiente y su afectación por el tratamiento con 5-HT. El transporte  $Na^+$ -dependiente se calculó mediante la sustracción al valor del transporte total (en condiciones normales) del valor correspondiente en ausencia de  $Na^+$ . A partir de esta regresión, se calcularon los valores de  $V_{max}$  y  $K_t$  para cada condición: control y tratamiento con serotonina  $10^{-5}$  M y  $10^{-4}$  M. Asimismo, los valores de transporte en ausencia de  $Na^+$  permitieron calcular el valor de la  $K_d$ , y poder determinar de este modo si existía alguna alteración de la permeabilidad al 5-HT mediada por el tratamiento con 5-HT. Para estos cálculos se utilizó el programa GraphPad Prism como en casos anteriores. Los valores obtenidos están indicados en la Tabla 5 y los datos se representan en la Figura 29.

**Tabla 5.** Efecto del tratamiento de 5-HT sobre las constantes cinéticas del transporte mediado por hSERT. Las constantes cinéticas  $V_{max}$ ,  $K_t$  y  $K_d$  han sido calculadas a partir de 3 experimentos independientes y los datos corresponden a la media  $\pm$  error estándar. \* $p < 0,05$  comparado con el valor control.

CONDICIONES	$V_{max}$ (pmol 5-HT / mg prot)	$K_t$ ( $\mu$ M)	$K_d$ ( $\mu$ l / mg prot)
Control	28,12 $\pm$ 3,60	0,29 $\pm$ 0,04	5,25 $\pm$ 0,71
5-HT $10^{-5}$ M	16,91 $\pm$ 2,90*	0,34 $\pm$ 0,07	4,74 $\pm$ 0,35
5-HT $10^{-4}$ M	12,80 $\pm$ 1,90*	0,49 $\pm$ 0,11*	5,35 $\pm$ 0,91





**Figura 29.** Estudio cinético del efecto del tratamiento con 5-HT sobre el transporte de 5-HT mediado por hSERT. Condiciones experimentales: Control, células no tratadas; 5-HT 10<sup>-5</sup> M, las células eran tratadas durante 4 días con 5-HT 10<sup>-5</sup> M; 5-HT 10<sup>-4</sup> M, las células eran tratadas durante 4 días con 5-HT 10<sup>-4</sup> M. Los resultados se expresan como pmoles de 5-HT captados / mg proteína y son la media ± error estándar de 3 experimentos independientes.

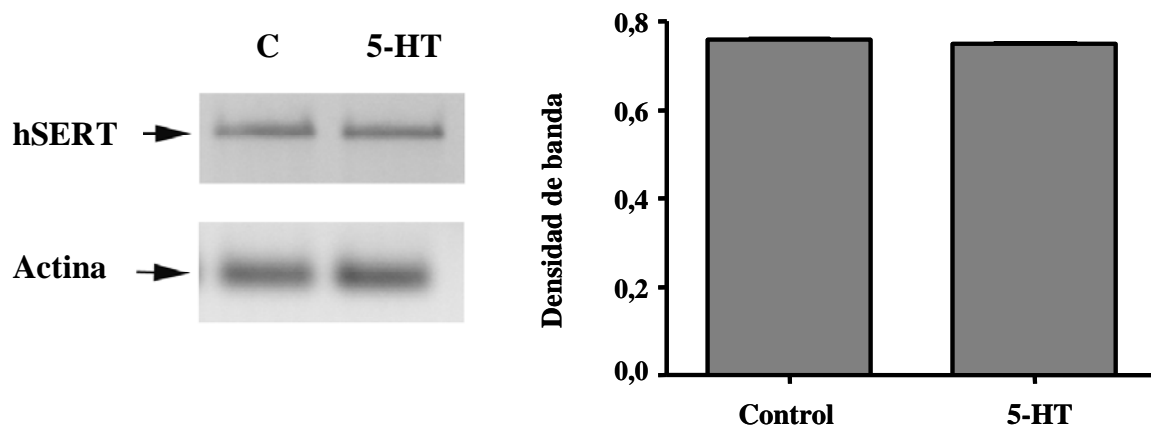
A partir de los resultados obtenidos en el estudio cinético se observa que la inhibición mediada por el tratamiento con serotonina parece afectar al valor de la  $V_{max}$ , que resulta reducida significativamente en los dos tratamientos ensayados, y el valor de la  $K_t$ , que aumenta en ambos tratamientos, pero que resulta significativo solo tras el tratamiento con 5-HT 10<sup>-4</sup> M.

Esta disminución del valor de  $V_{max}$  y aumento del valor de  $K_t$  indican que tanto la capacidad como la afinidad del transportador resultan reducidas por efecto del tratamiento con 5-HT. Ello sugiere que el tratamiento con 5-HT puede afectar a la disponibilidad de moléculas transportadoras en la membrana y también a la afinidad del transportador en la membrana, lo cual indicaría una inhibición de tipo mixto.

## 2.2. Efecto del tratamiento a largo plazo con 5-HT sobre la expresión de mRNA de hSERT.

Los resultados obtenidos muestran un efecto funcional de 5-HT sobre el transportador hSERT, que puede implicar alteraciones moleculares de la propia proteína en su síntesis o en su propia estructura. El siguiente paso para poder clarificar la afectación de hSERT provocada por el tratamiento con 5-HT exigía de modo indispensable realizar la determinación el efecto molecular sobre hSERT debido al tratamiento con 5-HT. Para ello inicialmente se determinó el efecto sobre la expresión de ARNm de hSERT, en células tratadas con 5-HT  $10^{-4}$  M, durante 4 días (efecto máximo).

El ARNm se determinó mediante una RT-PCR semicuantitativa partiendo del ARN total extraído de las células control y sometidas a tratamiento. El protocolo se encuentra detallado en el apartado de Material y Métodos.



**Figura 30.** Efecto del tratamiento con serotonina sobre la expresión de ARNm de hSERT. Las células fueron tratadas durante 4 días (a partir del quinto día post-confluencia) con serotonina  $10^{-4}$  M. Imagen izquierda: Producto de la RT-PCR semicuantitativa de hSERT y de la actina en células control y células tratadas con serotonina. Imagen derecha: Cuantificación de la intensidad de las bandas obtenidas a partir del producto de PCR en células control y células tratadas con 5-HT. Se expresan los resultados como densidad de las bandas hSERT/actina en unidades arbitrarias establecidas por el sistema de análisis de imagen. Los resultados corresponden a la media de 3 experimentos independientes.

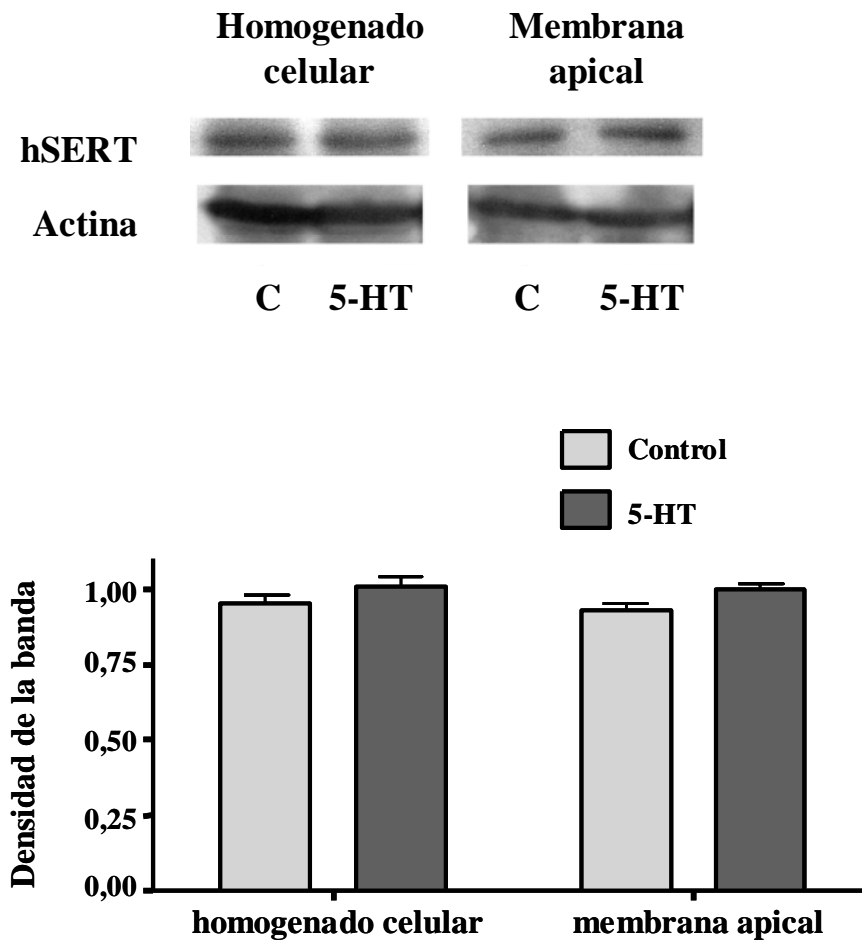
Tal y como se puede observar en los resultados obtenidos el tratamiento con 5-HT parece no alterar el nivel de ARNm (Figura 30). Ello puede indicar que el tratamiento de las células con 5-HT no afecta el proceso de transcripción del gen hSERT.

No existen estudios en los que se haya determinado la regulación de la expresión del ARNm mediado por aumento de su propio sustrato, la 5-HT. Los resultados publicados relacionados con la modulación de SERT por 5-HT (Linnet y cols. 1995) muestran que los niveles de ARNm de hSERT de cerebro de rata se reducen tras someter a los animales durante 10 días a una reducción de 5-HT mediante el tratamiento subcrónico con un bloqueante de la síntesis de 5-HT, y consideran los autores que este es un efecto adaptativo, sin conocer el mecanismo. No obstante, estos resultados se contradicen con los resultados previos de otros autores (Dewar y cols. 1992) que, con el mismo modelo, concluyen que la reducción de 5-HT en cerebro de rata no afectaba ni la capacidad máxima de unión ni la constante de disociación de [<sup>3</sup>H]paroxetina a SERT.

### **2.3. Efecto del tratamiento con 5-HT en la expresión de la proteína hSERT.**

Los resultados previos obtenidos con el tratamiento a largo plazo con serotonina parecen apuntar a un posible efecto post-transcripcional de dicha sustancia sobre hSERT. Dado que, además, el estudio cinético apunta a una alteración de la  $V_{max}$ , pareció indispensable determinar la expresión de la proteína hSERT en las células Caco-2 tras el tratamiento con serotonina.

Para medir la expresión de la proteína se llevó a cabo la técnica de SDS-PAGE, electrotransferencia e inmunodetección (western blot). Para la realización de estos experimentos, primeramente preparamos las muestras de material celular. Para ello las células Caco-2, en estadio de diferenciación correspondiente al día 9 post-confluencia (14 días tras la siembra), fueron sometidas a homogeneización, sonicación y centrifugación diferencial con el fin de purificar el material membranoso celular. Una vez cuantificada la concentración proteica de las muestras, se depositaron 60  $\mu$ g de proteína, tanto del homogenado celular, como de la membrana apical, para ser sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% con el fin de obtener su separación según el peso molecular, y posteriormente fueron transferidas a una membrana de PVDF. La membrana con las proteínas transferidas fue sometida a la acción de un anticuerpo monoclonal de ratón anti-hSERT humano (Mab Technologies, USA) a una concentración de 1:500 y posteriormente se incubó con un anticuerpo secundario ligado a un sistema que permitiera la detección por quimioluminiscencia (HRP). El desarrollo de estas técnicas se descubre en el apartado de Material y Métodos. Asimismo, las membranas fueron rehibridadas tras su dekapado con un anticuerpo anti- $\beta$ -actina para poder cuantificar la expresión de hSERT en relación a la  $\beta$ -actina, utilizada como control.



**Figura 31.** Efecto del tratamiento con 5-HT sobre la expresión de la proteína hSERT. Las células Caco-2 fueron tratadas con serotonina  $10^{-4}$  M durante 4 días tras lo que se preparó un homogenado total celular y una fracción rica en membrana apical de las células. En la parte superior se representa la captura de la imagen de la inmunodetección. Como control del depósito de proteína se determinó la expresión de la  $\beta$ -actina, sobre la que posteriormente se estimó la expresión de hSERT. Los resultados se han expresado como valor de la densidad de la banda hSERT/actina, y corresponden a la media  $\pm$  error estándar de seis determinaciones.

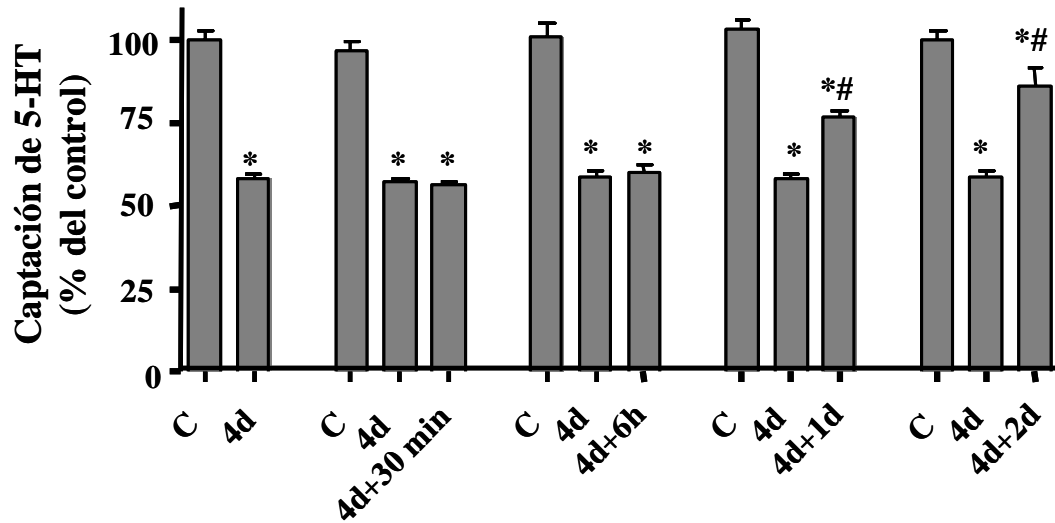
El resultado obtenido nos indica que el tratamiento con 5-HT no altera el nivel de la proteína total (homogenado celular) ni de la proteína en el borde en cepillo de las células (Figura 31). Estos resultados analizados conjuntamente con del apartado anterior (nivel de ARNm) parecen indicar que el tratamiento con 5-HT no alteraría la síntesis de hSERT. Asimismo, el hecho de que el contenido en hSERT en la membrana no se vea alterado por el tratamiento con 5-HT sugiere que la inhibición producida por este tratamiento podría estar localizado en la propia proteína transportadora cuando se encuentra en la membrana celular.

## 2.4. Reversibilidad del tratamiento con 5-HT sobre la funcionalidad de SERT

El hecho de que los resultados anteriores apunten a un efecto con repercusión en la propia molécula proteica hSERT en la membrana, sin afectar su disponibilidad, abre un amplio abanico de posibilidades en los mecanismos implicados, que pasamos a desgranar experimentalmente.

Antes de proseguir, y con el fin de caracterizar el efecto del tratamiento con 5-HT sobre hSERT, pareció interesante clarificar si el efecto a largo plazo de 5-HT sobre el transporte de 5-HT era o no reversible. Con este fin, se llevaron a cabo una serie de experimentos en los cuales se establecieron tres grupos: un grupo control, donde las células no fueron tratadas; células tratadas con serotonina  $10^{-4}$  M durante 4 días y células tratadas con serotonina durante 4 días a las que se les retiró el tratamiento a diferentes periodos de tiempo (recuperación): 30 minutos, 6 horas, 1 día y 2 días. En todos estos tipos celulares se midió la captación de 5-HT tras el tratamiento correspondiente. La recuperación se llevó a cabo adicionando a las células medio de cultivo sin serotonina. Los resultados se muestran en la Figura 32.

Tal como muestran los resultados obtenidos, y que aparecen en la Figura 32, la inhibición del transporte de 5-HT producido por el tratamiento con 5-HT va reduciéndose a medida que aumenta el tiempo de recuperación de las células, hasta alcanzar una recuperación casi total del transporte tras 2 días sin tratamiento. Por tanto, el tratamiento con serotonina no produce un daño irreversible celular que afecte el transportador hSERT y su actividad.



**Figura 32.** Estudio de la reversibilidad del tratamiento con serotonina en el transporte de 5-HT. El tiempo de tratamiento fue de 4 días a partir del quinto día después de la confluencia. Se ensayaron distintos tiempos de recuperación: 30 minutos (30 min.), 6 horas (6h), 1 día (1d) y 2 días (2d). La concentración de 5-HT que se utilizó fue  $10^{-4}$  M. En los experimentos de transporte se utilizó una concentración de 5-HT de  $2 \times 10^{-7}$  M y el tiempo de incubación fue de 6 minutos. Los resultados de la figura están indicados en % de transporte de 5-HT respecto al control. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error estándar calculada de cinco experimentos independientes. \* $p < 0,05$  respecto al control correspondiente. # $< 0,05$  respecto al valor de su correspondiente tratamiento con 5-HT (4d).

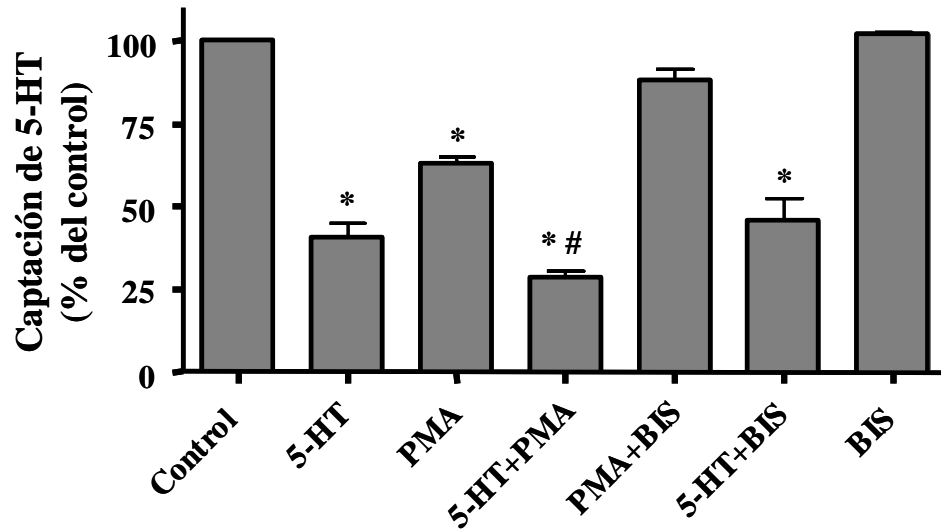
## 2.5. Papel de los segundos mensajeros intracelulares en el tratamiento con 5-HT

Uno de los mecanismos de regulación más descritos en proteínas de membrana celular es la fosforilación mediada por cinasas intracelulares. Resultados previos presentados en el presente trabajo han mostrado que los sistemas activadores del nivel de fosforilación intracelular tales como la estimulación de la PKC, el aumento de la disponibilidad de AMPc y la inhibición de las fosfatasa intracelulares producen una disminución de la actividad del transportador hSERT. Asimismo, diversos estudios, (Qian y cols. 1997; Ramamoorthy y Blakely, 1999) y los resultados previos de este trabajo, han mostrado que la activación de la PKC y del AMPc producen una disminución de la capacidad ( $V_{max}$ ) de SERT. Con el fin de poder clarificar el mecanismo intracelular por el cual el tratamiento con 5-HT afecta a la funcionalidad de hSERT, se diseñaron una serie de experimentos en los que se trató de determinar si la PKC y/o el AMPc eran mediadores de los efectos observados.

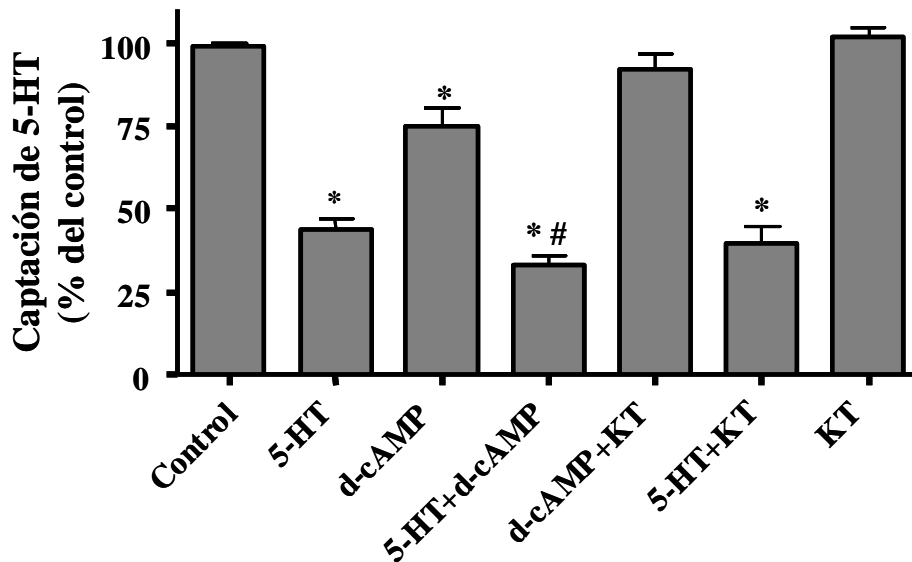
Para llevar a cabo este estudio las células Caco-2 se sometieron a un tratamiento simultáneo, durante 4 días, con serotonina ( $10^{-4}$  M) y durante 2 días con PMA ( $10^{-6}$  M), un activador de la PKC y d-AMPc ( $10^{-3}$  M), un análogo no metabolizable del AMPc, y durante 2 o 4 días con BIS II ( $2 \times 10^{-6}$  M) y KT 5720 (KT) ( $10^{-6}$  M), inhibidores respectivamente de la PKC y PKA. Los resultados se han muestran en las Figuras 33 y 34.

Los resultados obtenidos muestran que tanto el tratamiento de las células con PMA (activación de PKC), como con d-AMPc disminuyen la captación de 5-HT, y este efecto es aditivo a la reducción obtenida por el tratamiento con serotonina. Además, el efecto de la serotonina no se bloquea ni con BIS, inhibidor de la PKC, ni con KT, inhibidor de la PKA. Sin embargo, estos agentes inhibidores revierten el efecto del PMA y del d-AMPc en el transporte de 5-HT significativamente. De estos resultados se puede deducir que el tratamiento con serotonina utiliza mecanismos intracelulares independientes de la actividad de la PKC o el AMPc.





**Figura 33.** Papel de la PKC sobre el efecto del tratamiento con 5-HT en el transporte de 5-HT. Las condiciones de tratamiento fueron: 5-HT  $10^{-4}$  M (4 días); PMA  $10^{-6}$  M (2 días); 5-HT  $10^{-4}$  M (4 días) + PMA  $10^{-6}$  M (2 días); PMA  $10^{-6}$  M (2 días) + BIS  $2 \times 10^{-6}$  M (2 días); 5-HT  $10^{-4}$  M (4 días) + BIS II  $2 \times 10^{-6}$  M (4 días); BIS II  $2 \times 10^{-6}$  M (4 días). En los experimentos de transporte se utilizó una concentración de 5-HT de  $2 \times 10^{-7}$  M y el tiempo de incubación fue de 6 minutos. Los resultados se expresan como porcentaje del valor control y corresponden a la media  $\pm$  error estándar de seis determinaciones. \* $p < 0,05$  respecto al control. # $< 0,05$  respecto al valor de tratamiento con 5-HT.



**Figura 34.** Papel del AMPc sobre el efecto del tratamiento con 5-HT en el transporte de 5-HT. Las condiciones de tratamiento fueron: 5-HT  $10^{-4}$  M (4 días); d-AMPc  $10^{-3}$  M (2 días); 5-HT  $10^{-4}$  M (4 días) + d-AMPc  $10^{-3}$  M (2 días); d-AMPc  $10^{-3}$  M (2 días) + KT  $5720 \times 10^{-6}$  M (2 días); 5-HT  $10^{-4}$  M (4 días) + KT  $5720 \times 10^{-6}$  M (4 días); KT  $5720 \times 10^{-6}$  M (4 días). En los experimentos de transporte se utilizó una concentración de 5-HT de  $2 \times 10^{-7}$  M y el tiempo de incubación fue de 6 minutos. Los resultados se expresan como porcentaje del valor control y corresponden a la media  $\pm$  error estándar de seis determinaciones. \* $p < 0,05$  respecto al control correspondiente. # $< 0,05$  respecto al valor del tratamiento con 5-HT.

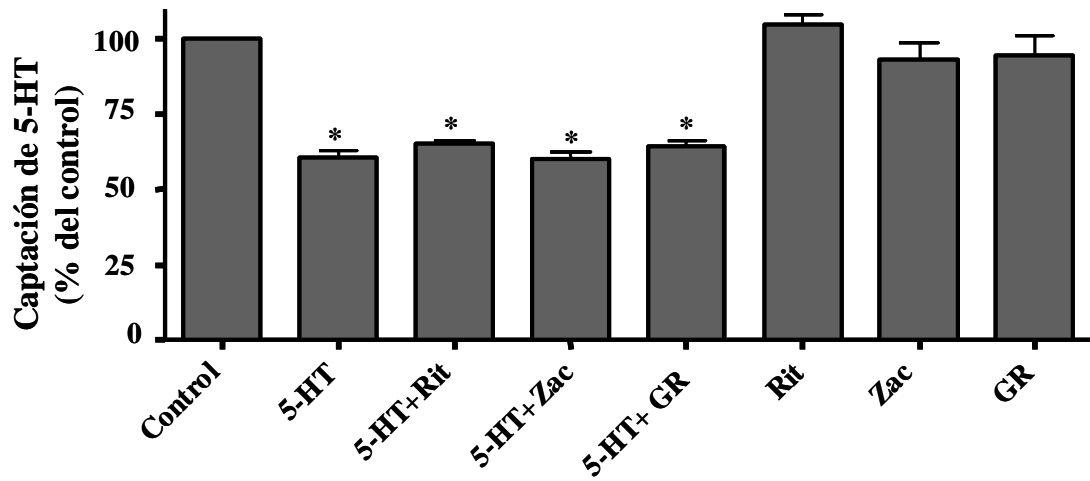
## **2.6. Papel de los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> y 5-HT<sub>4</sub> en el efecto producido por el tratamiento con serotonina sobre hSERT**

Los resultados obtenidos hasta el momento indican que el tratamiento con serotonina reduce la actividad de hSERT y dicho efecto parece deberse a una alteración de la proteína de la membrana que se produce por mecanismos independientes de la vía fosforilativa de la PKC y del AMPc.

La actividad serotoninérgica se debe a la interacción de la 5-HT con sus receptores específicos. Han sido descritas en la bibliografía la expresión y función de los receptores 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> y 5-HT<sub>4</sub> en el epitelio intestinal (Salvador y cols. 1997; Alcalde y cols. 2000). Dado que las células Caco-2 son de tipo enterocitario, cabía la posibilidad de que estos receptores pudieran estar mediando los efectos observados del tratamiento con 5-HT.

Con el fin de esclarecer esta posibilidad se realizaron una serie de experimentos en los que se determinó el efecto del tratamiento de 5-HT en presencia de ritanserina, zacoprida o GR 113808 (antagonistas de 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> y 5-HT<sub>4</sub> respectivamente). Para ello las células fueron tratadas durante 4 días con 5-HT y ritanserina, zacoprida o GR 113808, y posteriormente se midió la captación de 5-HT.

Los resultados representados en la Figura 35 muestran que la inhibición producida por el tratamiento con 5-HT no se revierte por el tratamiento simultáneo con ninguno de los antagonistas ensayados. Asimismo, ninguno de los tratamientos realizados con los tres antagonistas afectó significativamente la captación de 5-HT en las células. Por lo tanto, podemos decir que el efecto producido por el tratamiento con serotonina no parece estar mediado a través de los receptores 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> y 5-HT<sub>4</sub>.



**Figura 35.** Estudio de la implicación de los receptores 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> y 5-HT<sub>4</sub> en el efecto producido por el tratamiento con 5-HT. Las células fueron tratadas 4 días con 5-HT 10<sup>-4</sup> M (5-HT) y/o ritanserina (Rit), zacoprida (Zac) o GR 11808 (GR) 10<sup>-9</sup> M. En los experimentos de transporte se utilizó una concentración de 5-HT de 2x10<sup>-7</sup> M y el tiempo de incubación fue de 6 minutos. Los resultados se expresan como % del valor control y corresponden a la media ± error estándar de 5 determinaciones independientes. \*p<0,05 comparado con el valor control.

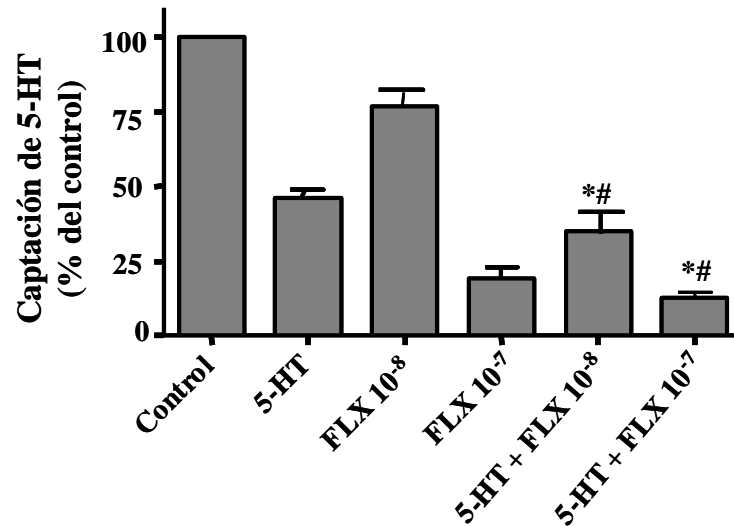
## 2.7. Efecto del tratamiento con fluoxetina y citalopram sobre la actividad de hSERT en células tratadas con 5-HT

Los resultados obtenidos hasta el momento indican que el tratamiento con 5-HT produce inhibición de la actividad de hSERT, que es reversible y parece deberse a una alteración que afecta al transportador sin producirse modificación ni en la síntesis de la proteína ni en su disponibilidad en la membrana. Asimismo, la alteración de la proteína en la membrana parece ser independiente de la actividad fosforilativa de la PKC o la mediada por AMPc.

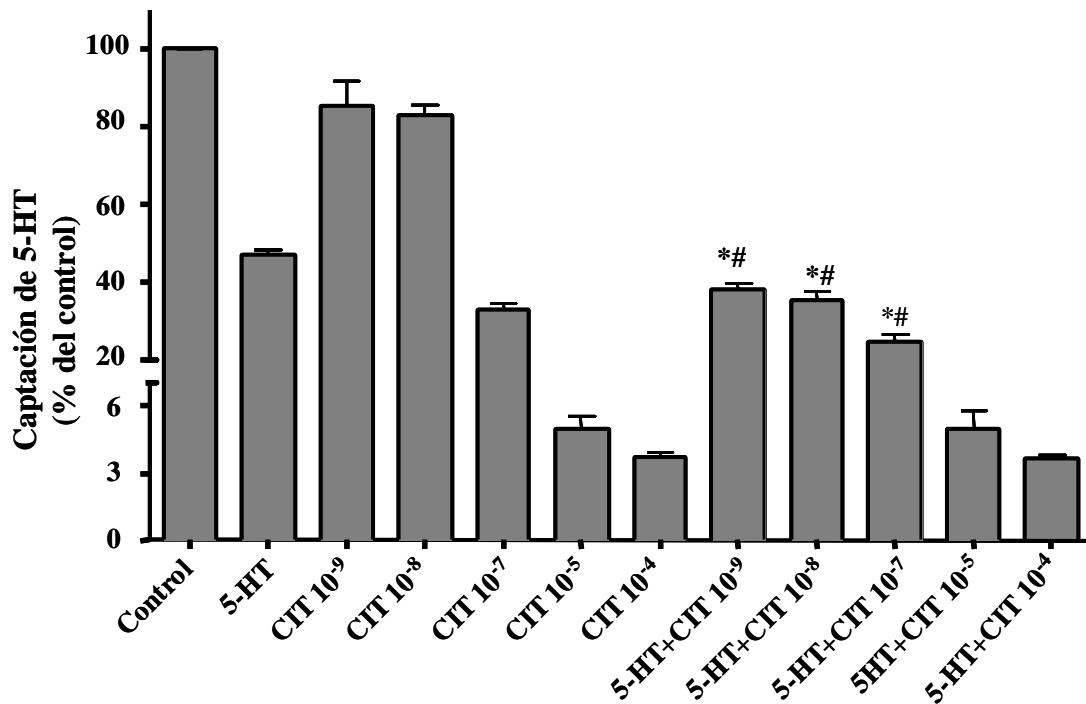
Diversos estudios llevados a cabo en tejido neuronal cerebral y en membranas de plaquetas han demostrado la existencia de al menos dos sitios de unión en la proteína SERT: un sitio primario de alta afinidad, que permite el transporte de 5-HT, y un sitio alostérico de baja afinidad, que modula la unión de ligandos en el sitio de alta afinidad y, que en consecuencia, controla el transporte de 5-HT (Plenge y Mellerup, 1985; Plenge y cols. 1991; Wennogle y Meyerson, 1985). La 5-HT puede unirse a ambos sitios (Neubauer y cols. 2006), actuando como un modulador alostérico para la unión de numerosos ligandos de alta afinidad de SERT (Chen y cols. 2005). Dentro de los SSRI, se ha descrito que la fluoxetina no interacciona con el sitio alostérico, sin embargo el citalopram sí lo hace con ambos sitios de unión (Chen y cols. 2005), el de alta afinidad y el alostérico, de baja afinidad.

Por lo tanto, y teniendo en cuenta los resultados del presente trabajo y los datos aportados por otros autores, se puede plantear la posibilidad de que la 5-HT actúe como un auto-regulador alostérico en hSERT, que module el transporte de sí mismo. Un dato interesante que hay que considerar es el hecho de que el tratamiento con 5-HT sólo produce efecto a elevada concentración de 5-HT,  $10^{-4}$  M, valor alejado de la  $K_t$  obtenida para el transporte de 5-HT mediado por hSERT (rango entre  $2-6 \times 10^{-7}$  M).

Con el fin de clarificar esta posibilidad se han llevado a cabo una serie de experimentos en los que se ha medido la captación de 5-HT en células sometidas durante dos días, bien al tratamiento con 5-HT  $10^{-4}$  M y/o simultáneamente con fluoxetina  $10^{-8}$  y  $10^{-7}$  M, o bien al tratamiento con 5-HT  $10^{-4}$  M y/o con citalopram  $10^{-9}$ - $10^{-7}$  M o  $10^{-5}$ - $10^{-4}$  M. En el primer caso se pretende estudiar si el efecto de 5-HT implica el sitio de alta afinidad, y en el segundo si implica a ambos sitios de unión, de alta y baja afinidad. Los resultados se muestran en las Figuras 36 y 37.



**Figura 36.** Efecto del tratamiento con fluoxetina en la captación de 5-HT en células tratadas con 5-HT. En condiciones control, las células no son tratadas. En las condiciones de tratamiento, las células fueron tratadas con 5-HT  $10^{-4}$  M durante dos días y/o fluoxetina ( $10^{-7}$  o  $10^{-8}$  M) durante 2 días. La concentración de 5-HT en la medida de transporte fue de  $2 \times 10^{-7}$  M y el tiempo de incubación fue de 6 minutos. Los resultados corresponden al % de captación de 5-HT respecto al control y se expresan como la media  $\pm$  error estándar calculada de 5 experimentos independientes. \* $p < 0,05$  respecto al valor 5-HT. # $< 0,05$  respecto al valor de fluoxetina correspondiente.



**Figura 37.** Efecto del tratamiento con citalopram en el transporte de 5-HT en células tratadas con 5-HT. En condiciones control, las células no son tratadas y el tratamiento con 5-HT fue de  $10^{-4}$  M durante dos días. Las células fueron tratadas con citalopram (CIT)  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-5}$  o  $10^{-4}$  M durante dos días. En los experimentos de transporte se utilizó una concentración de 5-HT de  $2 \times 10^{-7}$  M y el tiempo de incubación fue de 6 minutos. Los resultados están indicados en % de transporte de 5-HT respecto al control, y se expresan como la media  $\pm$  error estándar calculada de 5 experimentos independientes. \* $p < 0,05$  respecto al valor de 5-HT. # $< 0,05$  respecto al valor de citalopram correspondiente.

Los resultados nos indican que tanto el tratamiento con fluoxetina como el tratamiento con 5-HT reducen significativamente la captación de 5-HT y además ambos efectos se sumaron al simultanear las dos sustancias en el tratamiento. El efecto aditivo parece indicar que ambos tratamientos actúan por distintos mecanismos. Como la fluoxetina actúa sobre hSERT únicamente en el sitio de alta afinidad, cabe pensar que la 5-HT, a alta concentración podría estar actuando sobre el sitio alostérico de hSERT. Además, si la 5-HT actúa desde este sitio alostérico, podría haber afectado la unión de fluoxetina en el sitio de alta afinidad, pero este tipo de experimento no permite discernir ni la cinética ni el momento de unión. Lo cierto es que el efecto del tratamiento con 5-HT se ve incrementado por el efecto de fluoxetina, y ello indica que la fluoxetina ejerce su efecto también y por distinto mecanismo que la 5-HT.

Para corroborar la posibilidad de que 5-HT actúe desde el sitio alostérico, se realizaron los experimentos con citalopram. Los resultados muestran que cuando la concentración de citalopram es baja ( $10^{-9}$ - $10^{-7}$  M), situación en la cual sólo presenta afinidad por el sitio primario de alta afinidad de hSERT, el efecto del tratamiento con 5-HT era aditivo, indicando de nuevo la posibilidad de que la 5-HT actúe desde el sitio alostérico, sumando su efecto al del citalopram. Sin embargo, cuando la concentración de citalopram era alta  $10^{-5}$  y  $10^{-4}$  M, situación en la cual existe afinidad también por el sitio alostérico, el efecto no se adicionada al del tratamiento con 5-HT. Con estos resultados y los obtenidos con fluoxetina podría plantearse el hecho de que el tratamiento con 5-HT esté afectando al sitio alostérico para alterar el transporte de 5-HT en el sitio de alta afinidad.

Además de la información obtenida acerca de la posible implicación del sitio alostérico en el efecto inhibitor del tratamiento con 5-HT, el estudio del efecto simultáneo con los SSRIs, fluoxetina y citalopram, permite conocer el efecto global sobre hSERT que se produce al aplicar un tratamiento con estos fármacos, donde coexisten la presencia del fármaco y el aumento de la disponibilidad de 5-HT, como consecuencia del efecto de los SSRIs. Por tanto, y a este respecto, estos resultados también informan de que la inhibición real de hSERT es mayor como suma de ambos efectos, lo cual incide en aumentar aún más la disponibilidad de 5-HT en el medio extracelular.

## 2.8. Discusión general

El objetivo de este apartado del trabajo ha sido el estudio del tratamiento a largo plazo con 5-HT sobre la actividad y expresión de hSERT. De este modo observaremos la afectación serotoninérgica mediada por el aumento de la disponibilidad extracelular de 5-HT.

Este estudio se ha llevado a cabo en las células Caco-2, en las que, tras como se muestra en el primer apartado, se ha caracterizado el transporte de 5-HT mediado por hSERT y se ha determinado su expresión.

Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con 5-HT disminuye la actividad de hSERT. Este efecto es dependiente del tiempo del tratamiento, alcanzando una respuesta máxima al cabo de un día, y de la concentración de 5-HT, siendo significativa a altas concentraciones ( $10^{-6}$ - $10^{-4}$  M), y obteniendo el efecto mayor a una concentración de 5-HT de  $10^{-4}$  M. Esta concentración se encuentra alejada del valor de la  $K_t$  de hSERT (del orden de  $10^{-7}$  M), sin embargo, se encuentra en el rango de la 5-HT fisiológica. Así, en un estudio previo realizado en cerebro de rata (Bunin y Wightman, 1998) se realizó el cálculo de la concentración de 5-HT cuando alcanzaba el receptor, y se estimó que llegaba a ser 6 mM. Sin embargo, inmediatamente tras la liberación en el espacio extracelular alcanza un valor máximo de  $5,5 \times 10^{-8}$  M. De modo similar, en nuestro cultivo celular la administración del tratamiento se realizaba una vez al día, lo cual supone la disponibilidad de alta concentración de 5-HT en el momento de adicionar el tratamiento. Sin embargo posteriormente la 5-HT penetra en las células y va desapareciendo progresivamente del medio de cultivo. Por lo tanto, el modelo de tratamiento con 5-HT no se alejaría de una situación fisiológica.

Para profundizar más en las características funcionales de este efecto inhibitorio, realizamos un estudio cinético para poder determinar las constantes cinéticas,  $V_{max}$ ,  $K_t$  y  $K_d$ . Los resultados muestran que el tratamiento con 5-HT durante 4 días disminuye la  $V_{max}$ , y produce aumento de la  $K_t$ . Por lo tanto, parece que el tratamiento con 5-HT reduciría tanto a la capacidad como a la afinidad de hSERT.

Estos resultados abren muchas posibilidades respecto a los procesos que pueden estar implicados en el efecto inhibitorio observado. Por ello, el primer aspecto que se ha abordado es la alteración del proceso de síntesis y de la disponibilidad de hSERT en las células después del tratamiento. Los resultados han mostrado que ni la síntesis ni la

expresión de la proteína hSERT en la célula, en general, ni en la membrana, en particular, parecen estar afectados por el tratamiento con 5-HT, lo cual apunta a un efecto sobre la propia molécula ubicada en la membrana. El hecho de que la alteración de la  $V_{max}$  no vaya acompañada de una afectación de la disponibilidad de transportadores en la membrana ha sido descrito también por otros investigadores en el caso de SERT (Ramamoorthy y cols. 2007).

La modulación de la expresión génica de SERT mediada por la propia 5-HT ha sido previamente estudiada por otros autores (Linnet y cols. 1995) que concluyen que la expresión de SERT en cerebro de rata disminuye en situaciones de reducción subcrónica de 5-HT. Sin embargo, estos resultados se contradicen con los de otros autores (Dewar y cols. 1992) que, con el mismo modelo, concluyen que la reducción de 5-HT en cerebro de rata no afecta ni la capacidad máxima de unión ni la constante de disociación de [ $^3$ H]paroxetina a SERT. En el presente trabajo se trata de un aumento de 5-HT y tampoco se ha obtenido alteración de la expresión molecular de hSERT.

A pesar de que las condiciones de tratamiento de las células, tal como hemos mencionado anteriormente, pueden ser consideradas fisiológicas, y dado que el efecto parece estar situado sobre la propia molécula de hSERT, pareció importante determinar que el tratamiento con 5-HT no producía efecto irreversible sobre la función de hSERT. Los resultados han mostrado que las células recuperan la actividad de hSERT tras varios días sin tratamiento, lo cual parece descartar esta posibilidad.

Siguiendo con la búsqueda de mecanismos intracelulares que pudieran estar implicados en la inhibición de la actividad de hSERT, se planteó la posibilidad de que determinados procesos de fosforilación mediados por cinasas intracelulares, participaran en dichos mecanismos. Por ello se estudiaron dos posibles candidatos: la PKC y la vía fosforilativa del AMPc. Estudios previos han demostrado que hSERT es una proteína con grupos serina/treonina que se pueden fosforilar por PKC y PKA y, de hecho, la fosforilación por medio de estas cinasas ha mostrado ser un mecanismo de regulación de la actividad de hSERT (Ramamoorthy y Blakely, 1999; Qian y cols. 1997). Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo parecen excluir la actividad de estas cinasas como mediadoras del efecto producido por el tratamiento de 5-HT sobre hSERT.



Otra posibilidad dentro de la mediación del efecto de 5-HT podría ser la participación de receptores serotoninérgicos, que tras la unión de la 5-HT durante el tratamiento, desencadenarían mecanismos intracelulares que pudieran ser responsables de los efectos observados. Tres son los tipos de receptores que fundamentalmente se han descrito en el epitelio intestinal: 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> y 5-HT<sub>4</sub> (Salvador y cols. 1997; Alcalde y cols. 2000). Se intentó determinar su posible papel mediante antagonistas específicos a los mismos. Los resultados, de nuevo, parecen indicar que ninguno de estos receptores estaría implicado en el efecto inhibitorio de hSERT producido por el tratamiento de 5-HT.

Los resultados hasta el momento obtenidos indican que el efecto del tratamiento con 5-HT afecta a la propia molécula hSERT, alterando su funcionalidad. Sin embargo, este efecto no parece estar mediado por la fosforilación de la proteína hSERT mediada por PKC y AMPc, ni por la mediación de receptores serotoninérgicos. Sin embargo, el efecto es reversible, lo cual apuntaría a un efecto modulador fisiológico. Todo ello llevó a plantear la posibilidad de un efecto directo sobre la molécula hSERT en sitios específicos reconocidos por ligandos, como la 5-HT.

En este sentido, diversos estudios realizados en cerebro y plaquetas, han demostrado que existen al menos dos sitios de unión en la proteína SERT: el primero, de alta afinidad, que media el transporte de 5-HT y el segundo, un sitio alostérico de baja afinidad, que regula la unión de los ligandos al primer sitio de unión (Plenge y Møllerup, 1985; Plenge y cols. 1991; Wennogle y Meyerson, 1985). Se ha demostrado que la 5-HT tiene afinidad por los dos sitios de unión (Neubauer y cols. 2006) y que actúa como un efector alostérico ante numerosos ligandos de alta afinidad de SERT (Chen y cols. 2005). Cabría la posibilidad de que la 5-HT pudiera unirse a estos sitios y actuar como un efector autorregulador alostérico modificando el transporte. En nuestro estudio la 5-HT reduce su propio transporte después del tratamiento a alta concentración ( $10^{-4}$  M), lejos del valor descrito para la  $K_t$  (del orden de  $10^{-7}$  M). Este hecho sugiere que el efecto de la 5-HT puede que esté mediado por la acción del sitio de baja afinidad de hSERT.

Esta posibilidad fue estudiada mediante experimentos en los que se realizó tratamiento simultáneo con 5-HT y/o fluoxetina o citalopram, y los resultados han sido bastante clarificadores. El citalopram presenta afinidad por los dos sitios mencionados

anteriormente, el sitio alostérico y el sitio donde se media el transporte, mientras que la fluoxetina no presenta ningún efecto alostérico (Chen y cols. 2005).

Nuestros resultados muestran que el efecto del tratamiento con 5-HT es aditivo al efecto inhibitorio ejercido por la fluoxetina a cualquier concentración. Sin embargo, en el caso del citalopram, sólo a baja concentración de citalopram ( $10^{-7}$  M) es aditivo el efecto de la 5-HT. Con estos resultados podemos concluir que la actividad de hSERT es inhibida mediante el tratamiento con 5-HT, el cual podría actuar directamente en la proteína hSERT alterando su funcionalidad, y cabría plantear la posible implicación del sitio de unión de baja afinidad de hSERT en el efecto del tratamiento con 5-HT, obteniendo de este modo un efecto alostérico.

En resumen, el tratamiento con 5-HT produce una inhibición de la actividad de SERT mediante un mecanismo independiente al de la transcripción, síntesis de proteínas o procesos post-traduccionales. Este efecto podría ser consecuencia de la acción sobre la propia molécula transportadora SERT.

Además de la aportación en el conocimiento de la regulación de hSERT, estos resultados tienen relevancia fisiológica y terapéutica en cuanto a la regulación de la actividad de hSERT, y pueden ayudar a aclarar la respuesta del sistema serotoninérgico después de un tratamiento a largo plazo con drogas que aumentan la disponibilidad de 5-HT en el medio extracelular, lo que es conocido como el síndrome serotoninérgico.

### **IV.3. ESTUDIO DE LA REGULACIÓN FÁRMACOLÓGICA DE hSERT MEDIADA POR EL TRATAMIENTO A LARGO PLAZO DE LAS CÉLULAS CACO-2 CON FLUOXETINA.**

La serotonina y las alteraciones de la actividad serotoninérgica del sistema nervioso central (Mann, 2003) han sido consideradas como uno de los factores responsables de las patologías asociadas a trastornos de la conducta en el hombre. Asimismo, ha sido ampliamente descrito que trastornos crónicos inflamatorios e infecciosos del tracto gastrointestinal, como el IBD (Inflammatory bowel disease, enfermedad inflamatoria intestinal) y el IBS (Irritable Bowel Syndrome, síndrome del colon irritable), presentan una muy significativa afectación del sistema serotoninérgico gastrointestinal (Linden y cols. 2003). Por esta causa, gran parte de la terapia farmacológica utilizada en estas patologías es dirigida sobre este sistema serotoninérgico. El transportador de serotonina, es una de las dianas más importantes para diversas moléculas farmacológicas en tratamientos de alteración de la conducta (Blier y Szabo, 2005) y para enfermedades gastrointestinales (Baker, 2005). Dentro del grupo de las moléculas con efecto farmacológico serotoninérgico se encuentran los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRIs) (Frazer, 1997).

Los SSRIs inhiben rápidamente la captación de 5-HT, lo cual proporciona un aumento inmediato de la disponibilidad de 5-HT en el medio extracelular. Sin embargo, el efecto máximo terapéutico se obtiene después de semanas o incluso meses de tratamiento repetido, lo cual sugiere que además de la inhibición de la recaptación de serotonina, se producen otros cambios adaptativos a largo plazo que contribuyen a los efectos terapéuticos.

Diversos grupos de investigación han intentado determinar el efecto agudo de los inhibidores específicos de la recaptación de serotonina (SSRIs) sobre SERT. Así, Ramamoorthy y Blakely (1999), por ejemplo, demostraron que la paroxetina y el citalopram modificaban el nivel de la fosforilación de SERT mediado por la PKC.

En lo que se refiere a los efectos crónicos de los antidepresivos, la mayor parte de los estudios han ido encaminados a estudiar el efecto sobre las autorreceptores o los receptores post-sinápticos serotoninérgicos, y las respuestas que ellos generan (Piñeyro y cols. 1994; Blier y Bouchard, 1994; Auerbach y Hjorth, 1995). El efecto a largo plazo de los SSRI sobre la funcionalidad de SERT no ha sido estudiado con profundidad (Martel y cols. 2004; Piñeyro y cols. 1994 y Scholss y Henn, 2004), aunque estudios recientes apuntan la importancia que puede tener el tratamiento a largo plazo con SSRI sobre la recaptación de 5-HT mediada por SERT (Frazer y cols. 1999).

Los resultados obtenidos en diversos estudios realizados “in vivo”, con tratamientos a largo plazo con SSRI, parecen ser bastante confusos. Así, se han realizado diversos estudios para determinar el efecto de los antidepresivos sobre la disponibilidad de SERT y sobre sus niveles de mRNA. Muchos resultados muestran un aumento de los parámetros (Hrdina y Vu, 1993; Lopez y cols. 1994), otros una disminución (Lesch y cols. 1993; Watanabe y cols. 1993; Kuroda y cols. 1994; Piñeyro y cols. 1994; Neumaier y cols. 1996) y otros en cambio, no detectan alteración alguna (Cheetham y cols. 1993; Burnet y cols. 1994; Spurlock y cols. 1994; Gobbi y cols. 1997).

La fluoxetina es una de las moléculas más utilizadas como inhibidor de la recaptación de serotonina para tratar enfermedades psiquiátricas. Asimismo, se ha visto que en aquellas patologías producidas fuera del sistema nervioso central, en las cuales se encuentra involucrada la funcionalidad de la serotonina, el tratamiento con SSRI también mejora la sintomatología. Tal es el caso del IBS en el cual el tratamiento con antidepresivos ha presentado un beneficio inequívoco para algunos pacientes (Pace y cols. 1995) y no por su efecto antidepresivo, sino por efectos directos sobre el sistema nervioso entérico y la fisiología gastrointestinal, debidos a su condición de inhibidores de la recaptación de serotonina (Gorard y cols. 1995).

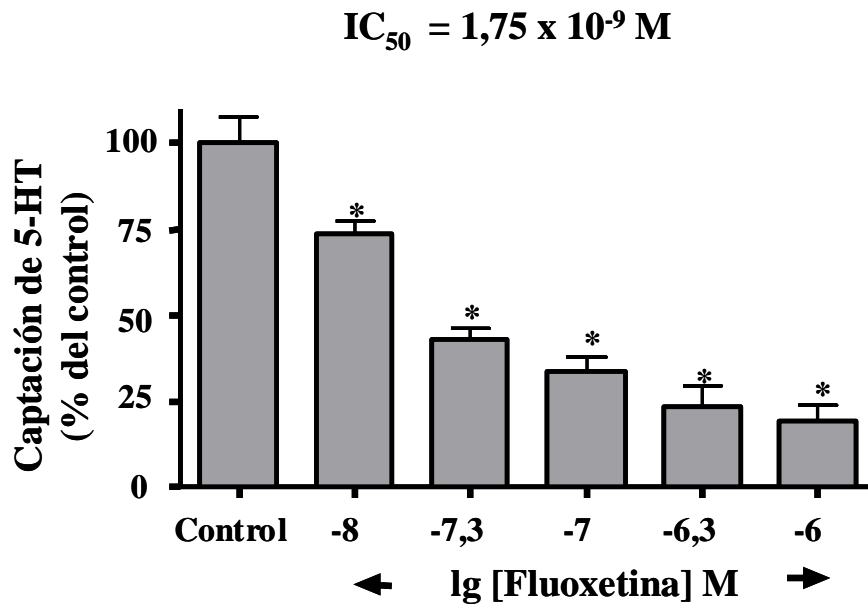
Dado que los efectos del tratamiento a largo plazo con SSRI sobre la función y expresión de hSERT no ha sido estudiada en profundidad, y los datos que existen al respecto parecen ser contradictorios, nos planteamos estudiar el efecto que, el tratamiento a largo plazo con fluoxetina, produce sobre el transportador hSERT en las células Caco-2, para lo cual se han desarrollado los apartados experimentales que a continuación se describen y que se enmarcan dentro del objetivo 5 planteado en el presente trabajo.

### **3.1. Efecto del tratamiento a largo plazo con fluoxetina sobre la actividad de hSERT**

El hecho de que las células Caco-2 expresen de modo significativo el transportador hSERT y sea funcional a lo largo de sucesivos días posteriores a la confluencia, tal como hemos demostrado anteriormente, nos ha permitido diseñar experimentos en los cuales se puede estudiar el efecto del tratamiento crónico de fluoxetina sobre el transportador hSERT, mediante su adición al medio de incubación y tras haber seleccionado el estadio de diferenciación celular de partida y la duración del tratamiento. La fluoxetina es un inhibidor específico del transporte de 5-HT mediado por SERT (SSRI) que, como ya hemos mostrado en experimentos anteriores, inhibe el transporte de 5-HT al ser adicionada al medio de transporte.

En primer lugar nos propusimos estudiar el efecto del tratamiento sobre la captación de 5-HT en las células Caco-2 con diferentes concentraciones de fluoxetina (rango comprendido entre  $10^{-8}$  y  $10^{-6}$  M). El tratamiento empezó el día 5 post-confluencia (décimo día de cultivo) y duró 4 días. Transcurridos los días de tratamiento, las células se encontraban en un nivel de diferenciación correspondiente al día 9 post-confluencia, y el experimento de transporte se llevó a cabo según el método indicado en el apartado de Material y Métodos. Debemos hacer mención especial al hecho de que ni el medio de cultivo sin suero fetal, que se suministraba a las células 6 horas antes del experimento de transporte, ni el tampón I con el que se incuban las células 30 minutos a 37°C, contenían fluoxetina. Asimismo, y en el momento de realizar la medida de transporte, el medio de incubación estaba también libre de fluoxetina. Los resultados obtenidos son mostrados en la Figura 38 correspondiente.

Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con fluoxetina disminuye significativamente el transporte de 5-HT a todas las concentraciones de fluoxetina ensayadas. Estos resultados indican, por un lado, que aunque la fluoxetina de un modo directo es un inhibidor del transporte de 5-HT mediado por hSERT, también es capaz de ejercer alteraciones en la célula capaces de inhibir dicho transporte, pero en este caso no se trataría de un efecto por contacto directo de la fluoxetina con el transportador en el momento de realizar el transporte de 5-HT, sino que se podría tratar de un efecto diferido previo, dado que la fluoxetina no estaba presente en el medio de transporte ni en el medio de cultivo desde 6 horas antes.



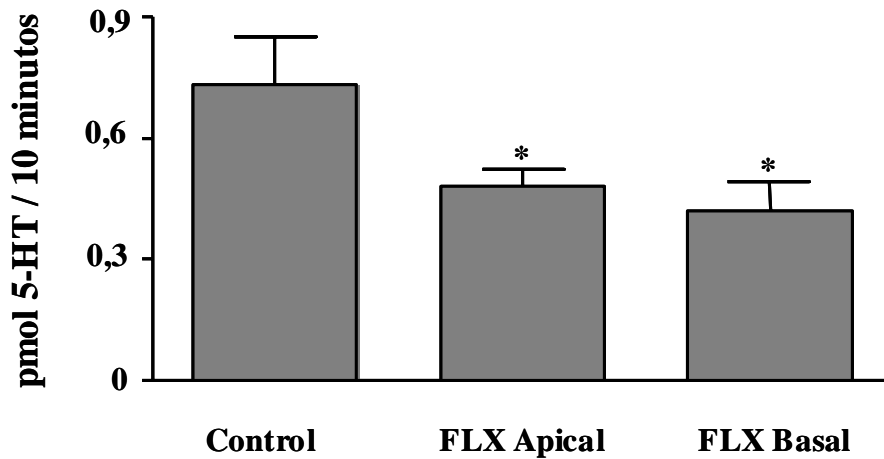
**Figura 38.** Estudio del efecto del tratamiento de las células Caco-2 con diferentes concentraciones de fluoxetina sobre el transporte de 5-HT. Las células fueron tratadas desde el día 5 hasta el día 9 post-confluencia. Las concentraciones de fluoxetina se encontraban en un rango entre  $10^{-8}$  y  $10^{-6}$  M. La concentración de 5-HT fue  $2 \times 10^{-7}$  M. Tiempo de incubación = 6 minutos. Los resultados corresponden a 4 experimentos y se han expresado como la media  $\pm$  error estándar del porcentaje del transporte en condiciones control. \* $p < 0,05$  comparado con el valor control.

Asimismo se detecta una gradación en la inhibición, que es mayor a medida que la concentración de fluoxetina con la que se trataron las células es mayor, llegando a una inhibición del 80% para una concentración de fluoxetina  $10^{-6}$  M. Se calculó el valor de  $IC_{50}$ , que se muestra en la Figura 38.

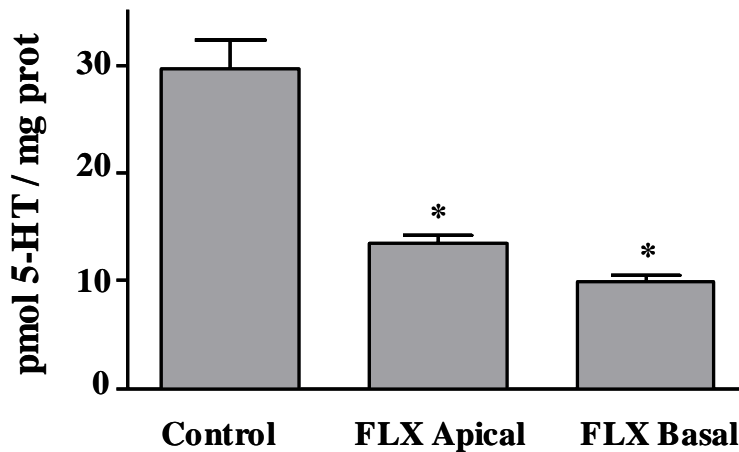
Con el fin de caracterizar en mayor profundidad el efecto del tratamiento con fluoxetina sobre hSERT, se realizaron experimentos de medida del flujo apical-basal de 5-HT en células Caco-2 tratadas 4 días con fluoxetina  $10^{-7}$  M, adicionando la fluoxetina en el lado apical o en el lado basal. Con estos experimentos se pretendía, además de medir el efecto sobre el flujo transepitelial de 5-HT, determinar si la fluoxetina requiere estar en contacto con el borde membranoso apical para ejercer su inhibición sobre el transporte de 5-HT.

Los resultados se representan en la Figura 39, y muestran que el tratamiento con fluoxetina tanto administrada desde lado apical como desde el lado basal, produce una reducción significativa del flujo de 5-HT apical-basal. Estos resultados sugieren que la fluoxetina no ejerce un efecto directo sobre hSERT aunque no podemos descartar que las moléculas atraviesen la barrera epitelial. Además, esta inhibición tiene repercusión en

la acumulación celular de 5-HT, representada en la Figura 40, resultando significativamente disminuida tanto cuando es añadido en el lado apical, como en el basal, sugiriendo que el efecto de la fluoxetina se localiza sobre hSERT del borde apical.



**Figura 39.** Efecto del tratamiento con fluoxetina sobre el flujo apical-basal de 5-HT, en placas bicompartimentales. Las células fueron tratadas 4 días con fluoxetina  $10^{-7}$  M, bien en el compartimento apical o en el basal. Se utilizó una concentración de 5-HT de  $1 \times 10^{-7}$  M y los flujos se midieron cada 10 minutos. Los resultados se expresan en pmol de 5-HT / 10 minutos y corresponden a la media  $\pm$  error estándar de 3 experimentos independientes. \* $p < 0,05$  comparado con el valor control.



**Figura 40.** Efecto del tratamiento con fluoxetina sobre la acumulación de 5-HT medida en placas bicompartimentales. Las células fueron tratadas 4 días con fluoxetina  $10^{-7}$  M, bien en el compartimento apical o en el basal. Se utilizó una concentración de 5-HT de  $1 \times 10^{-7}$  M y los flujos se midieron cada 10 minutos. Se midió la acumulación de 5-HT desde el lado apical al interior celular. Los resultados se expresan como pmol de 5-HT / mg proteína y corresponden a la media  $\pm$  error estándar de 3 experimentos independientes. \* $p < 0,05$  comparado con el valor control.

Con el fin de descartar posibles alteraciones de la resistencia eléctrica transepitelial producida por el tratamiento con fluoxetina, se determinó este parámetro mediante un sistema de medida de resistencia eléctrica (Millicell-ERS) tal como se ha indicado en el apartado de Material y Métodos. Los resultados obtenidos mostrados en la Tabla 6 indican que el tratamiento con fluoxetina  $10^{-7}$  M durante 4 días no afecta la resistencia eléctrica transepitelial.

**Tabla 6.** Medida de la resistencia transepitelial en células Caco-2. Efecto del tratamiento con fluoxetina  $10^{-7}$  M durante 4 días.

	$\Omega/\text{cm}^2$
<b>Control</b>	$208,7 \pm 4,5$
<b>Fluoxetina apical</b>	$206,7 \pm 5,8$
<b>Fluoxetina basal</b>	$202,7 \pm 1,9$



### **3.2. Estudio del efecto del tratamiento con fluoxetina sobre la funcionalidad e integridad de las células Caco-2.**

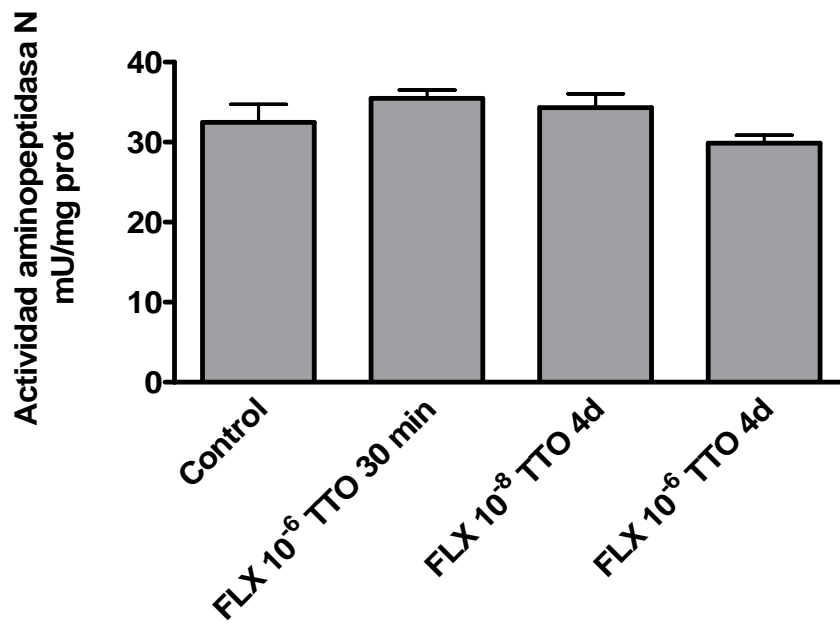
El epitelio intestinal, y más concretamente los enterocitos, es el encargado de finalizar la digestión de moléculas proteicas ingeridas y parcialmente digeridas por proteasas gástricas (pepsina) o pancreáticas. En la membrana del borde en cepillo de los enterocitos se ubican entre otros, peptidasas encargadas de romper los enlaces peptídicos y liberar aminoácidos, dipéptidos o tripéptidos, aptos para ser transportados por el borde en cepillo mediante sistemas específicos de transporte. Una de estas peptidasas es la aminopeptidasa N.

Los resultados mostrados en el apartado anterior muestran que el tratamiento con fluoxetina durante 4 días reduce la captación de 5-HT en las células Caco-2 mediada por hSERT, siendo este efecto muy significativo a la concentración de  $10^{-6}$  M, eligiéndose esta concentración para valorar los efectos máximos de la fluoxetina.

Dado que la fluoxetina es una sustancia de tipo farmacológico que en el presente trabajo se adiciona durante varios días con el fin de determinar efectos a largo plazo, nos pareció indispensable, determinar si dicho tratamiento farmacológico al que se ha sometido a las células produce algún tipo de alteración en la propia fisiología de las células Caco-2 que pudiera interferir o desvirtuar el efecto observado sobre hSERT.

Con este fin se plantearon una serie de experimentos en los que se determinó la actividad de la enzima aminopeptidasa N, según se describe en el apartado de Material y Métodos. Se midió la actividad aminopeptidasa N de las células Caco-2 sometidas al tratamiento durante 4 días con dos concentraciones de fluoxetina,  $10^{-8}$  y  $10^{-6}$  M, y también se comparó con el efecto agudo (30 minutos) de la fluoxetina  $10^{-6}$  M.

Los resultados obtenidos se representan en la Figura 41 y muestran que ninguna de las condiciones de tratamiento con fluoxetina altera la actividad de la aminopeptidasa N. Especialmente interesante es el hecho de que la concentración de fluoxetina ( $10^{-6}$  M) y la duración de tratamiento (4 días) a las cuales se obtuvo el efecto más significativo sobre hSERT, no muestra alteración de la actividad de la aminopeptidasa N.

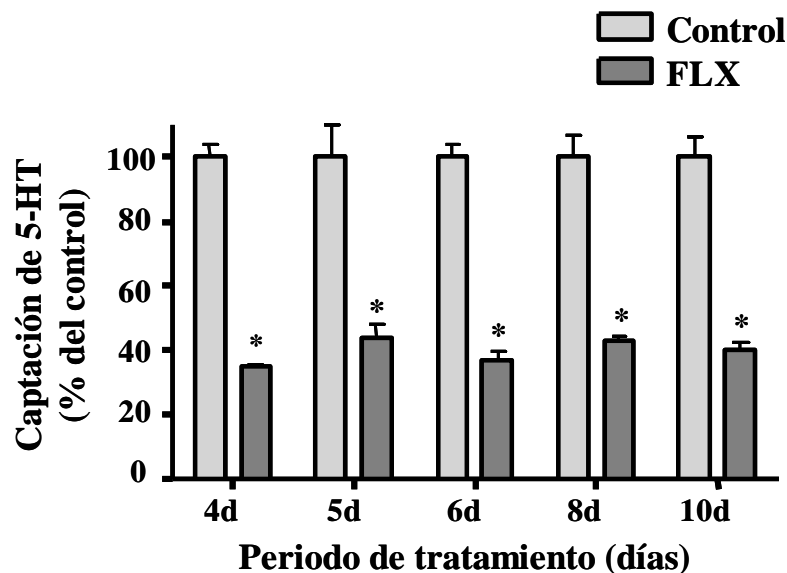


**Figura 41.** Efecto de la fluoxetina sobre la actividad de la aminopeptidasa N. Se han ensayado dos concentraciones de fluoxetina (FLX)  $10^{-8}$  y  $10^{-6}$  M; se han seleccionado dos periodos de tratamiento, agudo (30 minutos) y a largo plazo (4 días). Los resultados se expresan como actividad específica en mU / mg proteína y son la media  $\pm$  error estándar de 4 experimentos independientes.

### 3.3. Estudio del efecto de la fluoxetina a diferentes tiempos de tratamiento y determinación de la reversibilidad del efecto del tratamiento de fluoxetina sobre SERT

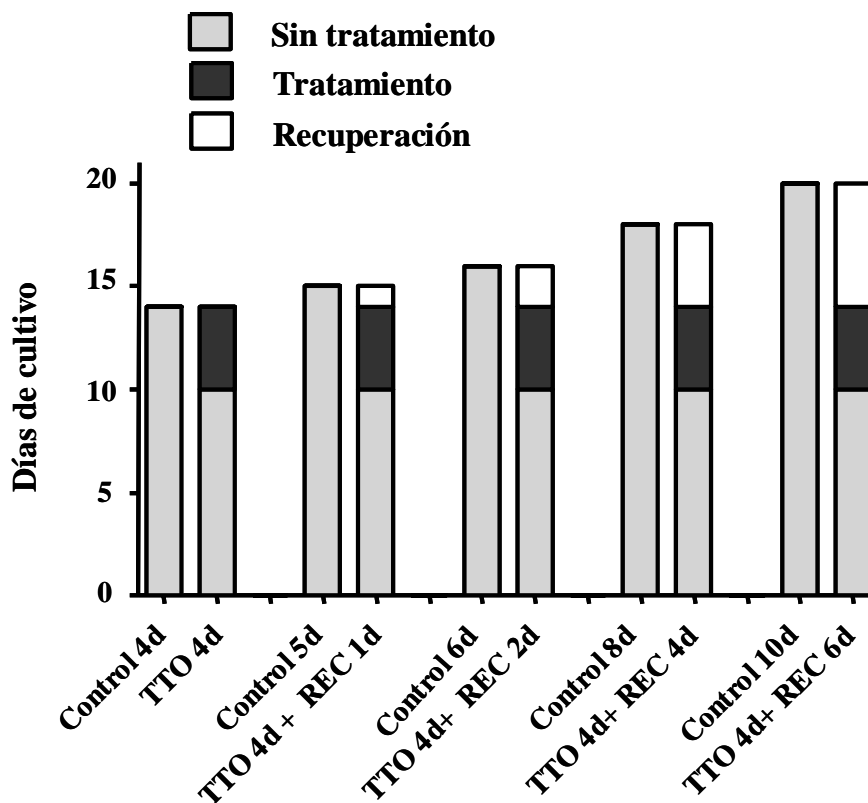
Tal como hemos mencionado en apartados anteriores la fluoxetina es un inhibidor de la recaptación de serotonina y del transportador SERT, que para ejercer su efecto terapéutico requiere una acción continuada y repetida durante días y semanas.

Con el fin de caracterizar más el efecto inhibitor de la captación de 5-HT mediada por el tratamiento con fluoxetina, se realizó el estudio de la influencia de la duración del tratamiento sobre la inhibición de hSERT. Para ello, se trataron las células con fluoxetina  $10^{-7}$  M durante 4, 5, 6, 8 y 10 días, y se comparó el transporte de 5-HT con el de las células no tratadas (control) a idénticas condiciones de diferenciación. El resultado obtenido muestra, que el efecto de la fluoxetina fue máximo ya a los 4 días de tratamiento y la inhibición de la captación de 5-HT no se ve modificada significativamente con tratamientos de mayor duración (Figura 42). Este dato nos permite establecer la duración del tratamiento en 4 días como tiempo óptimo de experimentación para posteriores estudios.



**Figura 42.** Efecto de la duración del tratamiento con fluoxetina sobre la captación de 5-HT. El transporte de 5-HT se midió a distintos tiempos de tratamiento (4, 5, 6, 8, y 10 días). La concentración de la fluoxetina fue de  $10^{-7}$  M. En los experimentos de transporte de 5-HT, la concentración de 5-HT fue  $2 \times 10^{-7}$  M y el tiempo de incubación de 6 minutos. Los resultados son expresados en % de transporte de 5-HT respecto al control y se expresan como la media  $\pm$  error estándar calculada de 5 experimentos independientes. \* $p < 0,05$  respecto al control correspondiente.

La fluoxetina ha sido descrita como un inhibidor de la recaptación de 5-HT que se une al sitio de transporte de 5-HT en SERT, pero que no resulta ser transportada por dicho transportador (Chen y cols. 2005). En toda la experimentación realizada en el presente estudio, la fluoxetina se extrae del medio que está en contacto con las células 6 horas antes del experimento de medida de transporte, lo cual hace pensar en un efecto indirecto de la fluoxetina, aunque el hecho de que la fluoxetina tras un tratamiento duradero pueda producir efectos irreversibles sobre hSERT no puede ser descartado. Por ello, y con el fin de caracterizar el efecto de dicho tratamiento sobre hSERT, pareció interesante clarificar si el efecto a largo plazo de la fluoxetina, sobre el transporte de 5-HT era o no reversible.

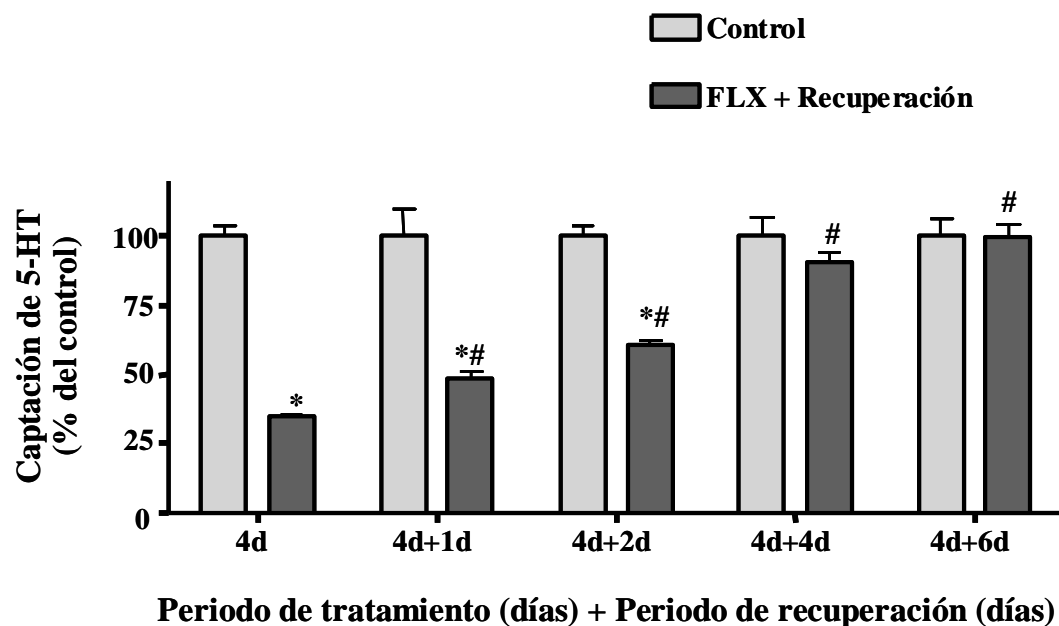


**Figura 43.** Esquema de la pauta de tratamiento y recuperación al que han sido sometidas las células para determinar la reversibilidad del efecto del tratamiento con fluoxetina sobre la captación de 5-HT. En ordenadas se expresa la duración del tratamiento en días. Los histogramas muestran la duración y las condiciones de tratamiento de las células.

Con este fin se llevaron a cabo una serie de experimentos en los que se establecieron tres grupos de células: un grupo control, donde las células no han sido tratadas y son mantenidas durante diferentes días en cultivo; células tratadas con fluoxetina  $10^{-7}$  M durante 4 días y células tratadas con fluoxetina durante 4 días a las

que se les retiró el tratamiento y se midió la captación de 5-HT tras 1, 2, 4 o 6 días de recuperación. El tratamiento de las células Caco-2 comenzó el día 5 después de la confluencia (décimo día de siembra). La recuperación se llevó a cabo adicionando a las células medio de cultivo carente de fluoxetina. En la Figura 43 se ha diseñado un esquema explicativo de la pauta de tratamiento en estos experimentos.

Tal como muestran los resultados obtenidos, y que aparecen ilustrados en la Figura 44, la inhibición del transporte de 5-HT producido por la fluoxetina va reduciéndose a medida que aumenta el tiempo de recuperación de las células. Esta recuperación ya es significativa con 1 día sin tratamiento, pero son necesarios al menos 4 días para que el efecto de la fluoxetina deje de ser significativo. Por lo tanto, podemos concluir que el tratamiento con fluoxetina no produce un daño celular irreversible que afecte el transportador hSERT y su actividad, de manera permanente.



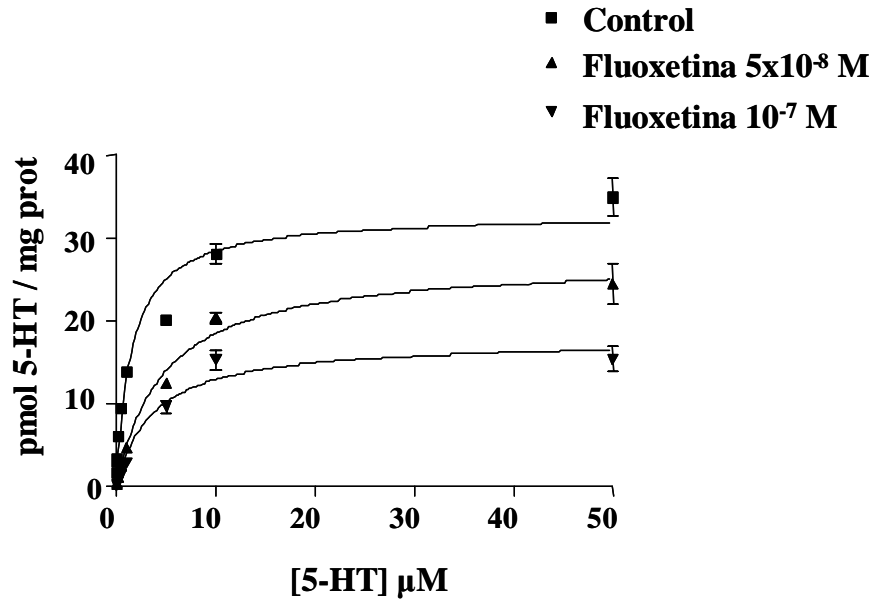
**Figura 44.** Reversibilidad del efecto del tratamiento con fluoxetina sobre el transporte de 5-HT. El tiempo de tratamiento fue de 4 días a partir del quinto día después de la confluencia. Se ensayaron distintos tiempos de recuperación (1, 2, 4 y 6 días). La concentración de fluoxetina que se utilizó fue  $10^{-7}$  M. En los experimentos de transporte, se utilizó una concentración de 5-HT de  $2 \times 10^{-7}$  M y el tiempo de incubación fue de 6 minutos. Los resultados de la figura se han indicado en % de transporte de 5-HT respecto al control y los resultados se expresan como la media  $\pm$  error estándar calculada de 4 experimentos independientes. \* $p < 0,05$  respecto al control correspondiente; # $p < 0,05$  respecto al transporte de 5-HT después de 4 días de tratamiento sin recuperación (4d).

### 3.4. Estudio cinético del efecto del tratamiento con fluoxetina sobre SERT

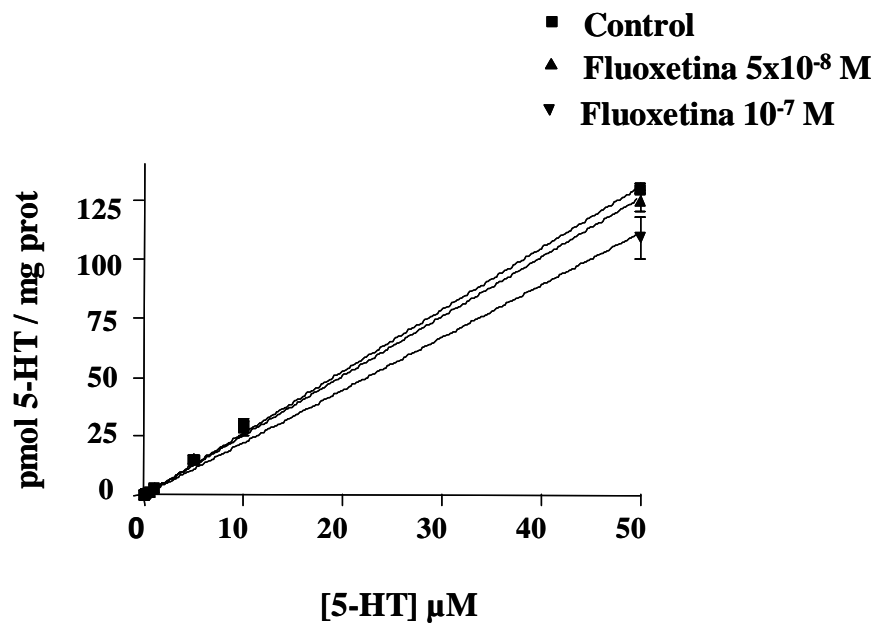
Los resultados obtenidos muestran que el transporte de 5-HT mediado por hSERT es disminuido por efecto del tratamiento de las células Caco-2 con fluoxetina, y dicha alteración del transportador parece ser previa a un efecto inmediato de interacción directa entre SERT y la fluoxetina en el instante de la medida del transporte. Con el fin de continuar con la caracterización del efecto producido por el tratamiento con fluoxetina sobre la actividad de hSERT, y poder determinar más concretamente cual es la afectación del transporte de 5-HT, se llevó a cabo un estudio cinético del transporte de 5-HT en células tratadas con fluoxetina.

El estudio cinético nos permite determinar las constantes cinéticas  $V_{max}$  y  $K_t$  en cada condición experimental. Los experimentos se realizaron en células Caco-2 tratadas con fluoxetina según el protocolo del apartado anterior, es decir, desde el día 5 post confluencia hasta el día 9. Se ensayaron dos concentraciones de fluoxetina,  $5 \times 10^{-8}$  M y  $10^{-7}$  M, que producen efecto inhibitor de la actividad de hSERT sin llegar a bloquear completamente el transporte de 5-HT, y que por lo tanto permitirán poder detectar posibles alteraciones en las constantes cinéticas  $K_t$  o  $V_{max}$ . Se midió el transporte de 5-HT en un rango de concentraciones entre  $5 \times 10^{-8}$  y  $5 \times 10^{-5}$  M tanto en condiciones estándar de cultivo como en ausencia de  $Na^+$ , (sustituido equimolecularmente con colina), con el fin de determinar el componente saturable  $Na^+$ -dependiente y su afectación por el tratamiento con fluoxetina. El transporte  $Na^+$ -dependiente se calculó mediante la sustracción al valor del transporte total (en condiciones normales) del valor correspondiente en ausencia de  $Na^+$ . Estos valores fueron adecuados mediante una regresión no lineal a la ecuación correspondiente al componente saturable del transporte. A partir de esta regresión no lineal, se calcularon los valores de  $V_{max}$  y  $K_t$  para cada condición. Asimismo, los valores de transporte en ausencia de  $Na^+$  permitieron calcular el valor de la  $K_d$ , y poder determinar de este modo si existía alguna alteración de la permeabilidad al 5-HT mediada por el tratamiento con fluoxetina. Para estos cálculos se utilizó el programa GraphPad Prism. Los valores obtenidos están indicados en la Tabla 7 y las cinéticas han sido representadas en las Figuras 45A y 45B correspondiente

A)



B)



**Figura 45.** Estudio cinético del transporte de 5-HT en células Caco 2 tratadas con fluoxetina. Condiciones: Control = Sin tratamiento; Fluoxetina  $5 \times 10^{-8}$  y  $10^{-7}$  M = Células tratadas con fluoxetina desde el día 5 hasta el día 9 post-confluencia. A) Cinética del transporte  $\text{Na}^+$ -dependiente; B) Cinética de la captación de 5-HT en ausencia de  $\text{Na}^+$ . Los resultados corresponden a 4 experimentos independientes y se expresan como la media  $\pm$  error estándar.

**Tabla 7.** Valores de las constantes cinéticas de la captación de 5-HT en células Caco-2. Efecto de tratamiento con fluoxetina (FLX). \* $p < 0,05$  comparado con el valor control.

Condición	Vmax (pmol 5-HT / mg prot)	Kt ( $\mu$ M)	Kd ( $\mu$ l / mg prot)
Control	34,04 $\pm$ 1.85	1,45 $\pm$ 0.32	2,61 $\pm$ 0.02
FLX 5x10 <sup>-8</sup> M	21,71 $\pm$ 1.50*	2,53 $\pm$ 0.67	2,51 $\pm$ 0.03
FLX 10 <sup>-7</sup> M	10,65 $\pm$ 3.77*	1,20 $\pm$ 0.35	2,55 $\pm$ 0.04

A partir de los resultados obtenidos en el estudio cinético se observa que el tratamiento con fluoxetina parece no afectar la captación de 5-HT independiente de Na<sup>+</sup>, es decir, no parece haber alteración de la permeabilidad de la membrana que pudiera interferir con los resultados obtenidos sobre el transporte mediado por hSERT (Figura 45B). Sin embargo el transporte Na<sup>+</sup>-dependiente resulta disminuido en las células tratadas con fluoxetina (Figura 45A). Asimismo, se puede observar que la inhibición mediada por el tratamiento con fluoxetina afecta significativamente a la Vmax. Esta reducción es mayor a medida que la concentración de fluoxetina utilizada en el tratamiento aumenta. Sin embargo, la Kt no parece estar afectada por el tratamiento, dado que, si bien la Kt resulta aumentada en las células tratadas con fluoxetina 5x10<sup>-8</sup> M este aumento no fue significativo, y además no se observa alteración cuando el tratamiento se realizó con fluoxetina 10<sup>-7</sup> M.

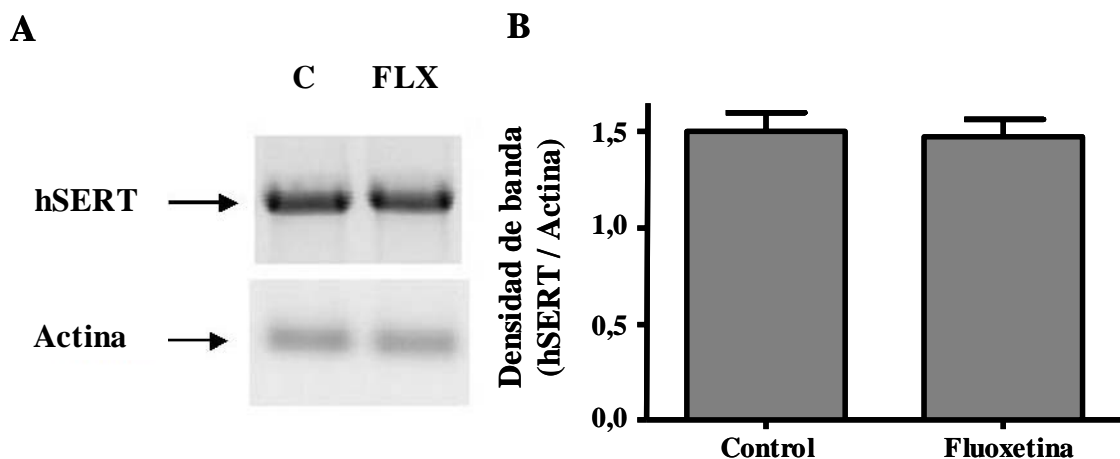
La disminución del valor de Vmax parece indicar que la capacidad del transportador resulta reducida por efecto del tratamiento con fluoxetina. Ello podría apuntar a que el tratamiento con fluoxetina pudiera afectar la disponibilidad de moléculas transportadoras en la membrana, no obstante otros tipos de afectación del transportador hSERT no pueden ser descartados.



### 3.5. Efecto del tratamiento con fluoxetina sobre la expresión del mRNA de hSERT

Los resultados obtenidos hasta el momento muestran que el tratamiento con fluoxetina altera la funcionalidad de hSERT, y parecen indicar una cierta alteración del transportador que pudiera comprometer la disponibilidad de transportador hSERT en la membrana celular. Para poder profundizar más en los mecanismos implicados en el efecto que el tratamiento con fluoxetina ejerce sobre hSERT, se consideró importante abordar estudios que informaran sobre la disponibilidad de la molécula transportadora en la célula tras el tratamiento con fluoxetina.

Con este fin, se iniciaron una serie de experimentos dirigidos a determinar la expresión génica y su posible alteración por el tratamiento con fluoxetina. Se determinó la expresión del ARNm de hSERT en células tratadas, mediante la técnica RT-PCR semicuantitativa, tal como se ha explicado en el apartado de Material y Métodos. Para ello se obtuvo el ARN total de las células Caco-2 control y tratadas con fluoxetina durante 4 días a una concentración de  $10^{-6}$  M. Se seleccionó esta concentración de fluoxetina para garantizar el máximo efecto. Se determinó igualmente la expresión de  $\beta$ -actina para utilizarla como control y poder realizar una cuantificación relativa de la expresión de hSERT. El resultado obtenido se muestra en la Figura 46



**Figura 46.** Efecto del tratamiento con fluoxetina sobre los niveles de ARNm de hSERT. Las células fueron tratadas durante 4 días (a partir del quinto día post-confluencia) con fluoxetina  $10^{-6}$  M. A) RT-PCR semicuantitativa de hSERT y de actina en células control y células tratadas con fluoxetina (FLX). B) Cuantificación de la densidad de las bandas correspondientes a la PCR expresada como unidades arbitrarias de hSERT/actina. Estos resultados corresponden a 4 experimentos independientes.

Los resultados muestran que el tratamiento con fluoxetina durante 4 días no altera los niveles de ARNm de hSERT. Este resultado parece indicar que el tratamiento no afecta a la transcripción del gen de hSERT. Se han obtenido resultados parecidos en estudios “in vivo”, en ratas sometidas a un tratamiento con paroxetina y sertralina, utilizando la técnica de hibridación “in situ” (Benmansour y cols. 1999) y también en el cerebro de ratas, tratadas con un tratamiento con fluoxetina, mediante Northern Blot (Koed y Linnet, 1997). Otros autores han obtenido disminución en los niveles de ARNm después del tratamiento con imipramina y fluoxetina (Lesch y cols. 1993 y Neumaier y cols. 1996), o un aumento con el tratamiento de imipramina (Lopez y cols. 1994). Los resultados “in vivo” se han llevado a cabo en cerebros de ratas tratadas con distintos antidepresivos, y el protocolo de administración del antidepresivo variaba en cada caso, así como la zona del cerebro estudiada. Estos hechos podrían ser en parte la causa de los resultados contradictorios que se han obtenido en la expresión de SERT por efecto del tratamiento con antidepresivos.

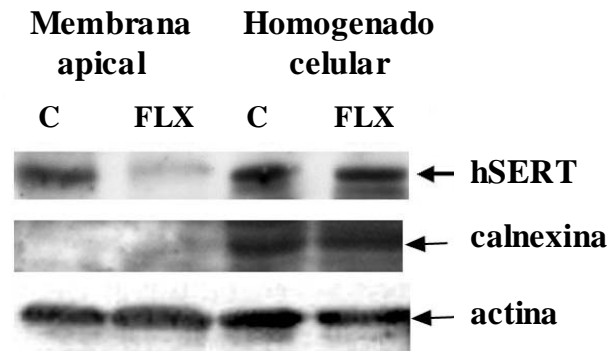
### 3.6. Efecto del tratamiento con fluoxetina sobre la expresión proteica de hSERT

Los resultados previos obtenidos con el tratamiento a largo plazo con fluoxetina parecen apuntar a un posible efecto post-transcripcional de dicha sustancia sobre hSERT. Dado que la fluoxetina disminuye la actividad del transportador, y que el estudio cinético apunta a una alteración de la  $V_{max}$ , pareció indispensable determinar la expresión de la proteína hSERT en las células Caco-2 tras el tratamiento con fluoxetina. Para ello, se utilizó la técnica SDS-PAGE y electrotransferencia (western blot) tanto a partir del homogenado celular, para medir la proteína hSERT celular total, como de vesículas de membrana apical, para medir la proteína en la superficie celular. Para esta determinación se realizó la biotinización de las células con el fin de purificar las proteínas de membrana. La inmunodetección se realizó con un anticuerpo primario policlonal de conejo (AB 1594) a una concentración de 1:5.000. El anticuerpo primario fue detectado mediante un anticuerpo secundario anti-conejo unido a la peroxidasa de rábano y la detección se hizo por quimioluminiscencia. El desarrollo de estas técnicas ha sido realizado en el apartado de Material y Métodos.

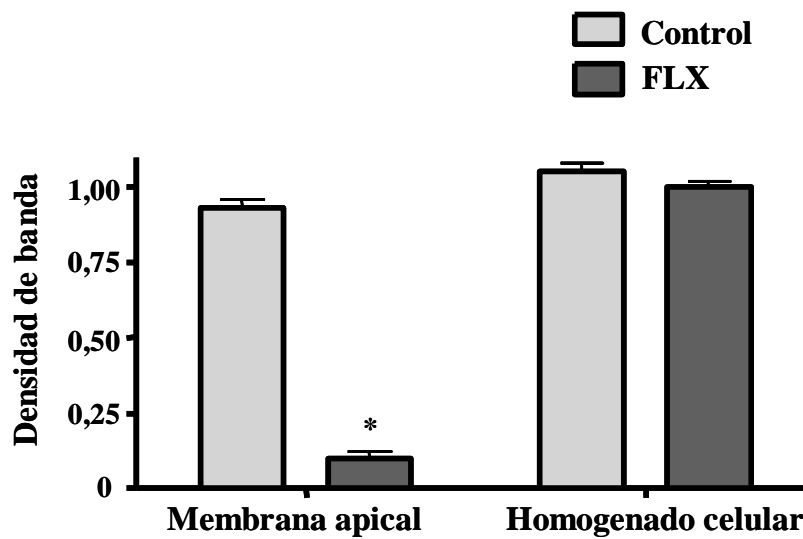
El estudio se realizó en células Caco-2 tratadas con fluoxetina  $10^{-6}$  M durante 4 días, desde el día 10 hasta el día 14 después de la siembra, como en el apartado anterior. Para validar la biotinización, realizamos la detección de la calnexina, una proteína de retículo endoplasmático, la cual no debe aparecer en membrana celular ni resultar biotinizada. Se utilizó como control de carga la actina (Figura 47).

Los resultados ilustrados en la Figura 47, muestran que la disponibilidad de la proteína hSERT en la membrana celular se reduce drásticamente en las células tratadas con fluoxetina, mientras que en estas mismas células la proteína total no muestra variación respecto al control. Efectos parecidos se han observado en cerebro de rata tratada con paroxetina y sertralina, donde se ha observado una disminución en la densidad de SERT después de un tratamiento crónico (Benmansour y cols. 1999). En cambio, otros autores no han obtenido ningún cambio en la expresión proteica de SERT de cerebro de rata después de un tratamiento crónico con fluoxetina y citalopram (Gobbi y cols. 1997). En un estudio llevado a cabo con plaquetas humanas, el tratamiento con fluoxetina ha mostrado reducir el transporte de 5-HT sin alterar la densidad de hSERT medida mediante el marcaje con [ $^3$ H] paroxetina (Bakish y cols. 1997).

A)



B)



**Figura 47.** Efecto del tratamiento con fluoxetina sobre la expresión de hSERT. Las células fueron tratadas con fluoxetina (FLX)  $10^{-6}$  M durante 4 días. A) Imagen representativa de la expresión proteica de hSERT por western blot en membrana apical y homogenado total de células Caco-2 tratadas o no con fluoxetina. Comparación con la expresión de calnexina y actina. B) Cuantificación de la densidad de las bandas correspondientes a la proteína hSERT en relación a la actina (hSERT/actina) expresado en unidades arbitrarias. Los resultados corresponden a 5 experimentos independientes. \* $p < 0,05$  comparado con el valor control correspondiente.

El hecho de que el tratamiento con fluoxetina no altere el contenido de la proteína hSERT en el homogenado celular corrobora el resultado del apartado anterior en el cual no parecía estar alterada la expresión del ARNm por el tratamiento con fluoxetina. Sin embargo, la disminución drástica que se observa en la membrana apical de proteína hSERT parece indicar un posible proceso de internalización de dicha proteína como posible mecanismo que mediaría el efecto producido por el tratamiento con fluoxetina.

### **3.7. Papel de los sistemas intracelulares reguladores del nivel de fosforilación en el efecto producido por el tratamiento con fluoxetina sobre hSERT**

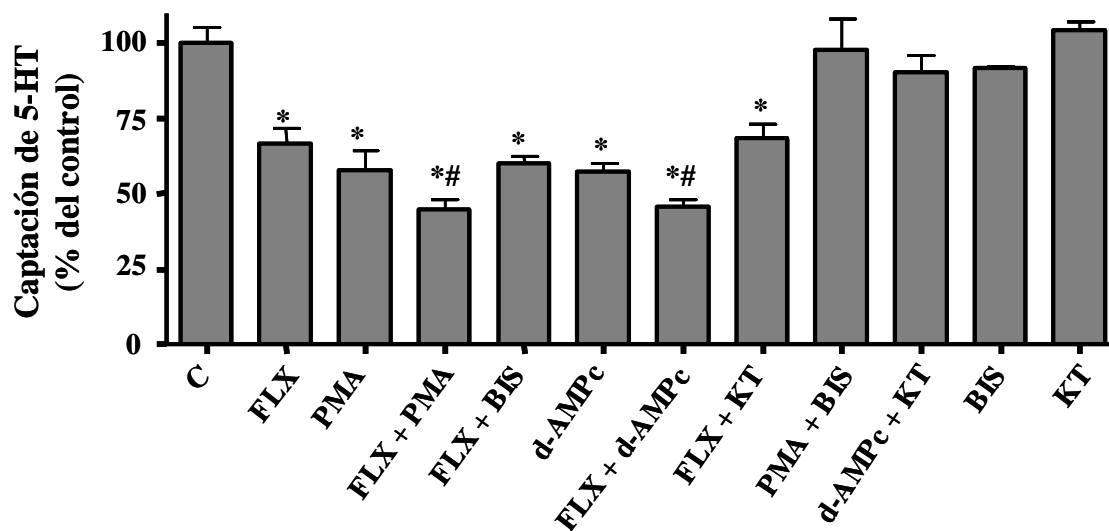
Resultados previos presentados en el presente trabajo han mostrado que los sistemas activadores del nivel de fosforilación intracelular, tales como la estimulación de la PKC, el aumento de la disponibilidad de AMPc y la inhibición de las fosfatasa intracelulares producen una disminución de la actividad del transportador hSERT. Además, también se ha observado en los resultados antes expuestos, que el efecto de la fluoxetina sobre hSERT parece estar mediado fundamentalmente por la reducción de la disponibilidad de hSERT en la membrana celular, sin alteración de la transcripción.

Uno de los mecanismos de internalización más descritos para proteínas de membrana es la fosforilación mediada por cinasas intracelulares. En el caso del transportador SERT, diversos estudios han mostrado que la activación de la PKC produce una disminución de la capacidad ( $V_{max}$ ) de SERT debida a una disminución de la expresión de la proteína en la membrana celular (Qian y cols. 1997; Ramamoorthy y Blakely, 1999). Además, recientes resultados obtenidos en cerebro de rata han mostrado que el tratamiento crónico con fluoxetina altera el grado de fosforilación intracelular (Fugamalli y cols. 2005; Thome y cols. 2000).

Con estos antecedentes, y con el fin de determinar el mecanismo intracelular que explicaría el efecto del tratamiento de fluoxetina sobre hSERT, se ha estudiado si los sistemas de fosforilación mediados por la PKC, el AMPc y/o la inhibición de fosfatasa intracelulares, actúan como mediadores en la producción del efecto de la fluoxetina sobre hSERT.

Para llevar a cabo este estudio se sometieron las células Caco-2 a un tratamiento simultáneo con fluoxetina ( $10^{-8}$  M) y/o PMA ( $10^{-6}$  M), un activador de la PKC, y d-AMPc ( $10^{-3}$  M), un análogo no permeable del cAMP, y/o bisindolilmaleimida II (BIS) ( $2 \times 10^{-6}$  M) y/o KT 5720 (KT) ( $10^{-6}$  M), inhibidores de la PKC y PKA respectivamente. La duración del tratamiento fue de 4 días. La concentración de fluoxetina que se utilizó fue de  $10^{-8}$  M, para obtener una inhibición parcial de hSERT, y así permitir la detección de los posibles efectos aditivos.

Los resultados se han representado en la Figura 48 y muestran que tanto el tratamiento de las células con PMA, como con d-AMPC, disminuyen la captación de 5-HT, tal como se había mostrado en resultados previos. Además, este efecto es aditivo a la reducción obtenida por el tratamiento con fluoxetina. El efecto de la fluoxetina no se bloquea ni con BIS, inhibidor de la PKC, ni con KT, inhibidor de la PKA. Sin embargo, estos agentes inhibidores revierten significativamente el efecto del PMA y del d-AMPC en el transporte de 5-HT. De estos resultados se puede deducir que el tratamiento con fluoxetina utiliza mecanismos intracelulares independientes de la actividad de la PKC y del AMPC.

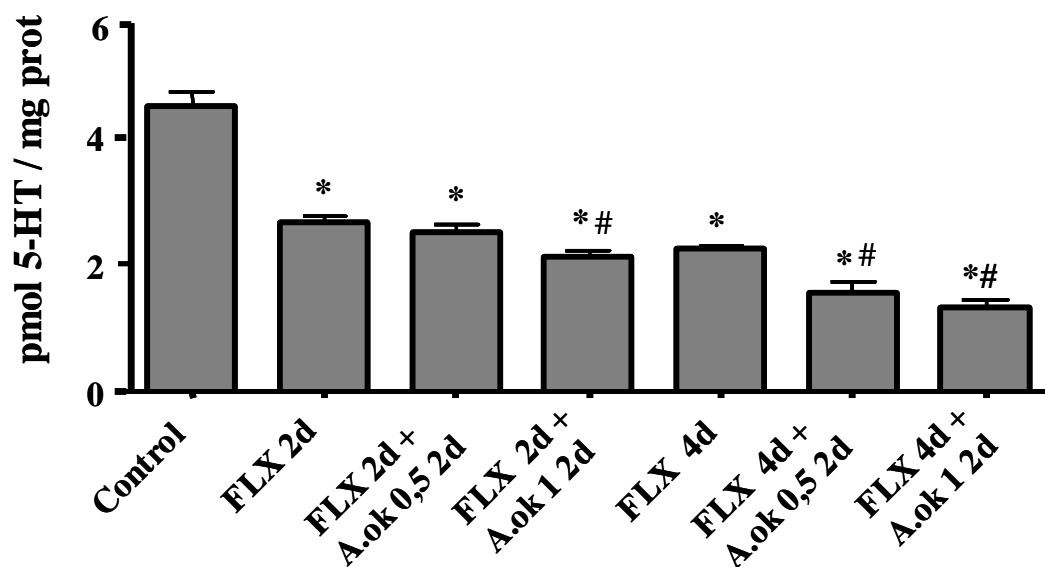


**Figura 48.** Papel de la fosforilación mediada por PKC o AMPC en el efecto del tratamiento de fluoxetina sobre la captación de 5-HT mediada por hSERT. Las condiciones de tratamiento fueron: C, células control (no tratadas); FLX, tratamiento con fluoxetina ( $10^{-8}$  M); PMA, tratamiento con PMA ( $10^{-6}$  M); FLX+PMA, tratamiento simultáneo con fluoxetina y PMA; FLX+BIS, tratamiento simultáneo con fluoxetina y BIS ( $2 \times 10^{-6}$  M); d-AMPC, tratamiento con d-cAMP ( $10^{-3}$  M); FLX+d-AMPC, tratamiento simultáneo con fluoxetina y d-AMPC; FLX+KT, tratamiento simultáneo con fluoxetina y KT ( $10^{-6}$  M); PMA+BIS, tratamiento simultáneo con PMA y BIS; d-AMPC+KT, tratamiento simultáneo con d-AMPC y KT; BIS, tratamiento con BIS; KT, tratamiento con KT. En los experimentos de transporte se utilizó una concentración de  $2 \times 10^{-7}$  M y el tiempo de incubación fue de 6 minutos. Los resultados se han expresado como % de la captación en condiciones control y son la media  $\pm$  error estándar de 5 experimentos independientes. \* $p < 0,05$  comparado con el valor control; # $p < 0,05$  comparado con el valor PMA (en caso de los valores de FLX+PMA) o el valor de d-AMPC (en el caso de los valores FLX+d-AMPC).

A pesar de que la fluoxetina no parece utilizar el mecanismo fosforilativo mediado por la PKC o el AMPC, el papel de la fosforilación de hSERT no puede ser descartado en el efecto ejercido por el tratamiento de fluoxetina. Con el fin de clarificar

esta posibilidad se realizaron una serie de experimentos en los que se trataron las células con fluoxetina y se comparó con el efecto producido por el tratamiento con ácido ocadaico, un inhibidor de las proteínas fosfatasa intracelulares. En este caso la concentración de fluoxetina utilizada en el tratamiento fue  $10^{-7}$  M y se probaron dos concentraciones de ácido ocadaico,  $5 \times 10^{-7}$  y  $10^{-6}$  M. Asimismo, se ensayaron tratamientos de fluoxetina de 2 y 4 días, siendo el tratamiento con ácido ocadaico de 2 días.

Los resultados se representan en la Figura 49, y muestran que el tratamiento con ácido ocadaico produce efecto aditivo al del tratamiento con fluoxetina, es decir, parece que el efecto producido por el tratamiento con fluoxetina podría ser independiente del grado de fosforilación de hSERT o bien diferentes cinasas estarían implicadas en procesos de fosforilación, y algunas de ellas podrían ser activadas por el tratamiento con fluoxetina, aunque nosotros no hemos podido identificarlas. Habría que inhibir toda fosforilación celular para poder afirmar que el grado de fosforilación no es un mecanismo implicado en el efecto de la fluoxetina. Otra posibilidad es que la fluoxetina activa, quizás mediante unión a otras proteínas, a las proteínas de la familia SNARE que median el fenómeno de la internalización, como ocurre con otras proteínas transportadoras de membrana (Grusorin y Macanlay, 2003).



**Figura 49.** Efecto del tratamiento con el ácido ocadaico sobre el transporte de 5-HT. Las células fueron tratadas durante 2 y 4 días con fluoxetina  $10^{-7}$  M y con ácido ocadaico durante 2 días. Se utilizaron dos concentraciones de ácido ocadaico:  $0,5 \times 10^{-6}$  M y  $1 \times 10^{-6}$  M. Los resultados se han expresado como pmol de 5-HT / mg proteína y se expresan como la media  $\pm$  error estándar calculada de 5 experimentos independientes. \* $p < 0,05$  respecto al control. # $p < 0,05$  respecto al valor FLX correspondiente (de 2 o 4 días de tratamiento).

### **3.8. Papel de los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> y 5-HT<sub>4</sub> en el efecto producido por el tratamiento con fluoxetina sobre hSERT**

Los resultados hasta el momento obtenidos indican que el tratamiento con fluoxetina reduce la actividad de hSERT de modo reversible por desencadenamiento de mecanismos intracelulares independientes de PKC, AMPc y del grado de fosforilación intracelular que, en última instancia, producen una internalización del transportador sin afectar la expresión génica del mismo.

Diversos estudios realizados para determinar el efecto antidepresivo del tratamiento crónico con fluoxetina han demostrado que dicho fármaco actúa alterando la actividad de receptores serotoninérgicos en el sistema nervioso central (Pejchal y cols. 2002; Ni y Miledi, 1997). Recientes estudios han demostrado que el epitelio intestinal expresa receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> y 5-HT<sub>4</sub> (Alcalde y cols. 2000; Salvador y cols.1997).

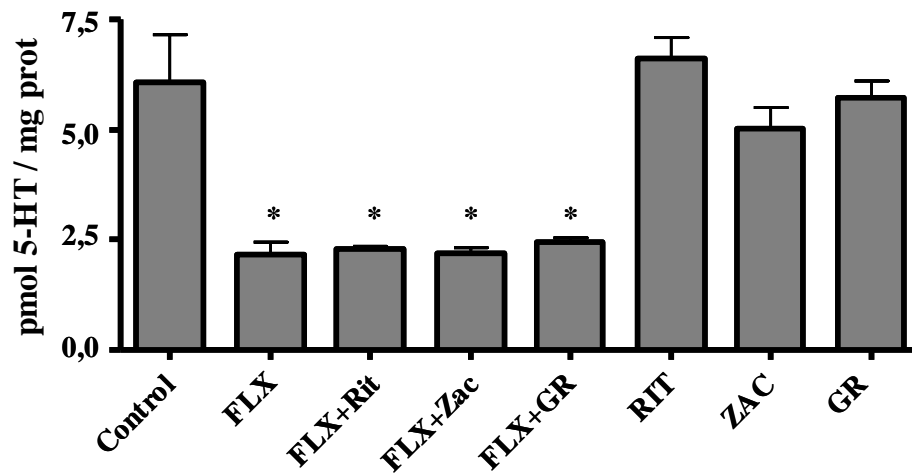
Con el fin de intentar clarificar los mediadores que contribuyen al efecto observado del tratamiento con fluoxetina sobre hSERT se realizaron una serie de experimentos en los que se determinó el efecto del tratamiento de fluoxetina en presencia de ritanserina, zacoprida o GR 113808 (antagonistas 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> y 5-HT<sub>4</sub> respectivamente). Para ello las células fueron tratadas durante 4 días con fluoxetina 10<sup>-7</sup> M y ritanserina, zacoprida o GR 113808 10<sup>-9</sup> M y se midió la captación de 5-HT en las condiciones descritas en el apartado de Materiales y Métodos.

Los resultados representados en la Figura 50 muestran que la inhibición producida por el tratamiento con fluoxetina no resultó revertida por el tratamiento simultáneo con ninguno de los antagonistas ensayados. Asimismo, ninguno de los tratamientos con los tres antagonistas afectó significativamente la captación de 5-HT en las células. En consecuencia, parece evidenciarse que el efecto producido por el tratamiento con fluoxetina no está mediado por el efecto de la fluoxetina sobre los recetores 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> y 5-HT<sub>4</sub>.

Asimismo, no cabe plantearse que el efecto de la fluoxetina pudiera provocar un aumento de la disponibilidad de 5-HT que desensibilizara estos receptores en las células Caco-2, lo cual explicaría la falta de efecto mediado por ellos, dado que estas células expresan hSERT pero no sintetizan 5-HT, y en consecuencia el nivel de 5-HT no



interfiere en el presente trabajo, si no es adicionado al medio de cultivo (que no es el caso).



**Figura 50.** Papel de los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> y 5-HT<sub>4</sub> en el efecto producido por el tratamiento con fluoxetina sobre hSERT. La concentración de fluoxetina fue 10<sup>-7</sup> M. La concentración de ritanserina (RIT), zacoprida (ZAC) y GR 113808 (GR) fue 10<sup>-9</sup> M. El tratamiento tuvo una duración de 4 días. En los experimentos de transporte se utilizó una concentración de 2x10<sup>-7</sup> M y el tiempo de incubación fue de 6 minutos. Los resultados se expresan como pmol de 5-HT / mg proteína y son la media ± error estándar de 3 experimentos independientes. \*p<0,05 comparado con el control.

### 3.9. Discusión general

Los inhibidores específicos de la recaptación de serotonina (SSRIs) son los antidepresivos más utilizados en alteraciones de la conducta y también son administradas en algunas patologías crónicas gastrointestinales. Los antidepresivos, tanto los tricíclicos como los inhibidores específicos de la recaptación de serotonina (SSRIs), aumentan la neurotransmisión serotoninérgica mediante el bloqueo del transportador de serotonina (SERT), que media la captación de 5-HT del medio extracelular y disminuye la disponibilidad del neurotransmisor.

Aunque los SSRIs inhiben el transporte de serotonina inmediatamente, los efectos terapéuticos se obtienen al cabo de un largo periodo de tratamiento. Por ello, es de gran interés estudiar cómo los SSRIs regulan la expresión y función de SERT bajo estos tratamientos de larga duración.

Estudios recientes han determinado, en diversos modelos celulares la asociación de mutaciones de SERT con la respuesta aguda de SSRIs (Roman y cols. 2003; Zhang y Rudnick, 2005; Henry y cols. 2006). Sin embargo, sus resultados no resuelven el efecto a largo plazo que ejerce la fluoxetina. Por otro lado, resultados obtenidos “in vivo” para determinar el efecto a largo plazo de algunos antidepresivos sobre la regulación de SERT muestran resultados contradictorios (López y cols. 1994; Lesch y cols. 1993; Neumaier y cols. 1996).

Para aclarar el efecto a largo plazo que ejerce la fluoxetina sobre hSERT hemos utilizado la línea celular Caco-2, y hemos tratado las células durante varios días con fluoxetina para determinar el efecto a largo plazo, y así medir diferentes aspectos de la funcionalidad de hSERT junto con su expresión molecular. Los resultados muestran que el tratamiento con la fluoxetina disminuye el transporte de 5-HT y además, la inhibición es dependiente de la dosis utilizada. La fluoxetina es una molécula que actúa uniéndose al transportador de serotonina, por lo que el efecto dosis-dependiente descrito podría deberse a un aumento del número de moléculas de hSERT a las que se les una de una forma irreversible la fluoxetina. Esta posibilidad quedaría rechazada ya que la inhibición del transporte de 5-HT se revierte cuando se elimina la fluoxetina del medio y además, en todos los experimentos, el transporte de 5-HT se mide al cabo de una incubación durante 6 horas en un medio sin fluoxetina. Asimismo, el flujo transepitelial apical-basal de 5-HT se reduce por el tratamiento con fluoxetina tanto si se administraba

desde el compartimento apical o desde el basal, resultando la acumulación celular de 5-HT también reducida, lo cual parece indicar un efecto indirecto de la fluoxetina. Por lo tanto, los resultados obtenidos muestran que el efecto inhibitor del tratamiento con fluoxetina no se debe a un bloqueo directo del transportador, y por lo tanto, podrían estar implicados otros mecanismos. Para demostrar que no ha habido ningún proceso de desdiferenciación, ni alteración de la funcionalidad celular, se midió la actividad de la aminopeptidasa N, actividad enzimática específica de los enterocitos y dependiente de la diferenciación celular. Los resultados mostraron que no se alteraba por efecto del tratamiento, ni a corto ni a largo plazo, con fluoxetina.

Para profundizar más acerca del tratamiento a largo plazo de la fluoxetina, se midieron los parámetros cinéticos de hSERT ( $K_t$ ,  $V_{max}$ ). El estudio cinético demostró que el valor de la  $V_{max}$  disminuye en células tratadas con fluoxetina, indicando que la fluoxetina podría estar alterando la disponibilidad de hSERT en la membrana celular. Para conocer los mecanismos intracelulares responsables del efecto de la fluoxetina, se midieron los niveles de ARNm de hSERT mediante PCR semicuantitativa. Los resultados muestran que no hay alteración alguna en el ARNm de hSERT en las células tratadas con fluoxetina si las comparamos con las células no tratadas. Resultados parecidos se han obtenido en estudios “in vivo” en cerebro de rata mediante hibridación in situ después de administrar un tratamiento con paroxetina y sertralina (Benmansour y cols. 1999) o mediante northern blot al aplicar un tratamiento con fluoxetina (Koed y Linnet, 1997). Otros autores han obtenido una disminución del ARNm mediante el tratamiento con imipramina o fluoxetina (Lesch y cols. 1993; Neumaier y cols. 1996) y en cambio, otros obtienen un aumento del ARNm al aplicarles un tratamiento con imipramina (Lopez y cols. 1994). Estos resultados contradictorios podrían deberse al uso de distintos antidepresivos, al protocolo de administración del antidepresivo, y la zona de cerebro analizada.

Nuestros resultados no muestran cambios en el ARNm tras el tratamiento con fluoxetina, dando a entender que la fluoxetina no altera la transcripción de hSERT. Sin embargo, la fluoxetina inhibe la actividad de hSERT y por lo tanto, no podemos descartar una posible alteración en la expresión de la proteína. De hecho, resultados recientes han demostrado que el tratamiento a largo plazo con fluoxetina produce una regulación específica de los factores de traducción en cerebro de rata (Dagestad y cols. 2006). Los resultados que hemos obtenido mediante western blot, tanto de la proteína

total como de la proteína de superficie celular, muestran que el tratamiento con fluoxetina afecta a la cantidad de proteína presente en la superficie de la membrana celular, y sin embargo no modificó el contenido de hSERT en el homogenado celular. Resultados parecidos han sido obtenidos (Benmansour y cols. 1999) en cerebro de rata tratado con paroxetina y sertralina, donde han detectado una reducción en la densidad proteica de SERT después de un tratamiento crónico. Por otro lado, otros autores no han obtenido ningún cambio proteico significativo de SERT en cerebro de rata (Gobbi y cols. 1997).

Los resultados que hemos obtenido en el presente trabajo, muestran que el nivel de proteína total de hSERT no se ve modificado por el tratamiento con fluoxetina, lo cual parece indicar que la fluoxetina no altera la síntesis de la proteína hSERT, resultado que se ve corroborado por la ausencia de efecto en el ARNm de hSERT.

El mecanismo por el cual la fluoxetina disminuye la cantidad de proteína hSERT en la membrana todavía no se conoce, pero de los resultados obtenidos se puede decir que el tratamiento con fluoxetina induce cambios a nivel post-traduccional. Estudios recientes en ratas tratadas con fluoxetina muestran que dicho tratamiento produce un cambio en el proceso de fosforilación en el cerebro (Fumagalli y cols. 2005). De hecho, resultados ya discutidos en apartados anteriores del presente trabajo muestran que el tratamiento de las células a largo plazo con activadores de PKC o PKA reduce la funcionalidad de hSERT. Se ha demostrado, que la proteína SERT está regulada por cinasas, que fosforilan la proteína y la internalizan (Ramamoorthy y Blakely, 1999). Se podría pensar que la reducción tanto del transporte de 5-HT, como de la disponibilidad de la proteína hSERT en la membrana producido por la fluoxetina podría estar mediado por PKC o APMc. Los resultados que hemos obtenido nos indican que el efecto inhibitor de la PKC y del AMPc es aditivo al efecto de la fluoxetina, y además el efecto de la fluoxetina no se revierte con los inhibidores específicos de la PKC y la PKA. Asimismo, el efecto inhibitor sobre la función de hSERT producido por la inhibición de fosfatasa se adiciona al obtenido con el tratamiento con fluoxetina cuando ambas condiciones se dan a la vez. Por lo tanto, el efecto del tratamiento con fluoxetina parece que no está mediado por PKC, AMPc ni parece deberse al grado de fosforilación.

Por último y, dado que estudios previos han demostrado que la fluoxetina altera la actividad de receptores serotoninérgicos en el sistema nervioso central (Pejchal y cols. 2002; Ni y Miledi, 1997) y además se ha demostrado la expresión de receptores

serotoninérgicos 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> y 5-HT<sub>4</sub> en el epitelio intestinal (Alcalde y cols. 2000; Salvador y cols. 1997), se estudió la posibilidad de la participación de estos receptores en el efecto observado con fluoxetina. Los resultados muestran que los receptores 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> y 5-HT<sub>4</sub> no se encuentran implicados en el efecto de la fluoxetina.

En resumen el tratamiento con fluoxetina disminuye la disponibilidad de hSERT en la membrana celular por un efecto post-traducciona que parece ser independiente de la actividad fosforilativa mediada por la PKC y el AMPc y que no presenta la participación de receptores serotoninérgicos. El efecto de la fluoxetina es reversible y no altera la diferenciación ni la actividad fisiológica de las células.



## **V. CONCLUSIONES**





Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación nos permiten establecer las siguientes conclusiones:

- 1.- Las células Caco-2 expresan el transportador de serotonina humano (hSERT), que ha mostrado ser idéntico al SERT de cerebro humano. El transportador de serotonina es funcional, presentando unas características de transporte similares a las descritas en SERT de cerebro humano.
- 2.- El transportador hSERT expresado en las células Caco-2 es regulado por segundos mensajeros intracelulares (PKC y AMPc) a corto y a largo plazo. Estos afectan fundamentalmente a la capacidad de  $V_{max}$  lo cual indicaría una posible disminución de disponibilidad de SERT en la membrana.
- 3.- Dado que hSERT se expresa endógenamente en las células Caco-2 y que presenta características moleculares y funcionales similares a hSERT del sistema nervioso central, la línea celular Caco-2 aparece como un excelente modelo experimental para realizar estudios sobre la funcionalidad y regulación de hSERT.
- 4.- El tratamiento de las células Caco-2 con 5-HT produce una inhibición de la actividad de hSERT reduciendo tanto la capacidad como la afinidad de la proteína. Ni la síntesis ni la expresión de hSERT parecen estar afectados por el tratamiento con 5-HT, lo cual apunta a un efecto sobre la propia molécula ubicada en la membrana, más concretamente el efecto podría estar localizado en el sitio alostérico de baja afinidad de hSERT.

- 5.- El tratamiento de las células Caco-2 con fluoxetina disminuye el transporte de 5-HT y la constante cinética  $V_{max}$ . La fluoxetina afecta la disponibilidad molecular de hSERT en la membrana sin producir alteración sobre el nivel de ARNm de hSERT. Todo ello parece indicar que el tratamiento con fluoxetina afecta el tráfico intracelular de hSERT. Asimismo este efecto no parece estar mediado por PKC ni AMPc ni parece depender del grado de fosforilación de hSERT.

## **VI. BIBLIOGRAFÍA**



- Adham N, Zgombick JM, Bard J, Branchek TA. Functional characterization of the recombinant human 5-hydroxytryptamine<sub>7(a)</sub> receptor isoform coupled to adenylate cyclase stimulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **287**: 508-14. 1998.
- Ahlman H, Bhargava HN, Dahlstrom A, Larsson I, Newson B, Petterson G. On the presence of serotonin in the gut lumen and possible release mechanisms. *Acta. Physiol. Scand.*, **112**: 263-9. 1981.
- Airaskinen MM, Miettinen TA, Huttunen J. Glucuronidation of 5-hydroxyindol derivatives in vitro. *Biochem. Pharmacol.*, **14**: 1019-23. 1965.
- Albert PR, Zhou OY, Van Tol HH, Bunzow JR, Civelli O. Cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of the rat 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptor gene. *J. Biol. Chem.*, **265**: 5825-32. 1990.
- Alcalde AI, Sorribas V, Rodríguez-Yoldi MJ, Lahuerta A. Study of the serotonin interactions with brush border membrane of rabbit jejunum. *Eur. J. Pharmacol.*, **403**: 9-15. 2000.
- Alcalde AI, Sorribas V. Caco-2 cells and 5-HT transport. *J. Physiol. Biochem.*, **57**: 117. 2001.
- Alrefai WA, Tyagi S, Saksena GS, Hadjiagapiou C, Manssur F, Ramaswamy K, Dudeja PK. Regulation of butyrate uptake in Caco-2 cells by phorbol 12-myristate 13-acetate. *Am. J. Physiol.*, **286(2)**: G197-G203. 2004.
- Anderson GM, Horne WC. Activators of protein kinase C decrease serotonin transport in human platelets. *Biochem. Biophys. Acta*, **1137**: 331-7. 1992.
- Arora RC, Meltzer HY. Increased serotonin 2 (5-HT<sub>2</sub>) receptors binding as measured by 3-H-lysergic acid diethylamide (3-HLSD) in the blood platelets of depressed patients. *Life Sci.*, **44**: 725-34. 1989.
- Arruebo P, Mesonero JE, Murillo MD, Alcalde AI. Effect of serotonin on D-galactose transport across the rabbit jejunum. *Reprod. Nutr. Dev.*, **29**: 441-8. 1989.
- Atkinson W, Lockhart S, Whonwell PJ, Keevil B, Houghton LA. Altered 5-hydroxytryptamine signaling in patients with constipation and diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, **130**: 34-43. 2006.
- Auerbach SB, Hjorth S. Effect of chronic administration of the selective serotonin (5HT) uptake inhibition citalopram on extracellular 5-HT and apparent autoreceptor sensitivity in rat forebrain in vivo. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **352**: 597-606. 1995.
- Axelrod HG. Fate of tritiated noradrenaline at the sympathetic nerve endings. *Nature*, **192**: 172-3. 1961.

- Axelrod J, Inscoc JK. The uptake and binding of circulating serotonin and the effect of drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **141**: 161-5. 1963.
- Ayton B, Hardcastle J, Hardcastle PT, Carstairs JWM. Comparison of the secretory actions of 5-hydroxytryptamine in the proximal and distal colon of the rat. *J. Pharm. Pharmacol.*, **47**: 34-41. 1995.
- Baker DE. Rationale for using serotonergic agents to treat irritable bowel syndrome. *Am. J. Health Syst. Pharm.*, **62**: 700-11. 2005.
- Bakish D, Cavazzoni P, Chudzik J, Ravindran A, Hrdina PD. Effects of selective serotonin reuptake inhibitors on platelet serotonin parameters in major depressive disorder. *Biol. Psychiatry*, **41**: 184-90. 1997.
- Balkovetz DF, Tiruppathi C, Leibach FH, Mahesh VB, Ganapathy V. Evidence for an imipramine-sensitive serotonin transporter in human placental brush border membranes. *J. Biol. Chem.*, **264**: 2195-8. 1989.
- Bard JA, Zgomblick J, Adham N, Vaysse P, Branchek TA, Weinshank RL. Cloning of a novel human serotonin receptor (5-HT<sub>7</sub>) positively linked to adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.*, **268**: 23422-6. 1993.
- Barker EL, Blakely RD. Identification of a single amino acid, phenylalanine 586, that is responsible for high affinity interactions of tricyclic antidepressants with the human serotonin transporter. *Mol. Pharmacol.*, **50**(4): 957-65. 1995.
- Barker EL, Kimmel HL, Blakely RD. Chimeric human and rat serotonin transporters reveal domains involved in recognition of transporter ligands. *Mol. Pharmacol.*, **46**: 799-807. 1994.
- Barker EL, Perlman MA, Adkins EM, Houlihan WJ, Pristupa ZB, Niznik HB, Blakely RD. High affinity recognition of serotonin transporter antagonists defined by species-scanning mutagenesis. An aromatic residue in transmembrane domain I dictates species-selective recognition of citalopram and mazindol. *J. Biol. Chem.*, **273**(31): 19459-68. 1998.
- Bauman AL, Apparsundaran S, Ramamoorthy S, Wadzinski BE, Vaughan RA, Blakely RD. Cocaine and antidepressant-sensitive biogenic amine transporters exist in regulated complexes with protein phosphatase 2A. *J. Neurosci.*, **20**: 7571-8. 2000.
- Bearcroft CP, Perrett D, Farthing MJ. Postprandial plasma 5-hydroxytryptamine in diarrhea predominant irritable bowel syndrome: a pilot study. *Gut*, **42**: 42-6. 1998.
- Belai A, Boulos PB, Robson T, Burnstock G. Neurochemical coding in the small intestine of patients with Crohn's disease. *Gut*, **40**(6): 767-74. 1997.
- Bengel D, Murphy DL, Andrews AM, Wichems CH, Feltner D, Heils A, Mossner R, Westphal H, Lesch KP. Altered brain serotonin homeostasis and locomotor insensitivity to 3, 4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") in serotonin transporter-deficient mice. *Mol. Pharmacol.*, **53**(4): 649-55. 1998.
- Benmansour S, Cecchi M, Morilak DA, Gerhardt G.A., Javors MA, Gould GG, Frazer A. Effects of chronic antidepressant treatments on serotonin transporter function, density and mRNA level. *J. Neurosci.*, **19**: 10494-501. 1999.

- Bertrand PP. Real-time detection of serotonin release from enterochromaffin cells of guinea pig ileum. *Neurogastroenterol. Motil.*, **16**: 511-4. 2004.
- Blakely RD, Berson HE, Fremeau RT, Caron MG, Peek MM, Prince HK, Bradley CC. Cloning and expression of a functional serotonin transporter from rat brain. *Nature*, **354**: 66-70. 1991.
- Blakely RD, Ramamoorthy S, Schroeter S, Quian Y, Apparsundaram S, Galli A, DeFelice L. Regulated phosphorylation and trafficking of antidepressant-sensitive serotonin transporter proteins. *Biol. Psychiatry*, **44**: 169-78. 1998.
- Blier P, Bouchard C. Modulation of 5-HT release in the guinea-pig brain following long-term administration of antidepressant drugs. *Br. J. Pharmacol.*, **113**: 485-95. 1994.
- Blier P, Szabo ST. Potential mechanisms of action of atypical antipsychotic medications in treatment-resistant depression and anxiety. *J. Clin. Psychiatry*, **66**: 30-40. 2005.
- Boess FG, Martin IL. Molecular biology of 5-HT receptors. *Neuropharmacol.*, **33**: 275-317. 1994.
- Borman RA, Burleigh DE. Functional evidence for 5-HT<sub>2B</sub> receptor mediating contraction of longitudinal muscle in human small intestine. *Br. J. Pharmacol.*, **114**: 1525-7. 1995.
- Bornman RA, Burleigh DE. Heterogeneity of 5-HT receptors mediating secretion in the human intestine. *Ann NY Acad. Sci.*, **812**: 224-5. 1997.
- Boyd IW, Rohan AP. Urinary disorders associated with cisapride. *Med. J. Aust.*, **160**: 579-80. 1994.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**: 248-54. 1976.
- Bryan-Lluka LJ, Papacostas MH, Paczkowski FA, Wanstall JC. Nitric oxide donors inhibit 5-hydroxytryptamine (5-HT) uptake by the human 5-HT transporter. *Br. J. Pharmacol.*, **143**: 63-70. 2004.
- Bülbring E, Crema A. The release of 5-hydroxytryptamine in relation to pressure exerted on the intestinal mucosa. *J. Physiol.*, **146**: 18-28. 1959.
- Bunin MA, Wightman RM. Quantitative evaluation of 5-hydroxytryptamine (serotonin) neuronal release and uptake: An investigation of extrasynaptic transmission. *J. Neurosci.*, **18**: 4854-60. 1998.
- Burnet PW, Michelson D, Smith MA, Gold PW, Sternberg EM. The effect of chronic imipramine administration on the densities of the 5-HT<sub>1A</sub> and 5HT<sub>2</sub> receptor and the abundances of 5-HT receptor and transporter mRNA in the cortex, hippocampus and dorsal raphe of three strain of rats. *Brain Res.*, **63**: 311-24. 1994.
- Camilleri M, Atasanova E, Carlson PJ, Ahmad U, Kim HJ, Viramontes BE, Mckinzie S, Urrutia R. Serotonin transporter polymorphism pharmacogenetics in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, **123**: 425-32. 2002.
- Camilleri M. Enteric nervous system disorders: genetic and molecular insights for the neurogastroenterologist. *Neurogastroenterol. Motil.*, **13(4)**: 277-95. 2001.

- Camilleri M, Von der Ohe MR. Drugs affecting serotonin receptors. *Baillieres Clin. Gastroenterol.*, **8**: 301-19. 1994.
- Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H, McClay J, Mill J, Martin J, Braithwaite A, Poulton R. Influence of life stress on depression: Moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science*, **301**: 386-9. 2003.
- Ceglia I, Acconcia S, Fracasso C, Colovic M, Caccia S, Invernizzi RW. Effects of chronic treatment with escitalopram or citalopram on extracellular 5-HT in the prefrontal cortex of rats: role of 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Br. J. Pharmacol.*, **142**: 469-78. 2004.
- Chang AS, Chang SM, Starnes DM, Schroeter S, Bauman AL, Blakely RD. Cloning and expression of the mouse serotonin transporter. *Mol. Brain Res.*, **43**: 185-92. 1996.
- Chang AS, Starnes DM, Chang SM. Possible existence of quaternary structure in the high-affinity serotonin transport complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **249**: 416-21. 1998.
- Chantret I, Barbat A, Dussaulx E, Brattain MG, Zweibaum A. Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines. *Cancer Res.*, **48(7)**: 1936-42. 1988.
- Chantret I, Rodolose A, Barbat A, Lacasa M, Brot-Laroche E, Zweibaum A, Rousset M. Selecting agent hygromycin B alters expression of glucose-regulated genes in transfected Caco-2 cells. *Am. J. Physiol.*, **274(5 Pt1)**: G931-8. 1998.
- Cheetham SC, Viggers JA, Slater NA, Heal DL, Buckett WR. [3H] paroxetine binding in rat frontal cortex strongly correlates with [3H]5-HT uptake: effect of administration of various antidepressant treatments. *Neuropharmacol.*, **32**: 737-43. 1993.
- Chen F, Larsen MB, Neubauer HA, Sánchez C, Plenge P, Wiborg O. Characterization of an allosteric citalopram-binding site at the serotonin transporter. *J. Neurochem.*, **92**: 21-8. 2005.
- Chen JX, Pan H, Rorthman TP, Wade PR, Gershon MD. Guinea pig 5-HT transporter: cloning, expression, distribution and function in intestinal sensory reception. *Am. J. Physiol.*, **275**: G433-48. 1998.
- Chen JG, Sachpatzidis A, Rudnick G. The third transmembrane domain of the serotonin transporter contains residues associated with substrate and cocaine binding. *J. Biol. Chem.*, **272**: 28321-7. 1997.
- Chen JJ, Zhishan L, Pan H, Murphy DL, Tamir H, Koepsell H, Gershon MD. Maintenance of serotonin in the intestinal mucosa and ganglia of mice that lack the high-affinity serotonin transporter (SERT); abnormal intestinal motility and the expression of cation transporters. *J. Neurosci.*, **21**: 6348-61. 2001.
- Chantret I, Rodolose A, Barbat A, Dussaulx E, Brot-Laroche E, Zweibaum A, Rousset M. Differential expression of sucrase isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2. Evidence for glucose dependent negative regulation. *J. Cell Sci.*, **107**: 213-25. 1994.
- Chantret I, Barbat A, Dussaulx E, Brattain MG, Zweibaum A. Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines. *Cancer Res.*, **48(7)**: 1936-42. 1988.



- Clarke DE, Carig DA, Fozard JR. The 5-HT<sub>4</sub> receptor: naughty but nice. *Trends Pharmacol. Sci.*, **10**: 385-6. 1989.
- Coates MD, Mahoney CR, Linden DR, Sampson JE, Chen J, Blaszyk H, Crowell MD, Sharkey KA, Gershon MD, Mawe GM, Moses PL. Molecular defects in mucosal serotonin content and decreased serotonin reuptake transporter in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, **126**: 1657-64. 2004.
- Conner DA, Mansour TE. Serotonin receptor-mediated activation of adenylate cyclase in the neuroblastoma NCB.20: a novel 5-hydroxytryptamine receptor. *Mol. Pharmacol.*, **37**: 742-51. 1990.
- Connor HE, Beattie DT, Feniuk W, Humphrey PPA, Mitchell W, Oxford A, Clitherow JW, Tyers MB. Use of GR55562, a selective 5-HT<sub>1D</sub> antagonist to investigate 5-HT<sub>1D</sub> receptor subtypes mediating cerebral vasoconstriction. *Cephalalgia*, **15**: 99. 1995.
- Cooke HJ, Sidhu M, Wang YZ. 5-HT activates neural reflexes regulating secretion in the guinea pig colon. *Neurogastroenterol. Motil.*, **9**: 181-6. 1997.
- Cool DR, Leibach FH, Bhalla VK, Mahesh VB, Ganapathy V. Expression and cyclic AMP-dependent regulation of a high affinity serotonin transporter in the human placental choriocarcinoma cell line (JAR). *J. Biol. Chem.*, **266**: 15750-7. 1991.
- Creed F, Fernandes L, Guthrie E, Palmer S, Ratcliffe J, Read N, Rigby C, Thompson D, Tomenson B. The cost-effectiveness of psychotherapy and paroxetine for severe irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, **124(2)**: 303-17. 2003.
- Crowell MD. Role of serotonin in pathophysiology of irritable bowel syndrome. *Br. J. Pharmacol.*, **141(8)**: 1285-93. 2004.
- Crowell MD. The role of serotonin in the pathophysiology of irritable bowel syndrome. *Am. J. Manag. Care*, **7**: S252-60. 2001.
- Dagestad G, Kuipers SD, Messaoudi E, Bramham CR. Chronic fluoxetine induces region-specific changes in translation factor Eif4E and Eef2 activity in the rat brain. *Eur. J. Pharmacol.*, **23**: 2814-8. 2006.
- De Montigny C, Blier P. Electrophysiological aspects of serotonin neuropharmacology: implications for antidepressant treatments. *Neuropharmacology of serotonin*. Green AR, ed., Oxford University Press. pp. 181-95. 1985.
- De Ponti F, Tonini M. Irritable bowel syndrome: new agents targeting serotonin receptor subtypes. *Drugs*, **61(3)**: 317-32. 2001.
- Dewar KM, Grondin L, Carli M, Lima L, Reader TA. [3H]Paroxetine binding and serotonin content of rat cortical areas, hippocampus, neostriatum, ventral mesencephalic tegmentum and midbrain raphe nuclei region following p-chlorophenylalanine and p-chloroamphetamine treatment. *J. Neurochem.*, **58**: 250-7. 1992.
- Dmitriev AD, Factor MI, Segal OL, Pavlova EV, Massino YS, Smirnova MB, Yakoleva DA, Dmitriev DA, Kizim EA, Kolyaskina GI, Brasov OS. Western blot analysis of human and rat serotonin transporter in platelets and brain using site-specific antibodies: Evidence that transporter undergoes endoproteolytic cleavage. *Clin. Chim. Acta*, **356**: 76-94. 2005.

- Dracopoli NC, Fogh J. Polymorphic enzyme analysis of cultured human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.*, **70(3)**: 469-76. 1983.
- Eglen R, Wong EH, Dumuis A, Bockaert J. Central 5-HT<sub>4</sub> receptors. *Trends Pharmacol. Sci.*, **16**: 391-8. 1995.
- El Mansari M, Wiborg O, Mnie-Filali O, Bentruquia N, Sánchez C, Haddjeri N. Allosteric modulation of the effect of escitalopram, paroxetine and fluoxetine: in vitro and in vivo studies. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, **10**: 31-40. 2007.
- Fabre V, Beaufour C, Evrard A, Rioux A, Hanoun N, Lesch KP, Murphy DL, Lanfumey L, Hamon M, Martres MP. Altered expression and functions of serotonin 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> receptors in knock-out mice lacking the 5-HT transporter. *Eur. J. Neurosci.*, **12(7)**: 2299-310. 2000.
- Feldman RS, Meyer JS, Quenzer LF. Affective disorders. En: Feldman R.S., Meyer J.S., Quenzer L.F. (eds). *Principles of neuropharmacology*. Sinauer, Sunderland. pp. 819-61. 1997.
- Francken BJ, Jossen K, Lijnen P, Jurzak M, Luyten WH, Leysen JE. Human 5-hydroxytryptamine(5A) receptors activate coexpressed G(i) and G(o) proteins in *Spodoptera frugiperda* 9 cells. *Mol. Pharmacol.*, **57(5)**: 1034-44. 2000.
- Francken BJ, Jurzak M, Vanhauwe JF, Luyten WH, Leysen JE. The human 5-HT<sub>5A</sub> receptor couples to Gi/Go proteins and inhibits adenylate cyclase in HEK 293 cells. *Eur. J. Pharmacol.*, **361(2-3)**: 299-309. 1998.
- Frazer A, Gerhardt GA, Dawx LC. New views of biogenic amine transporter function: implications for neuropsychopharmacology. *J. Neuropsychopharmacol.*, **2(4)**: 305-20. 1999.
- Frazer A. Pharmacology of antidepressants. *J. Clin. Psychopharmacol.* **17(Suppl. 1)**: 2S-18S. 1997.
- Fujiwara Y, Nelson DL, Kashihara K, Varga E, Roeske WR, Yamamura HI. The cloning and sequence analysis of the rat serotonin-1A receptor gene. *Life Sci.*, **47**: 127-32. 1990.
- Fuller RW, Wong DT. Serotonin uptake and serotonin inhibition. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **600**: 68-78. 1990.
- Fumagalli F, Molteni R, Calabrese F, Frasca A, Racagni G, Riva A. Chronic fluoxetine administration inhibits extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation in rat brain. *J. Neurochem.*, **93**: 1551-60. 2005.
- García-López M. Transportadores axolemales para la captación de neurotransmisores. *Rev. Neurol.*, **29**: 1056-63. 1999.
- Gareri P, Falconi U, De Fazio P, De Sarro G. Conventional and new antidepressant drugs in the elderly. *Prog. Neurobiol.*, **61(4)**: 353-96. 2000.
- Gershon MD, Rothman TP. Developmental abnormalities of the intrinsic nervous system. *Nippon Heikatsukin Gakkai Zasshi*, **21**: 77-8. 1985.
- Gershon MD. The enteric nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.*, **4**: 227-72. 1981.

- Gershon MD, Tack J. The serotonin signalling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. *Gastroenterology*, **132**: 397-414. 2007.
- Gershon MD, Drakontides AB, Ross LL. Serotonin: synthesis and release from the myenteric plexus of the mouse intestine. *Science*, **149**: 197-9. 1965.
- Gershon MD, Sherman DL, Pintar JE. Type-specific localization of monoamine oxidase in the enteric nervous system: relationship to hydroxytryptamine neuropeptides and sympathetic nerves. *J. Comp. Neurol.*, **301**: 191-213. 1990.
- Gershon MD, Takaki M, Tamir H, Branchek T. The enteric neural receptor for 5-hydroxytryptamine. *Experientia*, **41**: 863-8. 1985.
- Gershon MD. Roles played by 5-hydroxytryptamine in the physiology of the bowel. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **13**: 15-30. 1999.
- Gershon MD. Serotonin and its Implication for the management of irritable bowel syndrome. *Rev. Gastroenterol. Disord.*, **3 (suppl. 2)**: S25-S34. 2003.
- Gershon MD. Serotonin receptors and transporters-roles in normal and abnormal gastrointestinal motility. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **20**: 3-14. 2004.
- Gillman PK. A review of serotonin toxicity data: implications for the mechanisms of antidepressant drug action. *Biol. Psychiatry.*, **59(11)**: 1046-51. 2006.
- Gobbi M, Crespi D, Foddi MC, Frascasso C, Mancini L, Parotti L, Mennini T. Effects of chronic treatment with fluoxetine and citalopram on 5-HT uptake, 5-HT<sub>1B</sub> autoreceptors, 5-HT<sub>3</sub> and 5-HT<sub>4</sub> receptors in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **356**: 22-8. 1997.
- Gorard DA, Libby GW, Farthing MJ. Effect of tricyclic antidepressant on small intestinal motility in health and in diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. *Dig. Dis. Sci.*, **40**: 86-95. 1995.
- Grés MC, Julian B, Bourrié M, Meunier V, Roques C, Berger M, Boulenc X, Berger Y, Fabre G. Correlation between oral drug absorption in humans, and apparent drug permeability in TC-7 cells, a human epithelial intestinal cell line: comparison with the parental Caco-2 cell line. *Pharm. Res.*, **15(5)**: 726-33. 1998.
- Grider JR, Piland BE. The peristaltic reflex induced by short-chain fatty acids is mediated by sequential release of 5-HT and neuronal CGRP but not BDNF. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **292(1)**: G429-37. 2007.
- Gronstad KO, DeMagistris L, Dahlstrom A, Nilsson O, Price B, Zinnar MJ, Jaffe BM, Ahlman H. The effects of vagal nerve stimulation on endoluminal release of serotonin and substance P into the feline small intestine. *Scand. J. Gastroenterol.*, **20**: 163-69. 1985.
- Gross-Isseroff R, Israeli M, Biegon A. Autoradiographic analysis of tritiated imipramine binding in the human brain post-mortem: effects of suicide. *Arch. Gen. Psychiatry.*, **46**: 237-41. 1989.
- Haase J, Lillian AM, Magnani F, Williams C. Regulation of the serotonin transporter by interacting proteins. *Biochem. Soc. Trans.*, **29**: 722-8. 2001.

- Haddley K, Vasiliou AS, Ali FR, Paredes UM, Bubb VJ, Quinn JP. Molecular genetics of monoamine transporter: relevance to brain disorders. *Neurochem. Res.* (in press). 2007. DOI: 10.1007/s11064-007-9521-8.
- Hansen MB, Jaffe BM. 5-HT receptor subtypes involved in luminal serotonin-induced secretion in rat intestine in vivo. *J. Surg. Res.*, **56(3)**: 277-87. 1994.
- Hansen MB, Skdhauge E. Signal transduction pathways for serotonin as an intestinal secretagogue. *Comp. Biochem. Physiol.*, **1118(A)**: 283-90. 1997.
- Hansen MB. Serotonin- an intestinal secretagogue- receptor subtypes and intracellular mediators. *Pharmacol. Toxicol.*, **77 (suppl. 1)**: 3-39. 1995.
- Hardcastle J, Hardcastle PT, Klaren PH, Taylor CJ, White SJ. The action of 5-hydroxytryptamine on normal and cystic fibrosis mouse colon: effects on secretion and intracellular calcium. *J. Pharmacol.*, **51(4)**: 449-56. 1999.
- Hardcastle J, Hardcastle PT, Redfem JS. Action of 5-hydroxytryptamine on intestinal ion transport in the rat. *J. Physiol.*, **320**: 41-55. 1981.
- Heisler LK, Chu HM, Brennan TJ, Danao JA, Baiwa P, Parsons LH, Tecott LH. Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptor mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**: 15049-54. 1998.
- Henry LK, Field JR, Adkins EK, Parnas ML, Vaughan RA, Zou M, Newman AH, Blakely RD. TYR95 and ILE172 in transmembrane segments 1 and 3 of human serotonin transporters interact to establish high-affinity recognition of antidepressants. *J. Biol. Chem.*, **881**: 2012-23. 2006.
- Hoffman BJ, Mezey E, Brownstein J. Cloning of a serotonin transporter affected by antidepressants. *Science*, **254**: 579-80. 1991.
- Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **71(4)**: 533-54. 2002.
- Hoyer D, Martin G. 5-HT receptor classification and nomenclature: towards a harmonization with the human genome. *Neuropharmacol.*, **36(4-5)**: 419-28. 1997.
- Hrdina PD, Vu TB. Chronic fluoxetine treatment up-regulates 5-HT uptake sites and 5-HT<sub>2</sub> receptors in rat brain: an autoradiographic study. *Synapse*, **14**: 324-31. 1993.
- Inazu M, Takeda H, Ikoshi H, Sugisawa M, Uchida Y, Matsumiya T. Pharmacological characterization and visualization of the glial serotonin transporter. *Neurochem. Int.*, **39**: 39-49. 2001.
- Ismair MG, Kullak-Ublick GA, Blakely RD, Fried M, Vavricka SR. Tegaserod inhibits the serotonin transporter SERT. *Digestion*, **75(2-3)**: 90-5. 2007.
- Iversen L. Neurotransmitter transporters: fruitful targets for CNS discovery. *Mol. Psychiatry*, **5**: 357-62. 2000.
- Jayanthi LD, Ramamoorthy S, Malesh VB, Leibach FH, Ganapathy V. Calmodulin-dependent regulation of the catalytic function of the human serotonin transporter in placental choriocarcinoma cells. *J. Biol. Chem.*, **269**: 14424-9. 1994.

- Jayanthi LD, Samuvel DJ, Blakely RD, Ramamoorthy S. Evidence for biphasic effects of protein kinase C on serotonin transporter function, endocytosis, and phosphorylation. *Mol. Pharmacol.*, **67**: 2077-87. 2005.
- Jess U, El Far O, Kirsch J, Betz H. Interaction of the C-terminal region of the rat serotonin transporter with MacMARCKS modulates 5-HT uptake regulation by protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **294**(2): 272-9. 2002.
- Kaumann AJ, Sanders L. 5-Hydroxytryptamine causes rate-dependent arrhythmias through 5-HT<sub>4</sub> receptors in human atrium: facilitation by chronic beta-adrenoceptor blockade. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **349**: 331-7. 1994.
- Kellum JM, Budhoo MR, Siriwardena AK, Smith EP, Jebraili SA. Serotonin induces Cl<sup>-</sup> secretion in human jejunal mucosa in vitro via a nonneural pathway at a 5-HT<sub>4</sub> receptor. *Am. J. Physiol.*, **267**(3 Pt1): G357-63. 1994.
- Kilty JE, Lorang D, Amara SG. Cloning and expression of a cocaine-sensitive rat dopamine transporter. *Science*, **254**(5031): 578-9. 1991.
- Kim DY, Camilleri M. Serotonin: A mediator of the brain-gut connection. *Am. J. Gastroenterol.*, **95**: 2698-707. 2000.
- Koed K, Linnet K. The serotonin transporter messenger RNA level in the rat brain is not regulated by antidepressants. *Biol. Psychiatry*, **42**: 1177-80. 1997.
- Kohen R, Metcalf MA, Khan N, Druck T, Huebner K, Lachowicz JE, Meltzer HY, Sibley DR, Roth BL, Hablin MW. Cloning, characterization, and chromosomal localization of a human 5-HT<sub>6</sub> serotonin receptor. *J. Neurochem.*, **66**: 47-56. 1996.
- Koldzic-Zivanovic N, Seitz PK, Watson ChS, Cunningham KA, Thomas ML. Intracellular signaling involved in estrogen regulation of serotonin uptake. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **226**: 33-42. 2004.
- Kuroda Y, Watanabe Y, McEwen BS. Tianeptine decreases both serotonin transporter mRNA and binding sites in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.*, **268**(1): R3-R5. 1994.
- Lazemberger RR, Mitterhauser M, Spindelegger C, Wadsak W, Klein N, Mien LK, Holik A, Attarbaschi T, Mossaheb N, Sacher J, Geiss-Granadia T, Kletter K, Kasper S, Tauscher J. Reduced serotonin-1A receptor binding in social anxiety disorder. *Biol. Psychiatry*, **61**: 1081-9. 2007.
- Lesch KP, Gutknecht L. Pharmacogenetics of the serotonin transporter. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **29**(6): 1062-73. 2005.
- Lesch KP, Aulakh CS, Wolozin BL, Tolliver TJ, Murphy DL. Regional brain expression of serotonin transporter mRNA and its regulation by reuptake inhibiting antidepressants. *Mol. Brain Res.*, **17**: 31-5. 1993.
- Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, Benjamin J, Müller CR, Hamer DH, Murphy DL. Association of anxiety-related traits with polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science*, **274**: 1527-31. 1996.
- Lesch KP, Wolozin BL, Estler HC, Murphy DL, Reiderer P. Isolation of a cDNA encoding the human brain serotonin transporter. *J. Neural Transm. Gen. Sect.*, **91**: 67-72. 1993.

- Lesch KP, Wolozin BL, Murphy DL, Reiderer P. Primary structure of the human platelet serotonin uptake site: identity with the brain serotonin transporter. *J. Neurochem.*, **60**: 2319-22. 1993.
- Lesch KP. Molecular foundation of anxiety disorders. *J. Neural. Transm.*, **108**: 717-46. 2001.
- Lesch KP. Neuroticism and serotonin: a developmental genetic perspective. In: Plomin R., DeFries J., Graig I., McGuffin P. (eds). Behavioral genetics in the postgenomic era. American Psychiatric Press, Washington DC. pp. 389-423. 2003.
- Lesch KP. Serotonergic gene expression and depression: implications for developing novel antidepressants. *J. Affect. Disord.*, **62**: 57-76. 2001.
- Linden DR, Chen JX, Gershon MD, Sharkey KA, Mawe GM. Serotonin availability is increased in mucosa of guinea pigs with TNBS-induced colitis. *Am. J. Physiol.*, **285**: G207-16. 2003.
- Linnet K, Koed K, Wiborg O, Gregersen N. Serotonin depletion decreases serotonin transporter mRNA levels in rat brain. *Brain Res.*, **697**: 251-3. 1995.
- Lopez JF, Chalmers DT, Vazquez DM, Watson SJ, Akil H. Serotonin transporter mRNA in rat brain is regulated by classical antidepressant. *Biol. Psychiatry*, **35**: 287-90. 1994.
- Mager S, Min C, Henry DJ, Chavkin C, Hoffman BJ, Davidson N, Lester HA. Conducting states of a mammalian serotonin transporter. *Neuron*, **12(4)**: 845-59. 1994.
- Mahraoui L, Takeda J, Mesonero J, Chantret I, Dussaulx E, Bell GI, Brot-Laroche E. Regulation of expression of the human fructose transporter (GLUT 5) by cyclic AMP. *J. Biochem.*, **301**: 169-75. 1994.
- Malison RT, Price LH, Berman R, Van Dyck CH, Pelton GH, Carpenter L, Sanacora G, Owens MJ, Nemeroff CB, Rajeevan N, Baldwin RM, Seibyl JP, Innis RB, Charney DS. Reduced brain serotonin transporter availability in major depression as measured by [<sup>123</sup>I]-2 beta-carbomethoxy-3 beta-(4-iodophenyl) tropane and single photon emission computed tomography. *Biol. Psychiatry*, **44(11)**: 1090-8. 1998.
- Manji HK, Drevets WC, Charney DS. The cellular neurobiology of depression. *Nat. Med.*, **7**: 541-7. 2001.
- Mann JJ. Neurobiology of suicidal behaviour. *Nat. Rev. Neurosci.*, **4**: 819-28. 2003.
- Martel F, Keating E. Uptake of 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) by the JAR human placental choriocarcinoma cell line: comparison with 5-hydroxytryptamine. *Placenta*, **24**: 361-9. 2003.
- Martel F, Monteiro R, Lemos C, Vieira-Coelho MA. In vitro and in vivo effect of fluoxetine on the permeability of <sup>3</sup>H-serotonin across rat intestine. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **82(11)**: 940-50. 2004.
- Martel F, Monteiro R, Lemos C. Uptake of serotonin at the apical and basolateral membranes of human intestinal epithelial (Caco-2) cells occurs through the neuronal serotonin transporter (SERT). *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **306(1)**: 355-62. 2003.
- Martin DC, Magnant AD, Kellum JM. Luminal hypertonic solutions stimulate concentration-dependent duodenal serotonin release. *Surgery*, **106**: 325-31. 1989.

- Martin GR. Vascular receptors for 5-hydroxytryptamine: distribution, function and classification. *J. Pharm. Ther.*, **62**: 283-324. 1994.
- Masand PS, Gupta S, Achwart TL, Virk S, Hameed A, Kaplan DS. Open-label treatment with citalopram in patients with irritable bowel syndrome: a pilot study. *J. Clin. Psychiatry*, **7**: 162-6. 2005.
- Matsubara S, Arora RC, Meltzer HY. Serotonergic measures in suicide brain: 5-HT<sub>1A</sub> binding sites in frontal cortex of suicide victims. *J. Neural Transm. Gen Sect.*, **85**: 181-94. 1991.
- Meunier V, Bourrié M, Berger Y, Fabre G. The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. *Cell Biol. Toxicol.*, **11**: 187-94. 1995.
- Miller GM, Yatin SM, De la Garza R, Goulet M, Madras BK. Cloning of dopamine, norepinephrine and serotonin transporters from monkey brain: relevance to cocaine sensitivity. *Mol. Brain Res.*, **87**: 124-143. 2001.
- Molinoff PB, Axelrod J. Biochemistry of catecholamines. *Annu. Rev. Biochem.* 40: 465-500. 1971.
- Money SR, Kimura K, Petroianu A, Jaffe BM. Effects of intravenous calcium on release of serotonin into jejunal lumen and portal circulation. *Dig. Dis. Sci.*, **33**: 977-81. 1988.
- Morikawa O, Sakai N, Obara H, Saito N. Effects of interferon- $\alpha$ , interferon- $\gamma$  and cAMP on the transcriptional regulation of the serotonin transporter. *Eur. J. Pharmacol.*, **349**: 317-324. 1998.
- Mortensen OV, Kristensen AS, Rudnick G, Wiborg O. Molecular cloning, expression and characterization of a bovine serotonin transporter. *Mol. Brain Res.*, **71**: 120-6. 1999.
- Mortensen OV, Kristensen AS, Wiborg O. Species-scanning mutagenesis of the serotonin transporter reveals residues essential in selective, high-affinity recognition of antidepressants. *J. Neurochem.*, **79**: 237-47. 2001.
- Mullins UL, Gianutsos G, Eison AS. Effects of antidepressants on 5-HT<sub>7</sub> receptor regulation in the rat hypothalamus. *Neuropsychopharmacol.*, **21**: 352-67. 1999.
- Myers CL, Lazo JS, Pitt BR. Translocation of protein kinase C is associated with inhibition of 5-HT uptake by cultured endothelial cells. *Am. J. Physiol.*, **257**: L253-8. 1989.
- Nagakura Y, Kiso T, Miyata K, Ito H, Iwaoka K, Yamaguchi T. The effect of selective 5-HT<sub>3</sub> receptor agonist on ferret gut motility. *Life Sci.*, **71**: 1313-9. 2002.
- Nestler EJ. Antidepressant treatments in the 21<sup>st</sup> century. *Biol. Psychiatry*, **44**: 526-33. 1998.
- Neubauer HA, Hanmsen CG, Wiborg O. Dissection of fan allosteric mechanism on the serotonin transporter: a cross-species study. *Mol. Pharmacol.*, **69**: 1242-50. 2006.
- Neumaier JF, Root DC, Hamblin MW. Chronic fluoxetine reduces serotonin transporter mRNA and 5-HT<sub>1B</sub> mRNA in a sequential manner in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuropsychopharmacol.*, **15**: 515-22. 1996.
- Ni YG, Miledi R. Blockage of 5-HT<sub>2C</sub> serotonin receptors by fluoxetine (Prozac). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**: 2036-40. 1997.

- Norum JH, Methi T, Mattingly RR, Levy FO. Endogenous expression and protein kinase A-dependent phosphorylation of the guanine nucleotide exchange factor Ras-GRF1 in human embryonic kidney 293 cells. *FEBS J.*, **272**: 2304-16. 2005.
- O'Hara JR, Ho W, Linden DR, Mawe GM, Sharkey KA. Enteroendocrine cells and 5-HT availability are altered in mucosa of guinea pigs with TNBS ileitis. *Am. J. Physiol.*, **287**: G998-G1007. 2004.
- Ormsbee III HS, Fondacaro JD. Action of serotonin on the gastrointestinal tract. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **178**: 333-8. 1985.
- Overstreet DH. The Flinders sensitive line rats: a genetic animal model of depression. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **17**(1): 51-68. 1993.
- Pace F, Coremans G, Dapoigny M, Müller-Lissner SA, Smout A, Stockbruegger RW, Whorwell PJ. Therapy of irritable bowel syndrome: an overview. *Digestion*, **56**: 433-42. 1995.
- Pacholczyk T, Blakely RD, Amara SG. Cloning and expression of cocaine and antidepressant-sensitive human noradrenaline transporter. *Nature*, **350**: 350-4. 1991.
- Pan H, Galligan JJ. 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>4</sub> receptors mediate inhibition and facilitation of fast synaptic transmission in enteric neurons. *Am. J. Physiol.*, **266**: G230-8. 1994.
- Pan H, Gershon MD. Activation of intrinsic afferent pathways in submucosal ganglia of the guinea pig small intestine. *J. Neurosci.*, **20**: 3295-309. 2000.
- Parks CL, Robinson PS, Sibille E, Shenk T, Toth M. Increased anxiety of mice lacking the serotonin 1A receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**: 10734-9. 1998.
- Pata C, Erdal E, Derici E, Yazar A, Kanink A, Ullu O. Serotonin transporter gene polymorphism in irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol.*, **97**: 1780-4. 2002.
- Peart WS, Andrews TM, Robertson JI. Carcinoid syndrome. Serotonin release induced with intravenous adrenaline or noradrenaline. *Lancet*, **1**: 577-8. 1961.
- Pecknold J, Ini LJ, Suranyi-Cadotte BE, Bernier B, Luthe L, Nair NP, Meaney MJ. Studies of a neurochemical link between depression, anxiety, and stress from [3H]imipramine and [3H]paroxetine binding on human platelets. *Biol. Psychiatry*, **36**(5): 281-91. 1994.
- Pejchal T, A. Foley M, Kosofsky BE, Waeber C. Chronic fluoxetine treatment selectively uncouples raphe 5-HT<sub>1A</sub> receptors as measured by [<sup>35</sup>S]-GTPγS autoradiography. *Br. J. Pharmacol.*, **135**: 1115-22. 2002.
- Perry EK, Marshall EF, Blessed G, Tomlinson BE, Perry RH. Decreased imipramine binding in the brain of patients with depressive illness. *Br. J. Psychiatry*, **142**: 188-92. 1983.
- Piñeyro G, Blier P, Dennis T, de Montigny C. Desensitization of the neuronal 5-HT carrier following its long-term blockade. *J. Neurosci.*, **14**: 3036-47. 1994.
- Piñeyro G, DeMontigny C, Weiss M, Blier P. Autoregulatory properties of dorsal raphe neurones: possible role of electronic coupling and 5-HT<sub>1D</sub> receptors in the rat brain. *Synapse*, **22**: 54-62. 1996.



- Pinto M, Robine-Leon S, Appay MD, Kedinger M, Triadou N, Dussaulx E, Lacroix B, Simon-Assmann P, Haffen K, Fogh J, Zweibaum A. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell*, **47**: 323-30. 1983.
- Plassat JL, Boschert U, Amlaiky N, Hen R. The mouse 5HT<sub>5</sub> receptor reveals a remarkable heterogeneity within the 5HT<sub>1D</sub> receptor family. *EMBO J.*, **11**: 4779-86. 1992.
- Plenge P, Mellerup ET, Laursen H. Affinity modulation of [<sup>3</sup>H]imipramine, [<sup>3</sup>H]paroxetine, [<sup>3</sup>H]citalopram binding to the 5-HT transporter from brain and platelets. *Eur. J. Pharmacol.*, **206**: 243-50. 1991.
- Plenge P, Mellerup ET. Antidepressive drugs can change the affinity of [<sup>3</sup>H]imipramine and [<sup>3</sup>H]citalopram binding to platelet and neuronal membranes. *Eur. J. Pharmacol.* **119**: 1-8. 1985.
- Prins NH, Akkermans LM, Lefebvre RA, Schuurkes JA. 5-HT<sub>4</sub> receptors on cholinergic nerves involved in contractility of canine and human large intestine longitudinal muscle. *Br. J. Pharmacol.*, **131**: 927-32. 2000.
- Purselle DC, Nemeroff CB. Serotonin transporter: a potential substrate in the biological suicide. *Neuropsychopharmacol.*, **28**: 613-9. 2003.
- Qian Y, Galli A, Ramamoorthy S, Risso S, DeFelice LJ, Blakely RD. Protein kinase C activation regulates human serotonin transporters in HEK-293 cells via altered cell surface expression. *J. Neurosci.*, **17**: 45-57. 1997.
- Qian Y, Melikian HE, Rye DB, Levey AI, Blakely RD. Identification and characterization of antidepressant-sensitive serotonin transporter proteins using site-specific antibodies. *J. Neurosci.*, **15**: 1261-74. 1995.
- Quintana J. Platelet serotonin and plasma tryptophan decreases in endogenous depression. Clinical, therapeutic and biological correlations. *J. Affect. Disord.*, **24**: 55-62. 1992.
- Racke K, Schworer H. Characterization of the role of calcium and sodium channels in the stimulus secretion coupling of 5-hydroxytryptamine release from porcine enterochromaffin cells. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **347**: 1-8. 1993.
- Rahme MM, Cotter B, Leistad E, Wadhwa MK, Mohabir R, Ford AP, Eglern RM, Feld GK. Electrophysiological and antiarrhythmic effects of the atrial selective 5-HT(4) receptor antagonist RS-100302 in experimental atrial flutter and fibrillation. *Circulation*, **100**: 2010-7. 1999.
- Ramamoorthy S, Bauman AL, Moore KR, Ham H, Yang-Feng T, Chang AS, Ganapathy V, Blakely RD. Antidepressant and cocaine-sensitive human serotonin transporter: molecular cloning, expression and chromosomal localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**(6): 2542-6. 1993.
- Ramamoorthy S, Blakely RD. Phosphorylation and sequestration of serotonin transporters differentially modulated by psychostimulants. *Science*, **285**: 763-6. 1999.
- Ramamoorthy S, Cool DR, Mahesh VB, Leibach FH, Melikian HE, Blakely RD, Ganapathy V. Regulation of the human serotonin transporter. *J. Biol. Chem.*, **268**: 21626-31. 1993.
- Ramamoorthy S, Giovanetti E, Qian Y, Blakely RD. Phosphorylation and regulation of antidepressant-sensitive serotonin transporters. *J. Biol. Chem.*, **23**: 2458-66. 1998.

- Ramamoorthy S, Samuvel DJ, Buck ER, Rudnick G, Jayanthi LD. Phosphorylation on threonine residue 276 is required for acute regulation of serotonin transporter by cyclic GMP. *J. Biol. Chem.*, **282**: 11639-47. 2007.
- Rapport MM, Green AA, Page IH. Crystalline Serotonin. *Science*, **108(2804)**: 329-30. 1948.
- Reith ME, Li MY, Yan OS. Extracellular dopamine, norepinephrine, and serotonin in the ventral tegmental area and nucleus accumbens of freely moving rats during intracerebral dialysis following systemic administration of cocaine and other uptake blockers. *Psychopharmacol.*, **134(3)**: 309-17. 1997.
- Reynolds GP, Mason SL, Meldrum A, De Keczer S, Parnes H, Eglen RM, Wong EH. 5-hydroxytryptamine (5-HT)<sub>4</sub> receptors in post mortem human brain tissue: distribution, pharmacology and effects of neurodegenerative diseases. *Br. J. Pharmacol.*, **114**: 993-8. 1995.
- Roberts C, Price GW, Gaster L, Jones BJ, Middlemiss DN, Routledge C. Importance of h5-HT<sub>1B</sub> receptor selectivity for 5-HT terminal autoreceptor activity: an in vivo microdialysis study in the freely-moving guinea-pig. *Neuropharmacol.*, **36**: 549-57. 1997.
- Roman DL, Walline CC, Rodríguez GJ, Barrer EL. Interactions of antidepressant with the serotonin transporter: a contemporary molecular analysis. *Eur. J. Pharmacol.* **479**: 53-63. 2003.
- Roth BL, Craigo SC, Choudhary MS, Uluer A, Monsma FJ, Shen Y, Meltzer HY, Sibley D.R. Binding of typical and atypical antipsychotic agents to 5-hydroxytryptamine-6 and 5-hydroxytryptamine-7 receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **268**: 1403-10. 1994.
- Rousset M. The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2; two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie*, **68(9)**: 1035-40. 1986.
- Roxanne A. Vaughan. Phosphorylation and Regulation of Psychostimulant-Sensitive Neurotransmitter Transporters. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **310**: 1-7. 2004.
- Rudnick G, Clark J. From the synapse to vesicle: the reuptake and storage of biogenic amine neurotransmitters. *Biochim. Biophys. Acta*, **1144(3)**: 249-63. 1993.
- Rudnick G. Active transport of 5-hydroxytryptamine by plasma membrane vesicles isolated from human blood platelets. *J. Biol. Chem.*, **252(7)**: 2170-4. 1977.
- Sakai N, Sasaki K, Nakashita M, Honda S, Ikegaki N, Saito N. Modulation of serotonin transporter activity by a protein kinase C activator and an inhibitor of type 1 and 2A serine/threonine phosphatases. *J. Neurochem.*, **68**: 2618-24. 1997.
- Salvador MT, Murillo MD, Rodríguez-Yoldi MC, Alcalde AI, Mesonero JE, Rodríguez-Yoldi MJ. Effects of serotonin on the physiology of the rabbit small intestine. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **78**: 359-66. 2000.
- Salvador MT, Rodríguez-Yoldi MC, Alcalde AI, Marco R, Rodríguez-Yoldi MJ. Serotonin-induced changes in L-leucine transport across rabbit jejunum. *Life Sci.*, **59(15)**: 1269-81. 1996.
- Salvador MT, Rodríguez-Yoldi MC, Alcalde AI, Rodríguez-Yoldi MJ. 5-HT receptor subtypes involved in the serotonin-induced inhibition of L-leucine absorption in rabbit jejunum. *Life Sci.*, **61**: 309-18. 1997.

- Samuvel DJ, Jayanthi LD, Bhat NR, Ramamoorthy S. A role for p38 mitogen-activated protein kinase in the regulation of the serotonin transporter: evidence for distinct cellular mechanisms involved in transporter surface expression. *J. Neurosci.*, **25**: 29-41. 2005.
- Sandhu SK, Ross LS, Gill SS. A cocaine insensitive chimeric insect serotonin transporter reveals domains critical for cocaine interaction. *Eur. J. Biochem.*, **269**: 3934-44. 2002.
- Schloss P, Henn FA. New insights into the mechanism of antidepressant therapy. *Pharmacol. Ther.*, **102**: 47-60. 2004.
- Schmid JA, Just H, Sitte HH. Impact of oligomerization on the function of the human serotonin transporter. *Biochem. Soc. Trans.*, **29**: 732-6. 2001.
- Schmidt JA, Scholze P, Kudlacek O, Freissmuth M, Singer EA, Sitte HH. Oligomerization of the human serotonin transporter and of the rat GABA transporter 1 visualized by fluorescence resonance energy transfer microscopy in living cells. *J. Biol. Chem.*, **276**(6): 3805-10. 2001.
- Schroeter S, Levey AI, Blakely RD. Polarized expression of the antidepressant-sensitive serotonin transporter in epinephrine-synthesizing chromaffin cells of the rat adrenal gland. *Mol. Cell Neurosci.*, **9**(3): 170-84. 1997.
- Shimada S, Kitayama S, Lin CL, Patel A, Nanthakumar E, Gregor P, Kuhar M, Uhl G. Cloning and expression of a cocaine-sensitive dopamine transporter complementary DNA. *Science*, **254**: 576-8. 1991.
- Siriwardena AK, Burdhuo MR, Smith EP, Kellum JM. A 5-HT<sub>3</sub> receptor agonist induces neurally mediated chloride transport in rat distal colon. *J. Surg. Res.*, **55**(1): 55-9. 1993.
- Sleight AJ, Carolo C, Petit N, Zwingelstein C, Bourson A. Identification of 5-hydroxytryptamine 7 receptor binding sites in rat hypothalamus: sensitivity to chronic antidepressant treatment. *Mol. Pharmacol.*, **47**: 99-103. 1995.
- Sneddon JM. Blood platelets as a model for monoamine-containing neurones. *Prog. Neurobiol.*, **1**: 151-98. 1973.
- Sora I, Wichems C, Takahashi N, Li X.F, Zeng Z, Revay R, Lesch KP, Murphy DL, Uhl GR. Cocaine reward models: conditioned place preference can be established in dopamine- and in serotonin-transporter knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**(13): 7699-704. 1998.
- Spiller RC, Jenkins D, Thornley JP, Hebden JM, Wright T, Skinner M, Neal KR. Increased rectal mucosal enteroendocrine cells, T lymphocytes, and increased gut permeability following acute *Campylobacter* enteritis and in post-dysenteric irritable bowel syndrome. *Gut*, **47**(6): 804-11. 2000.
- Spurlock G, Buckland P, O'Donovan, McGuffin P. Lack of effect of antidepressant drugs on the levels of mRNAs encoding serotonergic receptors, synthetic enzymes and 5-HT transporter. *Neuropharmacol.*, **33**: 433-40. 1994.
- Stanley M, Virgilio J, Gershon S. Tritiated imipramine binding sites are decreased in the frontal cortex of suicides. *Science*, **216**: 1337-9. 1982.
- Sullivan GM, Oqueando MA, Simpson N, Van Heertum RL, Mann JJ, Parsev RV. Brain serotonin1A receptor binding in major depression is related to psychic and somatic anxiety. *Biol. Psychiatry*, **58**: 947-54. 2005.

- Sundaram U, Knickelbein RG, Dobbins JW. Mechanism of intestinal secretion: effect of cyclic AMP on rabbit ileal crypt and villus cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88(14)**: 6249-53. 1991.
- Tate CG, Blakely RD. The effect of the N-linked glycosylation on activity of the Na and Cl-dependent serotonin transporter expressed using recombinant baculovirus in insect cells. *J. Biol. Chem.*, **259**: 26303-10. 1994.
- Thome J, Sakai N, Shin K-H, Steffen C, Zhang Y-J, Impey S, Storm D, Duman RS. cAMP response element-mediated gene transcription is up-regulated by chronic antidepressant treatment. *J. Neurosci.*, **20(11)**: 4030-6. 2000.
- Tiihonen J, Kuikka JT, Bergstrom KA, Karhu J, Viinamaki H, Lehtonen J, Hallikainen T, Yang J, Hakola P. Single-photon emission tomography imaging of monoamine transporters in impulsive violent behaviour. *Eur. J. Nucl. Med.*, **24(10)**: 1253-60. 1997.
- Tonini M, Vicina R, Cervio E, De Ponti F, De Giorgio R, Barbara G, Stanghellini V, Dellabianca A, Sternini C. 5-HT<sub>7</sub> receptors modulate peristalsis and accommodation in the guinea pig ileum. *Gastroenterology*, **129**: 1557-66. 2005.
- Torres GE, Yao WD, Mohn AR, Ouan H, Kim KM, Levey AL, Staudinger J, Caron MG. Functional interaction between monoamine plasma membrane transporters and the synaptic PDZ domain-containing protein PICK1. *Neuron.*, **30(1)**: 121-34. 2001.
- Torres GE, Gainetdinov RR, Caron MG. Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. *Nat. Rev. Neurosci.*, **4**: 13-25. 2003.
- Tunnicliff G. Molecular basis of buspirone's anxiolytic action. *Pharmacol. Toxicol.*, **69**: 149-56. 1991.
- Turkel SB, Nadala JG, Wincor MZ. Possible serotonin syndrome in association with 5-HT<sub>3</sub> antagonist agents. *Psychosomatics*, **42(3)**: 258-60. 2001.
- Twarog BM, Page IH. Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *Am. J. Physiol.*, **175**: 157-61. 1953.
- Uzdin TB, Mezey E, Chen C, Brownstein MJ, Hoffman BJ. Cloning of the cocaine-sensitive bovine dopamine transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**: 11168-71. 1991.
- Wade PR, Chen J, Jaffe B, Kassem IS, Blakely RD, Gershon MD. Localization and function of a 5-HT transporter in crypt epithelial of the gastrointestinal tract. *J. Neurosci.*, **16**: 2352-64. 1996.
- Wade PR, Tamir H, Kirchgessner AL, Gershon MD. Analysis of the role of 5-HT in the enteric nervous system using anti-idiotypic antibodies to 5-HT receptors. *Am. J. Physiol.*, **266**: G403-16. 1994.
- Watanabe Y, Sakai RR, McEwen BS, Mendelson S. Stress and antidepressant effects on hippocampal and cortical 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors and transport sites for serotonin. *Brain Res.*, **615**: 87-94. 1993.
- Wennogle LP, Meyerson LR. Serotonin uptake inhibitors differentially modulate high affinity imipramine dissociation in human platelet membranes. *Life Sci.*, **36**: 1541-50. 1985.
- White KJ, Walline CC, Barker EL. Serotonin transporters: implications for antidepressant drug development. *AAPS J.*, **7(2)**: E421-33. 2005.

- Wihlback AC, Sundstrom-Poromaa I, Allard P, Miomdal T, Spigset O, Backstrom T. Influence of postmenopausal hormone replacement therapy on platelet serotonin uptake site and serotonin 2A receptor binding. *Obstet. Gynecol.*, **98(3)**: 450-7. 2001.
- Yura A, Kiuchi Y, Uchikawa T, Uchida J, Yamazaki K, Oguchi K. Possible involvement of calmodulin-dependent kinases in Ca(2+)-dependent enhancement of [3H]5-hydroxytryptamine uptake in rat cortex. *Brain Res.*, **738(1)**: 96-102. 1996.
- Zhang YW, Rudnick G. Serotonin transporter mutations associated with obsessive-compulsive disorder and phosphorylation alter binding affinity of inhibitors. *Neuropharmacol.*, **49**: 791-7. 2005.
- Zhu CB, Hewlett WA, Feoktistov I, Biaggioni I, Blakely RD. Adenosine receptor, protein kinase G, and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent up-regulation of serotonin transporters involves both transporter trafficking and activation. *Mol. Pharmacol.*, **65**: 1462-74. 2004.
- Zweibaum A, Laburthe M, Grasset E, Louvard D. Use of cultured cell lines in studies of intestinal cell differentiation and function. Intestinal absorption and secretion. Handbook of Physiology, section 6. The Gastrointestinal System. *Am. Physiol. Soc.*, Bethesda. pp. 223-55. 1991.



## **VII. ANEXOS**





## **VII.1. Difusión de los resultados**



## DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS

El trabajo de investigación descrito en esta memoria ha sido presentado en varios congresos nacionales e internacionales y ha dado lugar a la publicación de los siguientes artículos

## ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

**Iceta R**, Mesonero JE, Aramayona JJ, Alcalde AI. Molecular characterization and intracellular regulation of the human serotonin transporter in Caco-2 cells. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 57(1): 119-30. 2006.

**Iceta R**, Mesonero JE, Alcalde AI. Effect of long-term fluoxetine treatment on the human serotonin transporter in Caco-2 cells. *Life Sciences*, 80(16): 1517-24. 2007.

**Iceta R**, Aramayona JJ, Mesonero JE, Alcalde AI. Regulation of the human serotonin transporter mediated by long-term action of serotonin in Caco-2 cells. *Acta Physiologica*. OnlineEarly Article: Published article online: 14-Dec-2007. doi 10.1111/j.1748-1716.2007.01793.x (2007).

## CONTRIBUCIONES A CONGRESOS

**Iceta R**, Mesonero JE, Alcalde AI. La línea celular Caco-2 como modelo in vitro para estudios fisiológicos intestinales. III congreso de Ciencias Biomédicas y Veterinarias. Madrid, 25-27 abril. 2004.

**Iceta R**, Mesonero JE, Aramayona JJ, Bertol V, Alcalde AI. Characterization of human serotonin transporter (hSERT) and validation of the human intestinal Caco-2 cell line as a good experimental model for its study. XXXIII congreso de la Sociedad Española de Fisiología. 10-13 febrero, Sevilla. 2005.  
*Publicado en: J. Physiol. Biochem.*, 61(1): 183. (2005).

**Iceta R**, Mesonero JE, Aramayona JJ, Gros B, Alcalde AI. Study of the effect of Caco-2 cell fluoxetine treatment on the 5-HT transport by the human serotonin transporter (hSERT). XXXIII congreso de la Sociedad Española de Fisiología. 10-13 febrero, Sevilla. 2005.  
*Publicado en: J. Physiol. Biochem.*, 61(1): 186. (2005).

**Iceta R**, Mesonero JE, Aramayona JJ, Gros B, Alcalde AI. Long-term treatment with fluoxetine affects the serotonin transporter in human intestinal Caco-2 cells. 20<sup>th</sup> meeting of the European Intestinal Transport Group (EITG)., 24-27 septiembre, Oleron (Francia). 2005.  
*Publicado en: J. Physiol. Biochem.*, 61(4): 600. (2005).

**Iceta R**, Mesonero JE, Aramayona JJ, Plaza MA, Gros B, Bertol V, Alcalde AI. Regulación del sistema serotoninérgico mediado por el transportador SERT: modelo en células epiteliales intestinales. XXX congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. 12-15 septiembre, Málaga. 2007.



## **VII.2. Artículo 1**

**Iceta R, Mesonero JE, Aramayona JJ, Alcalde AI. Molecular characterization and intracellular regulation of the human serotonin transporter in Caco-2 cells.**

*Journal of Physiology and Pharmacology*, 57(1): 119-130. 2006.



R. ICETA, J.E. MESONERO, J.J. ARAMAYONA, A.I. ALCALDE\*

MOLECULAR CHARACTERIZATION AND INTRACELLULAR  
REGULATION OF THE HUMAN SEROTONIN TRANSPORTER  
IN CACO-2 CELLSDepartment of Pharmacology and Physiology. Faculty of Veterinary Sciences.  
University of Zaragoza. Zaragoza. Spain.

The serotonin transporter (SERT) has shown itself to be an effective pharmacological target in the treatment of mood disorders and some kinds of gastrointestinal syndromes. Most of the molecular studies of SERT in humans have been carried out using heterologous models. In this work, we have investigated the human enterocyte-like Caco-2 cell line as a potential "in vitro" model to study the human SERT. The results show that these cells express a SERT mRNA identical to the human brain SERT, and a 70 kDa protein immunodetected using a specific antibody. The SERT activity levels in Caco-2 cells increased in correlation with the onset and maintenance of the morphological and functional differentiation of the cells. Caco-2 SERT was also shown to be a high affinity ( $K_t=0.216 \mu\text{M}$ ) saturable,  $\text{Na}^+$ -dependent transporter that was inhibited by fluoxetine ( $\text{IC}_{50}=17.6 \text{ nM}$ ). In addition, SERT activity was inhibited by the intracellular modulators protein kinase C and cAMP, either after short or long-term treatment. In short, the expression and molecular characteristics of the human SERT in Caco-2 cells indicate that this cell line may be an ideal tool to study in vitro the physiology and pharmacology of human SERT.

Key words: *Caco-2 cells, serotonin, transporter, regulation, protein kinase C, cAMP*

## INTRODUCTION

Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) is a neurotransmitter with diverse central and peripheral actions mediated by a large family of plasma membrane receptors. The serotonin transporter (SERT) is a specific transporter protein that terminates the serotonergic activity by rapid re-uptake of 5-HT into the cells.

120

The expression and the activity of SERT have been described in the central and enteric nervous system (1, 2) and in specialised non-neuronal cells including platelets (3), placental syncytiotrophoblasts (4) and epithelial cells of the gastrointestinal mucosa (5, 6, 7). The alteration of the serotonergic activity has been shown to be involved in many pathological processes, especially in neuropsychiatric disorders, such as depression and mood disorders (8, 9), the intestinal pathogenesis of irritable bowel syndrome (IBS) (10, 11) and intestinal inflammation (12, 13). Consequently, SERT has become an interesting molecular target for multiple therapeutic compounds that modulate the 5-HT availability by inhibiting the SERT activity.

The interest in the determination of both the molecular characteristics and the regulation of human SERT (hSERT) has been enormous over the course of the last decade, but the difficulty in obtaining human tissues and the ethical limitations in human experiments have obliged researchers to look for alternative models. Most of the hSERT molecular studies have been carried out using hSERT heterologously expressed in human cell lines (14-17) and, to a lesser extent, in cells that express the SERT such as JAR, human placental cells, (18, 19) or platelets (3, 20).

5-HT is mainly produced by the enterochromaffin cells of the gastrointestinal tract, so the enterocytes of the intestinal epithelium may play an important role in the modulation of 5-HT availability and, consequently, in its intestinal effects. In culture, and after confluence, the human enterocyte-like Caco-2 cell line expresses similar morphological characteristics, as well as most of the functional properties of differentiated small intestine enterocytes (21), and this cell line has been used as an "in vitro" model to study several intestinal epithelial processes. Furthermore, recent results have demonstrated 5-HT transport in Caco-2 cells (22, 23), although the molecular characteristics and the regulation of this transport are not known.

In this work we have studied the hSERT expression in Caco-2 cells, the molecular characteristics (mRNA and protein) and the hSERT regulation mediated by short and long-term action of either protein kinase C (PKC) or cAMP. The results obtained have demonstrated the native expression of hSERT in the human enterocyte-like Caco-2 cell line. This fact, together with the special characteristics of the culture of Caco-2 cells (e.g. a long time culture, conserving the same morphological, molecular and functional properties), indicate that Caco-2 cells may be an excellent "in vitro" model to study the hSERT function and regulation.

#### MATERIALS AND METHODS

*Cell culture.* Caco-2/TC7 cells were kindly provided by Dr. Edith Brot-Laroche (U-505 INSERM). The cells were cultured at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and were kept in high glucose DMEM supplemented with 2 mM glutamine, 50 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin, 1% non-essential amino acids and 20% foetal bovine serum (Invitrogen, USA). The cells were passaged enzymatically (0.25% trypsin- 1mM EDTA) and sub-cultured in 25 or 75 cm<sup>2</sup> plastic



culture flasks (Sarstedt, Germany). The medium was changed 48 hours after seeding and daily thereafter. The cells were always used between passages 19 and 40. For 5-HT uptake assays, cells were seeded in 24-well plates at a density of  $4 \times 10^4$  cells/well, and most of the uptake measurements were carried out 14 days after seeding (9 days after confluence). In the study of the 5-HT uptake at different degrees of cell differentiation, the cells were used at the following conditions: Preconfluence (four days after seeding) and 0, 2, 5, 10 and 12 days post-confluence. In studies of regulation, the cells were treated with the PKC activator phorbol myristate acetate (PMA) and the cell permeable cAMP analog dibutyryl cAMP (d-cAMP), by addition to the culture medium at different times before the uptake determination. In most of the uptake experiments, the cell medium was free of foetal bovine serum 6 h before the transport measurement.

*RT-PCR, cDNA cloning and sequencing.* Total RNA was extracted and purified from Caco-2 cell cultures with the QuickPrep Total RNA extraction kit, according to the manufacturer's instructions (Amersham Biosciences, UK). The extracted RNA was then used as a template for first-strand cDNA synthesis using oligo(dT) primers and a modified M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). Negative amplification control was performed in the absence of Reverse Transcriptase. One tenth of the resultant cDNA was used for PCR amplification. Specific oligonucleotide primers for hSERT (18) (Genbank accession NM\_001045) were designed to amplify the full-length coding sequence: Primer sequences (5'-3'), sense AAATCCAAGCACCCAGAGAT and anti-sense AGACTGTGTCCCTGTGGAGA were used to obtain a PCR product of 2105 bp, which encodes the full open reading frame. Thirty cycles of PCR amplification were carried out as follows: 94°C for 30 s, 56°C for 30 s and 68°C for 2 min 30 s. The size of the PCR product was confirmed by electrophoresing in a 1% agarose gel.

The cDNA was purified with StrataPrep PCR Purification kit (Stratagene, La Jolla, Ca, USA) and cloned into pPCR-Script Amp SK(+) vector (PCR-Script Amp Cloning Kit, Stratagene). Sequencing was automatically performed with AbiPrism 377 (PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA, USA).

*Caco-2 biotinylation and purification of cell surface proteins.* Protein biotinylation was carried out with a Cell Surface Protein Biotinylation and Purification kit (Pierce, Rockford, USA) according to the manufacturer's instructions. Caco-2 cells seeded in 75 cm<sup>2</sup> flasks were washed with ice-cold-PBS and incubated with Sulfo-NHS-SS-Biotin for 1 hour at 4°C. After quenching, the cells were scraped and centrifuged at 500g for 3 minutes. The pellet was re-suspended with lysis buffer and the cells were disrupted by sonication (five 1 second bursts, 60W). One sample was taken from the lysate for protein analysis measured by the Bradford method (Bio-rad) using bovine serum albumin as standard. The cell lysate was centrifuged at 15000g for 10 minutes. The supernatant was added to a column with immobilized neutravidin gel and, after incubation for 1 hour, the mixture was centrifuged at 1000g for 1 minute and the flow-through was discarded. The column was washed with washing buffer and centrifuged at 1000g for 1 minute three times. Finally, SDS-PAGE sample buffer with 50 mM DTT was added to the gel in the column, and the reaction was incubated for 1 hour. The column was centrifuged for 2 minutes at 1000g and the flow-through was used for Western blotting analysis.

*Western blotting.* Purified cell surface protein samples and Caco-2 cell lysate (60 µg) were electrophoresed in 9% SDS-PAGE gels then transferred to PVDF membranes by electroblotting. The blots were blocked with 5% non-fat dried milk plus 1% BSA, and probed with a rabbit polyclonal anti-rat SERT 1:5000 (AB1594, Chemicon, Temecula, Ca, USA). The primary antibody was detected using a secondary donkey anti-rabbit Ig coupled to horseradish peroxidase (Santa Cruz Biotechnologies, Ca, USA) and the ECL plus detection system (Amersham). The signal was visualized with X-ray films (Hyperfilm MP, Amersham).

*5-HT uptake studies.* Uptake measurements were performed on cells attached to 24-well plates. The transport medium contained in mM: 137 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 MgSO<sub>2</sub>, 2.5 CaCl<sub>2</sub>,

122

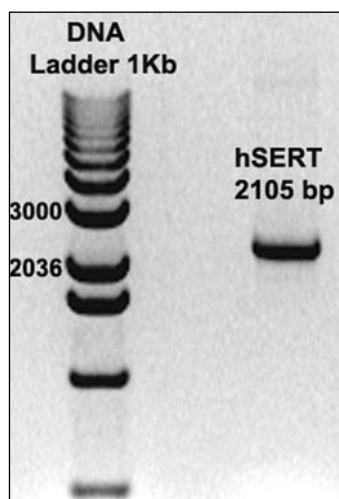
10 HEPES pH 7.4, 4 glutamine, 0.1% bovine serum albumin and both 5-HT and [ $^3\text{H}$ ]-5-HT (specific activity 11.6 Ci/mmol, Amersham). In the  $\text{Na}^+$ -free medium, NaCl was replaced isosmotically by choline chloride (CholCl). Before the uptake measurement, the cells were pre-incubated at 37°C in an atmosphere of 5%  $\text{CO}_2$  with substrate-free transport medium (without 5-HT) for 30 min. The cells were then immediately washed twice with substrate-free transport medium at 37°, and incubated with transport medium at 37°C for 6 minutes. At the end of the incubation period, the medium was removed and the cells were washed twice with ice-cold substrate-free transport medium containing 5-HT 1 mM. The cells were lysed in 0.1 M NaOH and counted for radioactivity and protein content. The radioactivity values of the samples were transformed into pmol/mg protein.

*Statistical analysis.* All results are expressed as means  $\pm$  SEM. Statistical comparisons were performed using one-way ANOVA followed by a Dunnet post-test with a confident interval of the 99% ( $P < 0.01$ ). Kinetic analysis of the 5-HT transport values was performed by non-linear regression, fitting the results to an equation containing a saturable component (Michaelis-Menten). The statistical analysis, the fluoxetine  $\text{IC}_{50}$  and the 5-HT transport kinetic constants were calculated with the computer-assisted Prism GraphPad Program (Prism version 2.0 for iMac computer).

## RESULTS

*SERT mRNA and protein identification in Caco-2 cells.* A product of 2105 bp of length was amplified by RT-PCR from RNA of differentiated Caco-2 cells (Fig. 1) as described in Materials and Methods. This PCR product was cloned and sequenced (GenBank accession number AY902473). The nucleotide sequence of the amplified cDNA was compared with the BLAST database, confirming that it is identical to the human brain Na/Cl-dependent SERT.

The SERT protein was analysed by Western blotting after biotinylation and purification of the Caco-2 surface proteins. This analysis has shown that both the



*Fig. 1.* hSERT mRNA expression in Caco-2 cells. RT-PCR analysis was performed with RNA from Caco-2 cells using specific primers for human SERT, as described in Materials and Methods. PCR product (2105 bp) was electrophoresed in an agarose gel and visualised with ethidium bromide.

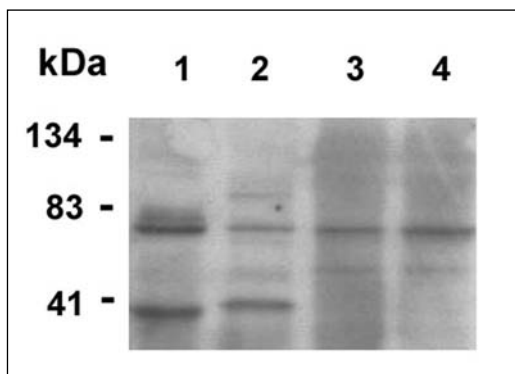


Fig. 2. Western blotting analysis of SERT protein in Caco-2 cells. SERT immunodetection in purified cell surface protein samples and Caco-2 cell lysate (60 µg) (lines 3 and 4, respectively), compared with rat intestinal mucosa (line 1) and rat brain synaptosomes (line 2) as control.

cellular lysate (total protein) and the purified protein fraction of Caco-2 cells express a protein immunodetected by a specific primary antibody anti-rat SERT, which reacts with hSERT (Fig. 2, lines 3 and 4). The molecular size of the immunodetected protein in Caco-2 cells, about 70 kDa, was similar to the SERT size detected in rat intestinal mucosa and brain, used as SERT control in the same experiment (Fig 2, lines 1 and 2, respectively).

*Study of the 5-HT uptake as a function of Caco-2 cell differentiation.* After identification of the mRNA and the protein, the aim of the experiments was to determine the SERT functionality and its relationship with the degree of cell growth

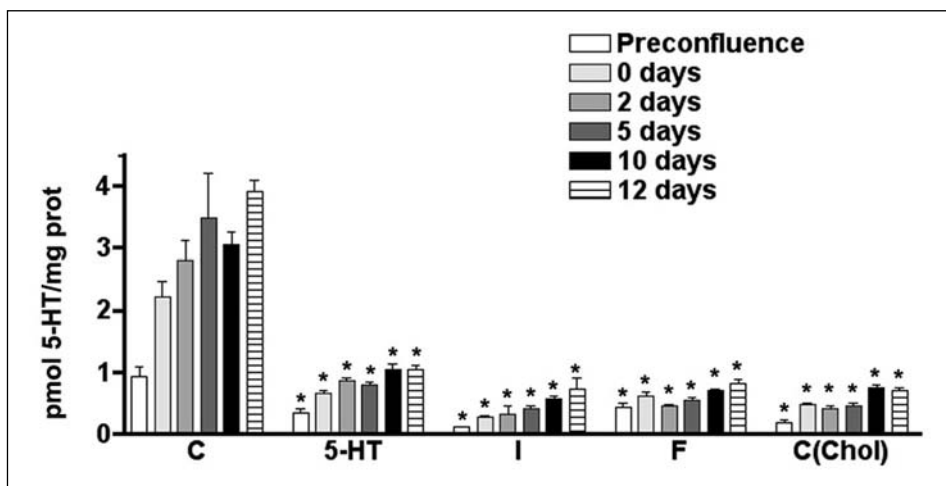


Fig. 3. 5-HT uptake measured at different degrees of cell differentiation according to the pre-cellular and post-cellular confluence culture time. The cellular conditions were: Preconfluence (fourth day after seeding) and 0, 2, 5, 10 and 12 days post-confluence. The 5-HT concentration was 0.2 µM. The experimental conditions were: C = Control; 5-HT = 5-HT 20 µM; I = Imipramine 1 mM; F= Fluoxetine 1 µM; C (Chol) = Na<sup>+</sup> was replaced by choline. The data are the mean ± SEM of 6 experiments. \* P<0.01 compared with control conditions.

124

and differentiation of Caco-2 cells. The results (Fig. 3) show that Caco-2 cells uptake 5-HT early in the time culture, even before confluence. The 5-HT uptake increased with the level of differentiation and it seemed to reach a plateau at the fifth post-confluence day. This transport was specific and was significantly inhibited by 5-HT, imipramine and fluoxetine at any degree of cellular differentiation. In the absence of  $\text{Na}^+$ , the 5-HT transport was significantly reduced (Fig. 3). These results indicate that the 5-HT uptake in Caco-2 cells may be carried out by SERT and that its expression is dependent on the differentiation status of the cells.

*Kinetic study of the 5-HT uptake. Inhibition by fluoxetine.* The kinetic constants  $V_{\text{max}}$  and  $K_t$  of the 5-HT uptake were calculated in order to corroborate that the 5-HT transport in the Caco-2 was mediated by SERT. The 5-HT uptake was measured at different 5-HT concentrations (0.05-50  $\mu\text{M}$ ) under either control conditions or in the absence of  $\text{Na}^+$ . The kinetic constants obtained were:  $V_{\text{max}} = 12.05 \pm 0.95$  pmol/mg prot and  $K_t = 0.216 \pm 0.049$   $\mu\text{M}$ .

The inhibition specificity of the 5-HT transporter in Caco-2 cells was determined by studying the inhibition profile of fluoxetine, a selective 5-HT re-

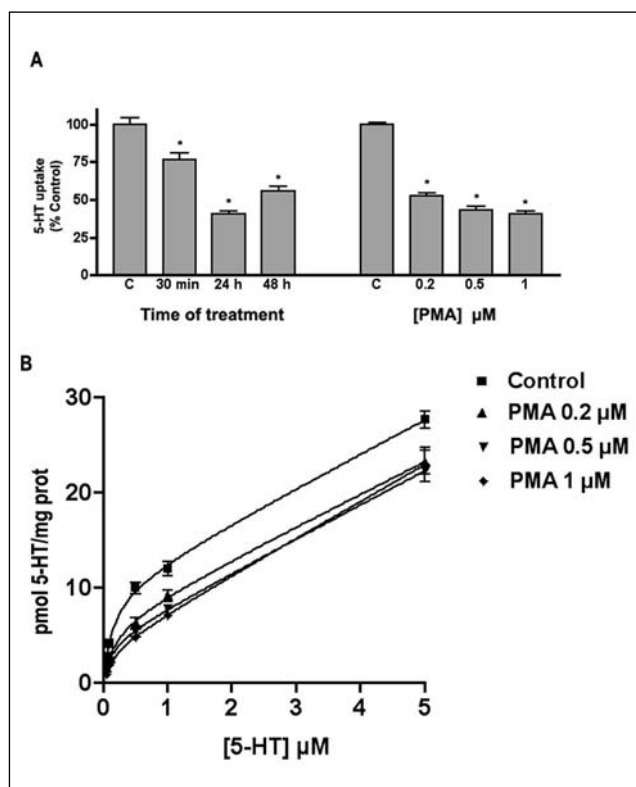
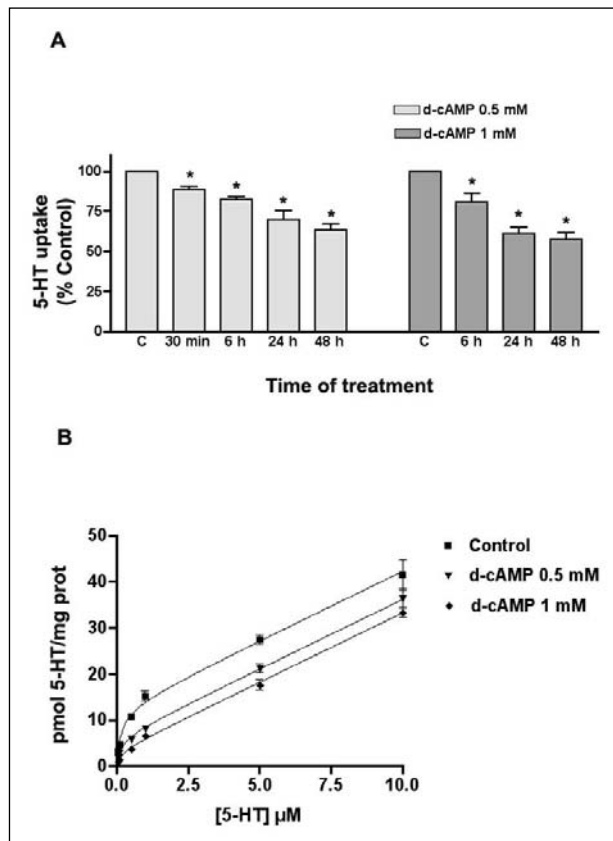


Fig. 4. Regulation of the 5-HT uptake mediated by PMA in Caco-2 cells. A. The effect of PMA (1 mM) was determined and related to the period of the treatment (left) or to the PMA concentration after treating the cells during 24 h (right). 5-HT concentration assayed was 0.2  $\mu\text{M}$ . C = Control condition in which the cells were not treated. The results are expressed as the mean  $\pm$  SEM (7 experiments) of the % of the 5-HT uptake compared with the value of 5-HT uptake control (100%). \*  $P < 0.01$  compared with the control. B. Kinetic study of SERT activity after long-term treatment of Caco-2 cells with PMA. The cells were treated during 24h with three PMA concentrations: 0.2, 0.5 and 1  $\mu\text{M}$ . 5-HT concentration range was 0.05-5  $\mu\text{M}$ . The results are the mean of 5 experiments.



*Fig. 5.* Effect of cAMP on the 5-HT uptake in Caco-2 cells. A. 5-HT concentration was 0.2  $\mu$ M. The experiments were carried out at different treatment periods, and two concentrations of d-cAMP (0.5 and 1 mM) were assayed. C = Control condition in which the cells were not treated. The results are expressed as the % of the control (100%) and are the mean  $\pm$  SEM of 7 experiments. \*  $P < 0.01$  compared with the control. B. Kinetic study of SERT activity after long-term treatment of Caco-2 cells with d-cAMP. The cells were treated during 48 h with two d-cAMP concentrations: 0.5 and 1 mM. The 5-HT range concentration was 0.05-10  $\mu$ M. The uptake conditions are described in Materials and Methods. The results are the mean of 6 experiments.

uptake inhibitor. The fluoxetine inhibition of the 5-HT uptake was strong and concentration-dependent, and the  $IC_{50}$  value calculated was 17.6 nM.

*Effect of PKC and cAMP on 5-HT transport mediated by SERT.* The aim of this group of experiments has been to characterize the SERT regulation in Caco-2 cells mediated by both PKC and cAMP, either after short- (30 min) or long- (24 or 48 h) term treatments. To study the PKC regulation of SERT, PMA, an activator of PKC, was assayed. The results show that PMA 1  $\mu$ M induced an inhibition of the 5-HT uptake after 30 min of cell treatment. This effect increased with the period of treatment (24 or 48 h) and was PMA concentration-dependent (*Fig. 4A*). The kinetic study of the SERT activity after 48 h treatment of the cells with different PMA concentrations (0.2, 0.5 and 1  $\mu$ M) was determined (*Fig 4B*) and the kinetic constants  $V_{max}$  and  $K_t$  calculated (*Tab. 1*). The results show that the treatment with PMA reduced the 5-HT transport, by affecting mainly the  $V_{max}$ .

The cAMP effect on the SERT function was studied by using d-cAMP, a cell permeable cAMP analog. The results show that d-cAMP significantly diminished

126

*Table 1.* Kinetic study of the 5-HT uptake after 48 h treatment of the Caco-2 cells with different PMA concentrations. The kinetic constants  $V_{max}$  and  $K_t$  were calculated from the results of 5 independent experiments. The results are the mean $\pm$ SEM.

Conditions	$V_{max}$ (pmol 5-HT/mg prot)	$K_t$ ( $\mu$ M)
Control	10.20 $\pm$ 0.75	0.151 $\pm$ 0.030
PMA 0.2 $\mu$ M	6.63 $\pm$ 0.50	0.180 $\pm$ 0.030
PMA 0.5 $\mu$ M	4.71 $\pm$ 0.23	0.157 $\pm$ 0.019
PMA 1 $\mu$ M	3.89 $\pm$ 0.24	0.166 $\pm$ 0.028

*Table 2.* Kinetic study of the 5-HT uptake in Caco 2 cells treated during 48 h with different concentrations of d-cAMP. The kinetic constants were calculated from the results obtained in 5 independent experiments. The results are the mean $\pm$ SEM.

Conditions	$V_{max}$ (pmol 5-HT/mg prot)	$K_t$ ( $\mu$ M)
Control	13.01 $\pm$ 0.82	0.170 $\pm$ 0.040
d-cAMP 0.5 mM	6.24 $\pm$ 0.60	0.160 $\pm$ 0.060
d-cAMP 1 mM	3.10 $\pm$ 0.39	0.160 $\pm$ 0.070

the 5-HT uptake in Caco-2 cells and this inhibition increased with the period of cell treatment (*Fig 5A*). Similar effects were obtained with forskolin, an adenylate cyclase activator (data not shown). The effect of 48 h of treatment with d-cAMP (0.5 and 1 mM) on SERT activity was also determined by measuring the transport of 5-HT at different concentrations (0.05-10  $\mu$ M) (*Fig 5B*). The kinetic constants  $V_{max}$  and  $K_t$  were calculated (*Tab. 2*), and the results show that d-cAMP seems mainly to affect the  $V_{max}$ .

## DISCUSSION

SERT, that was firstly described and cloned in 1991 (24, 25), uptakes 5-HT from the extracellular space, and modulates both the 5-HT availability and the 5-HT response.

The alteration of the serotonergic activity has been considered as a determining factor in the genesis of several neuropsychiatric and intestinal pathologies, and the hSERT has been described as a pharmacological target in the treatment of these disorders. Since the main problem in human physiological research is the availability of human biological samples, many SERT studies have been carried out by using heterologous systems that replace the human tissue (15-17, 26, 27), and by using cellular models (3, 18-20).

Recent results (22, 23) have shown that the human enterocyte-like Caco-2 cells uptake 5-HT by a specific system of transport. Since the molecular characterization and the intracellular regulation of this transport system in Caco-

2 cells are yet to be determined, the aim of this present work has been to offer an in-depth characterization of SERT in order to validate this cell line as a possible "in vitro" model to study the hSERT.

The results obtained corroborate the assertion that the 5-HT uptake in Caco-2 cells is carried out by a specific Na<sup>+</sup>-dependent transport system with a K<sub>t</sub> similar to the value described in previous studies (7, 18). In addition, this transport was potentially inhibited by fluoxetine and the IC<sub>50</sub> value (17.6 nM) was also similar to that obtained by other authors (23). These functional characteristics indicate that the earlier-described neuronal SERT may carry out the 5-HT uptake in Caco-2 cells.

Previous RT-PCR analysis of the SERT expression in Caco-2 cells has demonstrated the amplification of a 319 bp product that may correspond to the SERT mRNA (23). In order to demonstrate this point, we amplified and sequenced the complete coding sequence of SERT in Caco-2 cells (2105 bp) and we found that this sequence was identical to the human neuronal Na/Cl dependent SERT. Furthermore, using a specific antibody, we detected a protein of about 70 kDa, in both the cell lysate and the protein surface enriched-fraction of Caco-2 cells. The molecular size of the detected protein was similar to that described in cells transfected with the cDNA encoding the human brain SERT (14). A second band of about 40 kDa was detected in rat intestinal mucosa and brain. The detection of 37 kDa SERT-immunoreactive protein band has been recently described in rat brain by Dmitriev et al (28) who concluded that it might be the result of site-specific SERT endoproteolytic cleavage. To the best of our knowledge, these results demonstrate for the first time, the expression of the hSERT in Caco-2 cells.

To characterize the SERT function in Caco-2 cells in greater detail, we also studied the 5-HT transport as a function of the different degree of cell growth and differentiation. The results demonstrated that 5-HT uptake is detected in Caco-2 cells before the confluence is reached, and that the 5-HT transport increased with the level of differentiation until reaching a plateau at day 5 after confluence. This 5-HT transport level was maintained in Caco-2 cells during 12 days after confluence, indicating that the Caco-2 cell line may be a suitable "in vitro" model to study SERT long-term (days) regulation by treatment with different substances.

Finally, we have also determined both the short and long-term regulation of the hSERT in Caco-2 cells mediated by PKC and cAMP. The results obtained show that the 5-HT uptake was significantly inhibited by PMA after both short and long-term treatment of the cells, and the inhibition of the SERT activity increased with the PMA concentration. In addition, the effect of the long-term PKC stimulation has been shown to mainly affect the capacity (V<sub>max</sub>) of SERT. These results corroborate the results obtained by other authors on native tissues and transfected cells (15, 16, 20, 27, 29), who concluded that the short-term action of PKC induced the SERT phosphorylation and sequestration, modifying the SERT distribution and density in the membrane, and diminishing the uptake capacity. Recent results have also suggested that short-term changes in

128

intracellular calcium levels mediated by hormones may be responsible for the inhibition of SERT activity (30). It is important to note, however, that we have also demonstrated that the PKC effect on SERT capacity (reduction of Vmax) continues after the long-term action of PKC on the cells.

The effects of cAMP on SERT activity have been more controversial. Although SERT phosphorylation in heterologous systems was triggered by cAMP analogs, little or no functional effect was obtained on SERT activity following PKA triggered phosphorylation (31). In order to clarify the effect of cAMP on SERT activity in a native cellular context, we measured the SERT activity in Caco-2 cells after either short (minutes) or long (24 or 48 h) term action of the cAMP analog d-cAMP. The results demonstrated that 5-HT uptake was inhibited by increasing the intracellular cAMP level, either in short or long-term treatment. This inhibition was time and dose-dependent and was smaller than the 5-HT uptake inhibition detected with PMA. The kinetic study of the SERT activity after long-term d-cAMP treatment (48h) of Caco-2 cells showed a reduction of SERT capacity (Vmax). These results differ from those obtained by other authors; Ramamoorthy et al. (15) indicated that although forskolin increased SERT phosphorylation, it failed to reduce 5-HT uptake, while the results of Morikawa et al. (26) concluded that d-cAMP induced an increase in both the level of SERT mRNA and the uptake activity after 3 h of treatment in BeWo cells (human choriocarcinoma cells), which constitutively express SERT. The differences in these results corroborate the difficulties that are encountered when studying SERT regulation mediated by cAMP and may be due, in part, to the heterologous context of SERT expression and the different origin of the "in vitro" cellular models used for this purpose.

In conclusion, the results obtained in this work have demonstrated the expression characteristics of hSERT in the Caco-2 cells, as well as its function and regulation mediated by intracellular messengers such as PKC and cAMP. On the basis of these results it can be concluded that this cell line may be a suitable tool to study the role of the hSERT in several physiological and pathological processes, as well as its pharmacological modulation.

*Acknowledgements:* This work has been supported by a grant from the Spanish Ministry of Science and Technology and the European Regional Development Fund (ERDF/FEDER) (BFI 2003-01541), as well as by a grant from the Government of Aragon (Ref B41 2004).

#### REFERENCES

1. Rudnick G, Clark L. From the synapse to vesicle: the reuptake and storage of biogenic amine neurotransmitters. *Biochim. Biophys. Acta* 1993; 1144: 249-263.
2. Chen JJ, Li Z, Pan H, Murphy DL, Tamir H, Koepsell H, Gershon MD. Maintenance of serotonin in the intestinal mucosa and ganglia of mice that lack the high affinity serotonin transporter: Abnormal intestinal motility and the expression of cation transporters. *J. Neurosci* 2001; 21: 6348-6361.



3. Lesch KP, Wolozin BL, Murphy DL, Riederer P. Primary structure of the human platelet serotonin uptake site: Identity with the brain serotonin transporter. *J. Neurochem* 1993; 60: 2319-2322.
4. Balkovetz DF, Tirupathi C, Leibach FH, Mahesh VB, Ganapathy V. Evidence for an imipramine-sensitive serotonin transporter in human placental brush border membranes. *J. Biol. Chem* 1989; 264: 2195-2198.
5. Wade PR, Chen J, Jaffe B, Kassem IS, Blakely RD, Gershon, MD. Localization and function of a 5-HT transporter in crypt epithelia of the gastrointestinal tract. *J. Neurosci* 1996; 16: 2352-2364.
6. Gershon MD. Serotonin and gastrointestinal function. CRC Press, Boca Raton, FL 1995.
7. Chen J-X, Pan H, Rothman TP, Wade PR, Gershon MD. Guinea pig 5-HT transporter: cloning, expression, distribution and function in intestinal sensory reception. *Am. J. Physiol* 1998; 275: G433-G448.
8. Maes M, Meltzer HY. Psychopharmacology. The Fourth Generation of Progress. New York, Raven, 1995.
9. Purselle DC, Nemeroff CB. Serotonin transporter: A potential substrate in the biology of suicide. *Neuropsychopharmacology* 2003; 28: 613-619.
10. Camilleri M, Atasanova E, Carlson PJ, Ahmad U, Kim HJ, Viramontes BE, Mckinzie S, Urrutia R. Serotonin transporter polymorphism pharmacogenetics in diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2002; 123: 425-432.
11. Coates MD, Mahoney CR, Linden DR, Sampson JE, Chen J, Blaszyk H, Crowell MD, Sharkey KA, Gershon MD, Mawe GM, Moses PL. Molecular defects in mucosal serotonin content and decreased serotonin reuptake transporter in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2004; 126: 1657-1664.
12. Sharkey K, Mawe GM. Neuroimmune and epithelial interactions in intestinal inflammation. *Curr. Opin. Pharmacol* 2002; 2: 669-677.
13. O'Hara JR, Ho W, Linden DR, Mawe GM, Sharkey KA. Enteroendocrine cells and 5-HT availability are altered in mucosa of guinea pigs with TNBS ileitis. *Am. J. Physiol* 2004; 287: G998-G1007.
14. Qian Y, Melikian HE, Rye DB, Levey AI, Blakely RD. Identification and characterization of antidepressant-sensitive serotonin transporter proteins using site-specific antibodies. *J. Neurosci* 1995; 15: 1261-1274.
15. Ramamorthy S, Giovanetti E, Qian Y, Blakely RD. 1998. Phosphorylation and regulation of antidepressant-sensitive serotonin transporters. *J. Biol. Chem* 1998; 273: 2458-2466.
16. Ramamorthy S, Blakely RD. Phosphorylation and sequestration of serotonin transporters differentially modulated by psychostimulants. *Science* 1999; 285: 763-766.
17. Bryan-Lluka LJ, Papacostas MH, Paczkowski FA, Wanstall JC. Nitric oxide donors inhibit 5-hydroxytryptamine (5-HT) uptake by the human 5-HT transporter. *Br. J. Pharmacol* 2004; 143: 63-70.
18. Ramamoorthy S, Bauman AL, Moore KR, Hong H, Yang-Feng TL, Chang AS, Ganapathy V, Blakely RD. Antidepressant and cocaine sensitive human serotonin transporter: Molecular cloning, expression and chromosomal localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1993; 90: 2542-2546.
19. Martel F, Keating E. Uptake of 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) by the JAR human placental choriocarcinoma cell line: comparison with 5-hydroxytryptamine. *Placenta* 2003; 24: 361-369.
20. Jayanthi LD, Samuvel DJ, Blakely RD, Ramamoorthy S. Evidence for biphasic effects of protein kinase C on serotonin transporter function, endocytosis, and phosphorylation. *Mol. Pharmacol* 2005; 67: 2077-2087.
21. Rousset, M. The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2; two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie* 1986; 68: 1035-1040.
22. Alcalde AI, Sorribas V. Caco-2 cells and 5-HT transport. *J. Physiol. Biochem* 2001; 57: 117.

130

23. Martel F, Monteiro R, Lemos C. Uptake of serotonin at the apical and basolateral membranes of human epithelial (Caco-2) cells occurs through the neuronal serotonin transporter. *J. Pharm. Exp. Ther* 2003; 306: 355-362.
24. Hoffman BJ, Mezey E, Brownstein J. Cloning of a serotonin transporter affected by antidepressants. *Science* 1991; 254: 579-580.
25. Blakely RD, Berson HE, Fremeau RT, Caron MG, Peek MM, Prince HK, Bradley CC. Cloning and expression of a functional serotonin transporter from rat brain. *Nature* 1991; 354: 66-70.
26. Morikawa O, Sakai N, Obara H, Saito N. Effects of interferon-alfa, interferon-gamma and cAMP on the transcriptional regulation of serotonin transporter. *Eur. J. Pharmacol* 1998; 349: 317-324.
27. Qian Y, Galli A, Ramamoorthy S, Risso S, DeFelice LJ, Blakely RD. Protein kinase C activation regulates human serotonin transporters in HEK-293 cells via altered cell surface expression. *J. Neurosci* 1997; 17: 45-57.
28. Dmitriev AD, Factor MI, Segal OL, Pavlova EV, Massino YS, Smirnova MB, Yakoleva DA, Dmitriev DA, Kizim EA, Kolyaskina GI, Brasov OS. Western blot analysis of human and rat serotonin transporter in platelets and brain using site-specific antibodies: Evidence that transporter undergoes endoproteolytic cleavage. *Clin. Chim. Acta* 2005; 356: 76-94.
29. Samuvel DJ, Jayanthi LD, Bhat NR, Ramamoorthy S. A role for p38 mitogen-activated protein kinase in the regulation of the serotonin transporter: evidence for distinct cellular mechanisms involved in transporter surface expression. *J. Neurosci* 2005; 25: 29-41.
30. Koldzic-Zivanovic N, Seitz PK, Watson ChS, C Cunningham KA, Thomas ML. Intracellular signaling involved in estrogen regulation of serotonin uptake. *Mol. Cel. Endocrinol* 2004; 226: 33-42.
31. Blakely RD, Ramamoorthy S, Schroeter S, Qian Y, Apparsundaram S, Galli A, DeFelice LJ. Regulated phosphorylation and trafficking of antidepressant-sensitive serotonin transporter proteins. *Biol. Psychiatry* 1998; 44: 169-178.

Received: September 29, 2005

Accepted: February 3, 2006

Author's address: Ana Isabel Alcalde, Departamento de Farmacología y Fisiología. Facultad de Veterinaria. Miguel Servet 177. 50013 Zaragoza, Spain. Telephone number 34 976 761650, Fax number 34 976 761612. E-mail: aalcalde@unizar.es

## VII.3. Artículo 2

**Iceta R, Mesonero JE, Alcalde AI. Effect of long-term fluoxetine treatment on the human serotonin transporter in Caco-2 cells.**

***Life Sciences*, 80(16): 1517-1524. 2007.**





## Effect of long-term fluoxetine treatment on the human serotonin transporter in Caco-2 cells

Ruth Iceta, José E. Mesonero, Ana I. Alcalde \*

*Department of Pharmacology and Physiology, Physiology, University of Zaragoza, Zaragoza, Spain*

Received 2 October 2006; accepted 14 January 2007

---

### Abstract

Fluoxetine is a selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) broadly used in the treatment of human mood disorders and gastrointestinal diseases involving the serotonergic system. The effectiveness of this therapy depends on repeated long-term treatment. Most of the long-term studies *in vivo* of SSRI effects on serotonergic activity have focused on their effects on autoreceptors or postsynaptic receptors. The chronic effect of SSRIs on the activity of the serotonin transporter (SERT) has been less studied and the results have been contradictory. The aim of this study was to determine the specific effect of long-term fluoxetine treatment on human serotonin transporter (hSERT) *in vitro*, by using the human enterocyte-like cell line Caco-2. Results show that fluoxetine diminished the 5-HT uptake in a concentration-dependent way and that this effect was reversible. Fluoxetine affected mainly the hSERT transport rate by reducing the availability of the transporter in the membrane with no significant alteration of either the total hSERT protein content or the hSERT mRNA level. These results suggest that the effect of fluoxetine on the expression of hSERT is post-translational and has shown itself to be independent of PKC and PKA activity. This study may be useful to clarify the effect of the long-term fluoxetine therapy in both gastrointestinal and central nervous system disorders.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

*Keywords:* Human serotonin transporter; Fluoxetine; Caco-2 cells

---

### Introduction

Serotonin (5-HT) is a neurotransmitter whose activity is mediated by specific 5-HT receptors and their downstream signalling components. 5-HT has been described to be involved in the origin of different pathologies in the central nervous system (Mann, 2003) and in the gastrointestinal tract (Linden et al., 2003). The transmitter can be regulated by removal from the extracellular compartment by the serotonin transporter (SERT), which is the target of pharmacological molecules for the treatment of mood disorders (Blier and Szabo, 2005) and gastrointestinal diseases (Baker, 2005). Many groups have tried to determine the acute effect of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) on SERT. For example, Ramamoorthy and Blakely (1999) demonstrated that paroxetine and citalopram

affect the level of SERT phosphorylation mediated by protein kinase C.

Fluoxetine is one of the molecules most broadly used as a selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) to treat psychiatric disorders and some chronic intestinal pathologies, and the maximal therapeutic effects of fluoxetine are obtained only after long-term repeated treatment. The chronic effect of the SSRIs on serotonergic activity has also been studied; however most of the long-term studies on SSRIs have focused on their effects on autoreceptors or postsynaptic receptors and the responses they elicit (Blier and Bouchard, 1994; Auerbach and Hjorth, 1995; Ceglia et al., 2004). In contrast, the effect of long-term SSRIs treatment on SERT function has been studied less (Martel et al., 2004; Piñeyro et al., 1994; Schloss and Henn, 2004).

The results of *in vivo* studies of the SSRIs long-term effect on SERT are controversial. Thus, numerous *in vivo* studies on the antidepressant treatment effect on either ligand binding to SERT or its mRNA content, have yielded contradictory conclusions, with some studies reporting increases (Hrdina and Vu, 1993; Lopez et al., 1994), and others reporting decreases (Lesch et al., 1993; Watanabe et al., 1993; Kuroda et al.,

---

\* Corresponding author. Departamento de Farmacología y Fisiología, Fisiología, Facultad de Veterinaria, Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza, Spain. Tel.: +34 976 761650; fax: +34 976 761612.

E-mail address: [aalcalde@unizar.es](mailto:aalcalde@unizar.es) (A.I. Alcalde).

1994; Piñeyro et al., 1994; Neumaier et al., 1996) or no change (Cheetham et al., 1993; Burnet et al., 1994; Spurlock et al., 1994; Gobbi et al., 1997) in these parameters. The use of an *in vitro* cellular model in which the composition of the extracellular culture medium is known and controlled might be very useful in order to clarify these effects and to gain an in-depth knowledge of the specific effect on SERT of chronic treatment with SSRIs.

Previous results obtained in our laboratory have shown that the human enterocyte-like Caco-2 cell line expresses the human SERT (hSERT), and is a good model for studying the function and regulation of hSERT (Alcalde and Sorribas, 2001; Iceta et al., 2006). Consequently, the aim of this study was to determine the specific long-term effect of fluoxetine treatment on the hSERT function and expression in Caco-2 cells. The results obtained show that treatment with fluoxetine reduces hSERT-mediated 5-HT uptake in a concentration-dependent way. This effect was reversible and was mainly due to a reduction in the availability of the transporter in the membrane without altering either the level of hSERT mRNA or the total amount of hSERT protein. Consequently, treatment with fluoxetine seems to affect post-translational processes, involving intracellular mechanisms. However, PKC and PKA did not seem to be involved.

## Methods

### Cell culture

Caco-2/TC7 cells (Chantret et al., 1994) were kindly provided by Dr. Edith Brot-Laroche (U-505 INSERM). The cells were cultured at 37 °C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and maintained in high glucose DMEM supplemented with 50 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin, 1% non-essential amino acids and 20% foetal bovine serum (Invitrogen, USA). The cells were passaged enzymatically (0.25% trypsin–1 mM EDTA) and sub-cultured in 25 or 75 cm<sup>2</sup> plastic culture flasks (Sarstedt, Germany). The medium was changed 48 h after seeding and daily thereafter. The cells were always used between passage 19 and 35. For 5-HT uptake assays, cells were seeded in 24-well plates at a density of 4 × 10<sup>4</sup> cells/well, and most uptake measurements were carried out 14 days after seeding (10 days after confluence). Previous results (Iceta et al., 2006) have shown that Caco-2 cells express hSERT, whose activity reaches a plateau the fifth day after confluence. Fluoxetine and the different modifiers were added to the culture medium at different concentrations and for different periods, depending on the experiment. In the experiments, 6 h before the cells were used, the cell medium was free of foetal bovine serum and modifiers. This condition did not affect either the functional differentiation status or the hSERT activity of Caco-2 cells (data not shown).

### 5-HT uptake studies

Uptake measurements were performed on cells attached to 24-well plates either under control conditions or after treatment with fluoxetine. The 5-HT uptake conditions have been chosen according to previous experiments (Iceta et al., 2006). The

transport medium composition in mM was as follows: 137 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 MgSO<sub>4</sub>, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES pH 7.4, 4 glutamine, 0.1% bovine serum albumin and both 5-HT and <sup>3</sup>[H]-5-HT (specific activity 20 Ci/mmol, Amersham Biosciences, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Before measuring uptake, cells were pre-incubated at 37 °C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> with substrate-free transport medium (without 5-HT or modifiers) for 30 min. The cells were then immediately washed twice with substrate-free transport medium at 37 °C, and then incubated with transport medium at 37 °C for 6 min. Transport was stopped by removing the transport medium and washing the cells twice with ice-cold substrate-free transport medium containing 1 mM 5-HT. Cells were then solubilised in 0.1 M NaOH and samples were taken for radioactivity counting. Protein was measured using the Bradford method (Bio-Rad), with bovine serum albumin as standard. Transport results were expressed in pmol 5-HT/mg protein.

### RNA extraction, reverse transcription and semiquantitative PCR analysis

RNA extractions were carried out with the RNeasy mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) following manufacturer's instructions. Total RNA was extracted from Caco-2 cells cultured in 25 cm<sup>2</sup> flasks 14 days after seeding. The extracted RNA (1 µg) was used as a template for first-strand cDNA synthesis using oligo(dT) primers and a modified M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA). Negative amplification control was performed in the absence of reverse transcriptase. One tenth of the resultant cDNA was used for hSERT PCR amplification with human β-actin as an internal control. The specific primers used were (5'–3'): hSERT sense AAATCCAAGCACCCAGAGAT and hSERT antisense AGACTGTGTCCCTGTG-GAGA; β-actin sense AGCACGGCATCGTCACCAACT and β-actin antisense ACATGGCTGGGGTGTGAAGG. Twenty-seven cycles were carried out for hSERT PCR amplification as follows: 94 °C for 30 s, 56 °C for 30 s and 68 °C for 2 min 30 s. PCR amplification of β-actin was obtained after twenty-five cycles under the following conditions: 94 °C for 30 s, 60 °C for 30 s and 68 °C for 30 s. These final hSERT and β-actin PCR conditions were determined after screening (twenty to thirty cycles). Final PCR amplification conditions were chosen so that none of the RNAs (cDNAs) analysed reached a plateau at the end of the amplification protocol. PCR products were electrophoresed on 1% agarose gel and visualized under UV light after ethidium bromide staining. The images from the gels were captured with Biodoc-It Imaging System (UVP Inc, Upland, CA, USA). The fragment sizes were 2105 for hSERT and 193 for β-actin. The hSERT/β-actin ratio in densitometric units was calculated with the Doc-It<sup>®</sup>LS Image Analysis Software (UVP Inc).

### Biotinylation and purification of cell surface proteins

Protein biotinylation was carried out with a Cell Surface Protein Biotinylation and Purification kit (Pierce, Rockford, IL, USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, Caco-2 cells seeded in 25 cm<sup>2</sup> flasks were washed with ice-cold

PBS and incubated with Sulfo-NHS-SS-Biotin for 90 min at 4 °C. After quenching, the cells were scraped and centrifuged at 500×g for 3 min. The pellet was re-suspended with lysis buffer and the cells disrupted by sonication (five 1 s bursts, 60 W). One sample was taken from the lysate for total protein analysis and protein quantification. The cell lysate was centrifuged at 15,000×g for 10 min. The supernatant was added to a column with immobilised neutravidin gel and after incubation for 1 h, the mixture was centrifuged at 1000×g for 1 min and the flow-through was discarded. The column was washed with washing buffer and centrifuged at 1000×g for 1 min three times. Finally, SDS-PAGE sample buffer containing 50 mM DTT was added to the gel in the column, and the reaction was incubated for 1 h. The column was centrifuged for 2 min at 1000×g and the flow-through used for Western blotting analysis.

### Western blotting

Purified cell surface protein samples and cell lysate (60 µg of total protein) from Caco-2 cells were electrophoresed in 9% SDS-PAGE gels, and then transferred to PVDF membranes by electroblotting. The membranes were blocked with 5% non-fat dried milk plus 1% BSA, and probed with a rabbit polyclonal anti-rat SERT 1:5000 (AB1594, Chemicon, Temecula, CA, USA). The primary antibody was detected using a secondary donkey anti-rabbit Ig coupled to horseradish peroxidase (Santa Cruz Biotechnologies, CA, USA) and the ECL Plus detection kit (Amersham Biosciences) and visualized with X-ray films (Hyperfilm MP, Amersham Biosciences). The blots were re-probed, after stripping, with both a rabbit polyclonal antibody anti-Calnexin (endoplasmic reticular membrane protein) (Santa Cruz Biotechnologies) to validate the surface biotinylation on plasma membrane proteins, and with a rabbit polyclonal anti-actin antibody to determine differences in the sample load. The hSERT/β-actin protein ratio was calculated from the films with the Doc-It<sup>®</sup>LS Image Analysis Software (UVP Inc) and the results were expressed in densitometric units.

### Statistical analysis

All results are expressed as means±SEM. Statistical comparisons were performed by the paired *t*-test with a confidence interval of 99% ( $p < 0.01$ ). Kinetic analysis of the 5-HT transport values was performed by non-linear regression, fitting the results to an equation containing a saturable (Michaelis–Menten) plus a non-saturable (diffusion) component. Calculation of 5-HT transport kinetic constants and  $IC_{50}$  and the statistical analysis were carried out by the computer-assisted Prism GraphPad Program (Prism version 4.0).

## Results

### Effect of fluoxetine treatment on 5-HT uptake

Caco-2 cells were treated with fluoxetine at different concentrations (10 nM–1 µM). The treatment started on day 5 after the cells had reached confluence (day 10 of culture) and

was maintained for 4 days, until day 14 of culture. Preliminary experiments have demonstrated that these conditions are optimal to detect the fluoxetine effect on hSERT. Fig. 1 shows that the treatment with fluoxetine significantly diminished the 5-HT uptake in Caco-2 cells in a concentration-dependent way. The treatment with fluoxetine 1 µM blocked 5-HT uptake and the  $IC_{50}$  was found to be 17.5 nM.

### Reversibility and time dependence of the effect of fluoxetine treatment on 5-HT uptake

The long-term effect of fluoxetine on hSERT activity may be irreversible. In order to clarify this, the reversibility of the effect of fluoxetine treatment on 5-HT uptake was determined under three different experimental conditions: control group (untreated cells); cells treated with fluoxetine 100 nM for 4 days; and cells treated with fluoxetine for 4 days plus a period of recovery (1, 2, 4 or 6 days). Treatment of the cells with fluoxetine started on day 5 after confluence (day 10 after seeding). The recovery was carried out by adding standard culture medium (see Methods) to Caco-2 cells during the recovery period assayed. These conditions have been depicted in the upper part of Fig. 2. The results show that inhibition of 5-HT uptake progressively disappears after withdrawal of fluoxetine treatment (Fig. 2). We also determined whether the effect of fluoxetine depends on the duration of the treatment. So, cells were treated with fluoxetine 100 nM for 4, 5, 6, 8 and 10 days, and the effect compared with the control cells (untreated) at the same degree of differentiation. The results show that the effect of fluoxetine is not significantly altered by the duration of the treatment (Fig. 3).

### Kinetic study of the 5-HT uptake in Caco-2 cells treated with fluoxetine

Uptake of 5-HT was measured at different concentrations (range 0.05–50 µM) in Caco-2 cells treated with two different fluoxetine concentrations (50 and 100 nM) for 4 days (from day 10 to day 14 of culture after seeding). The kinetic constants  $V_{max}$  (maximum velocity of transport),  $K_t$  and  $K_d$  were calculated as indicated in Methods. The values obtained (Table 1) show that treatment with fluoxetine affects 5-HT uptake mainly

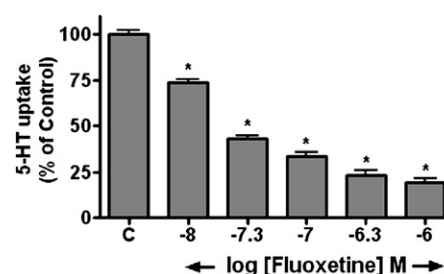


Fig. 1. Effect of treatment with different fluoxetine concentrations on 5-HT uptake. Fluoxetine treatment started on day 5 after cell confluence (day 10 after seeding). The treatment period was 4 days. Fluoxetine concentration ranged between 10 nM and 1 µM. 5-HT transport was measured after 6 min of 5-HT incubation. Concentration of 5-HT was 200 nM. Results are expressed as % of uptake by the control and are the mean±standard error of 5 independent experiments. \* $p < 0.01$  compared with control.



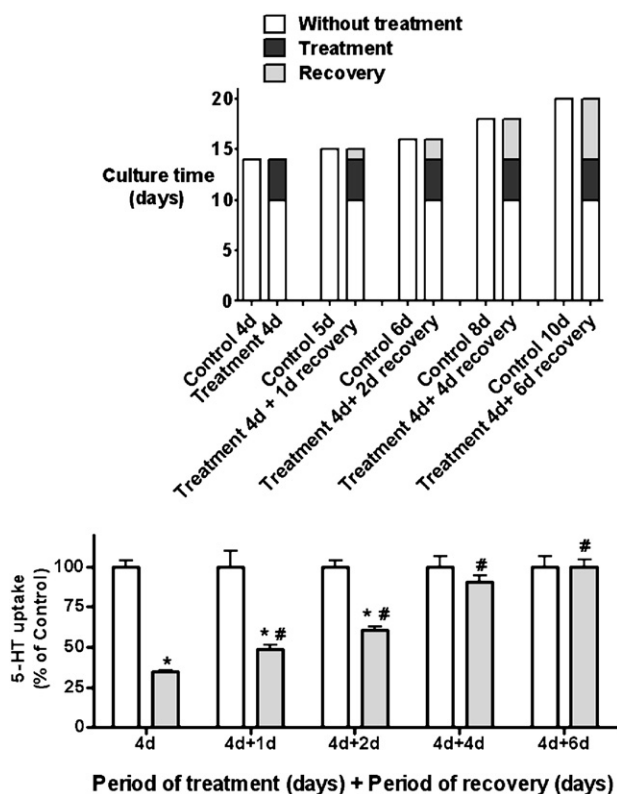


Fig. 2. Reversibility of the effect of fluoxetine treatment on 5-HT uptake. The treatment period was 4 days from the fifth day after cell confluence (10 days after seeding). Different durations of recovery (without treatment) were assayed (1, 2, 4 and 6 days). Treatment and recovery protocol used in these experiments are shown in the top diagram. The fluoxetine (FLX) concentration was 100 nM. In uptake experiments the 5-HT concentration was 200 nM and the period of incubation was 6 min. The results in the figure are indicated as the % of 5-HT uptake by the control, and are the mean±standard error of 4 independent experiments. \**p*<0.01 compared with the control of each condition; #*p*<0.01 compared with the 5-HT uptake after 4 days of treatment without recovery.

by reducing the *V*<sub>max</sub>, without significantly altering transport affinity (*K*<sub>t</sub>). These results indicate that fluoxetine treatment affects mainly the transport rate, and this may be due either to a

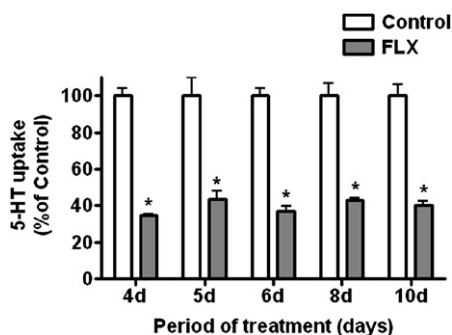


Fig. 3. Time dependence of the effect of fluoxetine treatment on 5-HT uptake. The 5-HT uptake was measured after different periods of treatment (4, 5, 6, 8 and 10 days). The fluoxetine (FLX) concentration was 100 nM. In the 5-HT uptake experiments, the 5-HT concentration was 200 nM and the period of incubation was 6 min. The results are expressed as the % of the uptake control, and are the mean±standard error of 5 independent experiments. \**p*<0.01 compared with the control.

Table 1

Kinetic constants of 5-HT transport in Caco-2 cells treated with fluoxetine

Conditions	<i>V</i> <sub>max</sub> (pmol 5-HT/mg prot)	<i>K</i> <sub>t</sub> (μM)	<i>K</i> <sub>d</sub> (μl/mg prot)
Control	34.04±1.8	1.45±0.32	2.61±0.02
FLX 5 × 10 <sup>-8</sup> M	21.71±1.5 *	2.53±0.67	2.51±0.03
FLX 10 <sup>-7</sup> M	10.65±3.7 *	1.20±0.35	2.55±0.04

5-HT concentrations ranged between 0.05 and 50 μM. Cells were treated with fluoxetine (FLX) for 4 days from the fifth day after cell confluence (10 days after seeding). Results are the mean±standard error of 6 independent experiments.

\**p*<0.01 compared with control values.

reduction of hSERT in the cell membrane or a silencing of this plasma membrane transporter.

*Effect of long-term treatment with fluoxetine on hSERT mRNA level*

In order to gain an in-depth knowledge of the molecular effects of fluoxetine treatment on hSERT, mRNA levels were measured. RNA from Caco-2 cells control (untreated) and those treated with fluoxetine 1 μM for 4 days (from day 10 to day 14 of culture after seeding) were used for semiquantitative RT-PCR analysis. The fluoxetine concentration was 1 μM to guarantee a maximum effect. Results show that the treatment with fluoxetine did not affect hSERT mRNA levels (Fig. 4). These results may indicate that fluoxetine treatment does not affect the hSERT transcription.

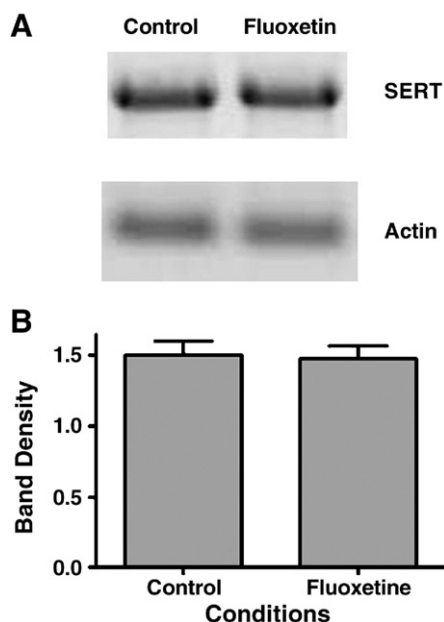


Fig. 4. Effect of fluoxetine treatment on hSERT mRNA levels. Cells were treated for 4 days (from the fifth day after cell confluence) with fluoxetine 1 μM, and the total RNA was extracted. (A) PCR product of the semiquantitative RT-PCR analysis of hSERT and actin in control cells and cells treated with fluoxetine. (B) Quantitation of the hSERT PCR product compared with the actin PCR product (hSERT/β-actin ratio) in control cells and cells treated with fluoxetine. The results are expressed in arbitrary densitometric units and are the mean of 4 independent experiments.



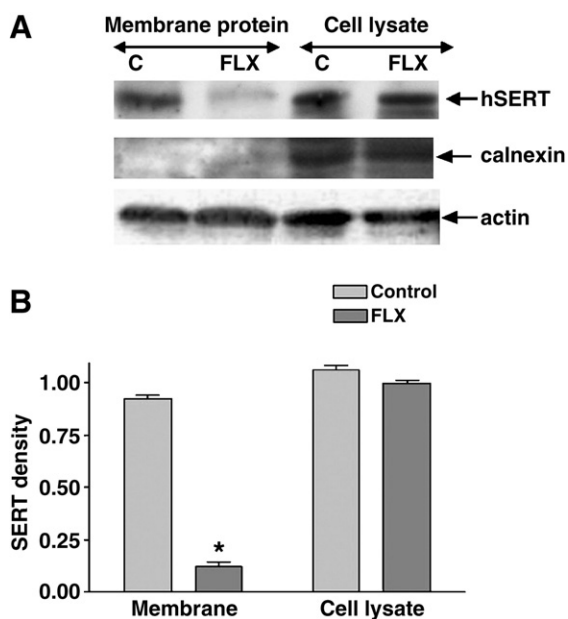


Fig. 5. Effect of fluoxetine treatment on hSERT protein expression. (A) Western blot of hSERT from Caco-2 cells treated with fluoxetine (FLX) 1  $\mu$ M for 4 days (from the fifth day after confluence). The cells were biotinylated and the cell lysate and cell membrane protein were electrophoresed (SDS-PAGE) and immunodetected. Calnexin and actin were probed to validate surface biotinylation on plasma membrane proteins, and to determine differences in the sample load respectively. (B) Quantitation of hSERT protein in both cell lysate and cell membrane compared with actin (hSERT/ $\beta$ -actin ratio). The results are expressed in arbitrary densitometric units, and are the mean  $\pm$  standard error of 4 independent experiments. \* $p$ <0.01 compared with the control.

*Effect of fluoxetine treatment on hSERT protein expression*

Since the former results obtained seem to indicate a post-transcriptional effect of fluoxetine, hSERT protein expression was analysed by Western blotting of both cell lysate (total protein) and purified cell surface protein obtained after biotinylation (cell membrane protein). Caco-2 cells were treated with fluoxetine 1  $\mu$ M for 4 days, from day 10 to day 14 of culture after seeding. The results in Fig. 5 show that availability of hSERT was dramatically reduced in the cell membrane, with

no significant alteration in the hSERT protein detected in the cell lysate (total hSERT protein). Calnexin was not biotinylated, providing validation of cell membrane impermeability and cell surface labelling of the biotinylated reagent.

*Role of PKC and cAMP (PKA) in the effect of fluoxetine on SERT*

The effect of fluoxetine on hSERT seems to be due to a reduction in the availability of hSERT in the cell membrane without affecting either its transcription or translation. One of the most described internalisation mechanisms for cell membrane proteins is phosphorylation mediated by intracellular kinases. The role of PKC and cAMP (PKA way) in the effect of fluoxetine on SERT was analysed in order to gain an in-depth knowledge of the fluoxetine mechanism. Uptake of 5-HT was measured in Caco-2 cells treated simultaneously with fluoxetine (10 nM) and either phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), an activator of PKC, or dibutyryl-cAMP (d-cAMP), a non-metabolisable analogue of cAMP, and either bisindolylmaleimide II (BIS) or KT 5720 (KT), inhibitors of PKC or PKA respectively. The fluoxetine concentration assayed was 10 nM to obtain a partial inhibition of hSERT which permits the detection of additive effects. The results show that either PMA or d-cAMP diminished the 5-HT uptake, and this effect was additive to the reduction yielded by fluoxetine. However, the fluoxetine effect was not reverted by either BIS, the PKC inhibitor, or KT, the PKA inhibitor. These inhibitors significantly reverted the PMA and d-cAMP effect on the 5-HT uptake without affecting the 5-HT uptake themselves (Fig. 6).

**Discussion and conclusions**

Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) are the most widely used antidepressants in mood disorders and are also administered in some gastrointestinal disorders. Although SSRIs rapidly inhibit the uptake of 5-HT, maximal therapeutic effects are obtained only after a long repeated treatment. This fact suggests that, in addition to the inhibition of the 5-HT

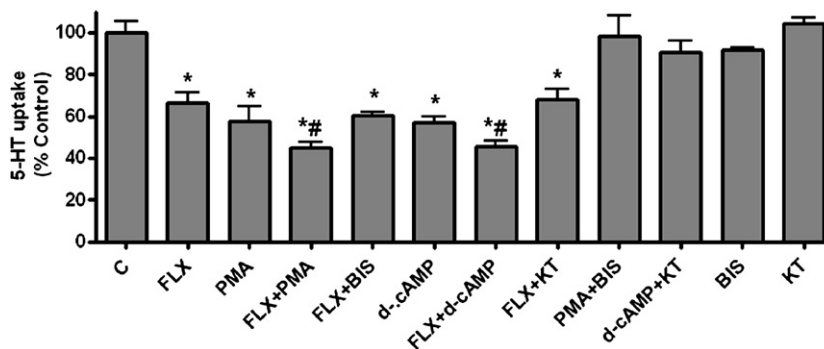


Fig. 6. Role of PKC and cAMP on the effect of fluoxetine. Cells were treated with fluoxetine (FLX) 10 nM plus phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (1  $\mu$ M), bisindolylmaleimide II (BIS) (2  $\mu$ M), dibutyryl-cAMP (d-cAMP) (1 mM) or KT 5720 (KT) (1  $\mu$ M) for 4 days (from the fifth day after cell confluence). The 5-HT uptake was measured after 6 min of incubation and the 5-HT concentration was 200 nM. The results are expressed as the % of the uptake control, and are the mean  $\pm$  standard error of 5 independent experiments. \* $p$ <0.01 compared with the control. # $p$ <0.01 compared with either the PMA value (in case of FLX+PMA values) or the d-cAMP value (in case of the FLX+d-cAMP values).

reuptake, other long-term adaptive changes occur that contribute to therapeutic efficacy.

Recent studies have been carried out to determine the association of SERT mutations with the SSRIs acute response by using several cellular models (Roman et al., 2003; Zhang and Rudnick, 2005; Henry et al., 2006); however their results do not clarify the therapeutic long-term effect of fluoxetine. On the other hand results obtained with *in vivo* studies of long-term antidepressant-induced regulation of SERT have yielded contradictory conclusions (Hrdina and Vu, 1993; Lopez et al., 1994; Lesch et al., 1993; Watanabe et al., 1993; Kuroda et al., 1994; Piñeyro et al., 1994; Neumaier et al., 1996; Cheetham et al., 1993; Burnet et al., 1994; Spurlock et al., 1994; Gobbi et al., 1997).

Fluoxetine is one of the most widely used SSRIs in therapy. In order to clarify the long-term effect of fluoxetine on hSERT we have used the Caco-2 cell line (human enterocyte-like cell line) that has been shown to be an excellent model for the study of hSERT (Iceta et al., 2006). In this study we treated the Caco-2 cells with fluoxetine for several days in order to determine its long-term effect, and measured different aspects of hSERT's function and its molecular expression. The results have shown that treatment with fluoxetine reduced 5-HT uptake carried out by hSERT and this effect was concentration-dependent ( $IC_{50}$  was 17.5 nM). This value was similar to the  $IC_{50}$  obtained in acute treatment of the cells (Iceta et al., 2006; Martel et al., 2003; Roman et al., 2003). Fluoxetine is a molecule that acts by binding to the serotonin transporter, so this effect may be due to the increase in the number of hSERT molecules that binds fluoxetine irreversibly in these cells. This possibility was rejected since firstly 5-HT uptake inhibition was reversed when the fluoxetine treatment was withdrawn and secondly, in all the experiments, 5-HT uptake was measured after 6 h of culture in medium without fluoxetine. These results suggest that the inhibitory effect of fluoxetine treatment may not be due to the blockade of the transporter (acute effect) and that other mechanisms might be involved. A possible effect of fluoxetine on Caco-2 activity and differentiation was also rejected by measuring aminopeptidase N activity (a specific enzymatic activity of the enterocytes dependent on cellular differentiation) in fluoxetine treated cells compared with control cells, without obtaining any difference (data not shown).

To learn more on the long-term effect of fluoxetine, it was important to clarify the molecular involvement of hSERT under conditions of fluoxetine treatment. For this purpose, one approach was to determine the effect on the kinetic parameters. Thus, the kinetic study showed a reduction in  $V_{max}$  in cells treated with fluoxetine, indicating that this antidepressant may affect the availability of the hSERT molecules in the cell membrane. In order to clarify the intracellular mechanism involved in the fluoxetine effect, the hSERT mRNA levels were measured by semiquantitative RT-PCR. Results showed no alteration in hSERT mRNA levels in Caco-2 cells treated with fluoxetine compared with untreated cells. Similar results have been obtained in rat brain *in vivo* studies based on either *in situ* hybridisation after treatment with paroxetine and sertraline (Benmansour et al., 1999) or Northern blot analysis after treat-

ment with fluoxetine (Koed and Linnet, 1997). Other authors have reported an mRNA decrease with imipramine or fluoxetine treatment (Lesch et al., 1993; Neumaier et al., 1996) or an increase with imipramine treatment (Lopez et al., 1994). Since these *in vivo* studies have been carried out in brains of rats treated with different antidepressants, not only the protocol for administering antidepressant, but also the interference of different physiological processes and the brain area analysed may be responsible for the contradictory results.

In our results the hSERT mRNA levels were not modified by fluoxetine treatment, suggesting that fluoxetine may not affect hSERT transcription. Nevertheless, the hSERT activity was inhibited by the treatment with fluoxetine and a possible alteration of the protein synthesis cannot be discarded. In fact, recent results have shown that the long-term fluoxetine administration yields a region-specific regulation of translation factors in rat brain (Dagestad et al., 2006). In our study the results obtained by Western blotting of both the purified cell surface protein and the total protein showed that the treatment with fluoxetine mainly affects the cell membrane's hSERT content. Similar effects have been obtained (Benmansour et al., 1999) in a careful study in brain of rats treated with paroxetine and sertraline, which detected a reduction of SERT density after chronic treatment. Nevertheless, other authors have reported no change in SERT density in rat brain after chronic treatment with citalopram and fluoxetine (Gobbi et al., 1997). In a study carried out on platelets from humans in a control group and those diagnosed with mood disorders, treatment with fluoxetine reduced 5-HT transport but did not modify hSERT density measured by labelling with [ $^3H$ ]paroxetine (Bakish et al., 1997). Differences in the effect might be due in part to the different accuracy of the SERT protein detection. In our experiments, total cell hSERT protein level was not modified by fluoxetine treatment, suggesting that fluoxetine may not affect hSERT protein synthesis, which is in part corroborated by the lack of fluoxetine effect on hSERT mRNA expression.

The mechanism by which fluoxetine reduces hSERT protein level in the membrane is not known; however, from the results of this study it might be hypothesised that treatment with fluoxetine induces regulation at the post-translational level. Recent studies in rats treated with fluoxetine have concluded that the treatment yields a modulation of phosphorylation processes in the brain (Fumagalli et al., 2005), and previous results obtained in our laboratory have shown that long-term treatment of Caco-2 cells with either PKC or PKA activators reduced the hSERT function (Iceta et al., 2006). Since the capacity of SERT has been shown to be regulated by kinase-linked pathways producing transporter phosphorylation and internalisation (Ramamoorthy and Blakely, 1999), the reduction in both the transport rate and the availability of SERT in the cell membrane produced by fluoxetine treatment might be mediated by either PKC or cAMP. However, our results show that the inhibitory effect of PMA or d-cAMP was additive to the effect of the fluoxetine treatment and, furthermore, that the fluoxetine effect was not reversed by specific PKC or PKA inhibitors. Consequently, the effect of fluoxetine treatment did not seem to be mediated by these kinases. Future studies are needed to

clarify the intracellular mechanism involved in the long-term fluoxetine effect on SERT.

The results of this paper demonstrate that long-term treatment with fluoxetine produces an adaptive change in hSERT, resulting in enhanced serotonergic activity, even though the antidepressant treatment may yield more complex changes involving other tissues and processes not included in our cell culture study.

In summary this study determines the long-term effect of fluoxetine on hSERT in Caco-2 cells. This SSRI diminishes hSERT activity in a concentration-dependent and reversible way. This effect seems to be due to the reduction in hSERT capacity by diminishing the availability of the transporter in the cell membrane with no alteration in mRNA expression, and seems to be PKC and cAMP-independent. These results may be useful to clarify the effect of fluoxetine therapy in both gastrointestinal and central nervous system disorders.

### Acknowledgements

This work was funded by a grant from the Spanish Ministry of Science and Technology and the European Regional Development Fund (ERDF/FEDER) (BFI 2003-01541), as well as a grant from the Government of Aragon (Ref B41 2005). The research group is a member of the Network for Cooperative Research on Membrane Transport Proteins (REIT), co-funded by the Spanish Ministry of Education and Science and the European Regional Development Fund (ERDF) (Grant BFU2005-24983-E/BFI).

### References

- Alcalde, A.I., Sorribas, V., 2001. Caco-2 cells and 5-HT transport. *Journal of Physiology and Biochemistry* 57 (2), 117.
- Auerbach, S.B., Hjorth, S., 1995. Effect of chronic administration of the selective serotonin (5-HT) uptake inhibitor citalopram on extracellular 5-HT and apparent autoreceptor sensitivity in rat forebrain in vivo. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 352, 597–606.
- Baker, D.E., 2005. Rationale for using serotonergic agents to treat irritable bowel syndrome. *American Journal of Health-System Pharmacy* 62, 700–711.
- Bakish, D., Cavazzoni, P., Chudzik, J., Ravindran, A., Hrdina, D.P., 1997. Effects of selective serotonin reuptake inhibitors on platelet serotonin parameters in major depressive disorder. *Biological Psychiatry* 41, 14–190.
- Benmansour, S., Cecchi, M., Morilak, D.A., Gerhardt, G.A., Javors, M.A., Gould, G.G., Frazer, A., 1999. Effects of chronic antidepressant treatments on serotonin transporter function, density and mRNA level. *Journal of Neuroscience* 19, 10494–10501.
- Blier, P., Bouchard, C., 1994. Modulation of 5-HT release in the guinea-pig brain following long-term administration of antidepressant drugs. *British Journal of Pharmacology* 113, 485–495.
- Blier, P., Szabo, S.T., 2005. Potential mechanisms of action of atypical antipsychotic medications in treatment-resistant depression and anxiety. *Journal of Clinical Psychiatry* 66, 30–40.
- Burnet, P.W., Michelson, D., Smith, M.A., Gold, P.W., Sternberg, E.M., 1994. The effect of chronic imipramine administration on the densities of the 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptor and the abundances of 5-HT receptor and transporter mRNA in the cortex, hippocampus and dorsal raphe of three strain of rats. *Brain Research* 63, 311–324.
- Ceglia, I., Acconcia, S., Fracasso, C., Colovic, M., Caccia, S., Invernizzi, R.W., 2004. Effects of chronic treatment with escitalopram or citalopram on extracellular 5-HT in the prefrontal cortex of rats: role of 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *British Journal of Pharmacology* 142, 469–478.
- Chantret, I., Rodolose, A., Barbat, A., Dussaulx, E., Brot-Laroche, E., Zweibaum, A., Rousset, A., 1994. Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: evidence for glucose-dependent negative regulation. *Journal of Cell Science* 107, 213–225.
- Cheetham, S.C., Viggers, J.A., Slater, N.A., Heal, D.L., Buckett, W.R., 1993. [<sup>3</sup>H]paroxetine binding in rat frontal cortex strongly correlates with [<sup>3</sup>H]5-HT uptake: effect of administration of various antidepressant treatments. *Neuropharmacology* 32, 737–743.
- Dagestad, G., Kuipers, S.D., Messaoudi, E., Bramham, C.R., 2006. Chronic fluoxetine induces region-specific changes in translation factor eIF4E and eEF2 activity in the rat brain. *European Journal of Pharmacology* 23, 2814–2818.
- Fumagalli, F., Molteni, R., Calibrese, F., Frasca, A., Racagni, G., Riva, A.M., 2005. Chronic fluoxetine administration inhibits extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation in rat brain. *Journal of Neurochemistry* 93, 1551–1560.
- Gobbi, M., Crespi, D., Foddi, M.C., Fracasso, C., Manzini, L., Parotti, L., Mennini, T., 1997. Effects of chronic treatment with fluoxetine and citalopram on 5-HT uptake, 5-HT<sub>1B</sub> autoreceptors, 5-HT<sub>3</sub> and 5-HT<sub>4</sub> receptors in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 356, 22–28.
- Henry, L.K., Field, J.R., Adkins, E.K., Parnas, M.L., Vaughan, R.A., Zou, M., Newman, A.H., Blakely, R.D., 2006. TYR95 and ILE172 in transmembrane segments 1 and 3 of human serotonin transporters interact to establish high-affinity recognition of antidepressants. *Journal of Biological Chemistry* 281, 2012–2023.
- Hrdina, P.D., Vu, T.B., 1993. Chronic fluoxetine treatment up-regulates 5-HT uptake sites and 5-HT<sub>2</sub> receptors in rat brain: an autoradiographic study. *Synapse* 14, 324–331.
- Iceta, R., Mesonero, J.E., Aramayona, J.J., Alcalde, A.I., 2006. Molecular characterization and intracellular regulation of the human serotonin transporter in Caco-2 cells. *Journal of Physiology and Pharmacology* 57 (1), 119–130.
- Koed, K., Linnet, K., 1997. The serotonin transporter messenger RNA level in the rat brain is not regulated by antidepressants. *Biological Psychiatry* 42, 1177–1180.
- Kuroda, Y., Watanabe, Y., McEwen, B.S., 1994. Tianeptine decreases both serotonin transporter mRNA and binding sites in rat brain. *European Journal of Pharmacology* 268 (1), R3–R5.
- Lesch, K.P., Aulakh, C.S., Wolozin, B.L., Tolliver, T.J., Murphy, D.L., 1993. Regional brain expression of serotonin transporter mRNA and its regulation by reuptake inhibiting antidepressants. *Molecular Brain Research* 17, 31–35.
- Linden, D.R., Chen, J.X., Gershon, M.D., Sharkey, K.A., Mawe, G.M., 2003. Serotonin availability is increased in mucosa of guinea pigs with TNBS-induced colitis. *American Journal of Physiology* 285, G207–G216.
- Lopez, J.F., Chalmers, D.T., Vazquez, D.M., Watson, S.J., Akil, H., 1994. Serotonin transporter mRNA in rat brain is regulated by classical antidepressant. *Biological Psychiatry* 35, 287–290.
- Mann, J.J., 2003. Neurobiology of suicidal behaviour. *Nature Reviews Neuroscience* 4, 819–828.
- Martel, F., Monteiro, R., Lemos, C., 2003. Uptake of serotonin at the apical and basolateral membranes of human intestinal epithelial (Caco-2) cells occurs through the neuronal serotonin transporter (SERT). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 306 (1), 355–362.
- Martel, F., Monteiro, R., Lemos, C., Vieira-Coelho, M.A., 2004. In vitro and in vivo effect of fluoxetine on the permeability of <sup>3</sup>H-serotonin across rat intestine. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 82, 940–950.
- Neumaier, J.F., Root, D.C., Hamblin, M.W., 1996. Chronic fluoxetine reduces serotonin transporter mRNA and 5-HT<sub>1B</sub> mRNA in a sequential manner in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuropsychopharmacology* 15, 515–522.
- Piñeyro, G., Blier, P., Dennis, T., de Montigny, C., 1994. Desensitization of the neuronal 5-HT carrier following its long-term blockade. *Journal of Neuroscience* 14, 3036–3047.
- Ramamoorthy, S., Blakely, R.D., 1999. Phosphorylation and sequestration of serotonin transporters differentially modulated by psychostimulants. *Science* 285, 763–766.

- Roman, D.L., Walline, C.C., Rodríguez, G.J., Barrer, E.L., 2003. Interactions of antidepressant with the serotonin transporter: a contemporary molecular analysis. *European Journal of Pharmacology* 479, 53–63.
- Schloss, P., Henn, F.A., 2004. New insights into the mechanism of antidepressant therapy. *Pharmacology and Therapeutics* 102, 47–60.
- Spurlock, G., Buckland, P., O'Donovan, M., McGuffin, P., 1994. Lack of effect of antidepressant drugs on the levels of mRNAs encoding serotonergic receptors, synthetic enzymes and 5-HT transporter. *Neuropharmacology* 33, 433–440.
- Watanabe, Y., Sakai, R.R., McEwen, B.S., Mendelson, S., 1993. Stress and antidepressant effects on hippocampal and cortical 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors and transport sites for serotonin. *Brain Research* 615, 87–94.
- Zhang, Y.W., Rudnick, G., 2005. Serotonin transporter mutations associated with obsessive-compulsive disorder and phosphorylation alter binding affinity of inhibitors. *Neuropharmacology* 49, 791–797.

## VII.4. Artículo 3

**Iceta R, Aramayona JJ, Mesonero JE, Alcalde AI. Regulation of the human serotonin transporter mediated by long-term action of serotonin in Caco-2 cells.**

*Acta Physiologica*, 2007. OnlineEarly Article.

**Published article online: 14-Dec-2007**

**doi: 10.1111/j.1748-1716.2007.01793.x**



## Regulation of the human serotonin transporter mediated by long-term action of serotonin in Caco-2 cells

R. Iceta,<sup>1</sup> J. J. Aramayona,<sup>2</sup> J. E. Mesonero<sup>1</sup> and A. I. Alcalde<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Division of Physiology, Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Veterinary Sciences, Zaragoza University, Zaragoza, Spain

<sup>2</sup> Division of Pharmacology, Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Veterinary Sciences, Zaragoza University, Zaragoza, Spain

Received 14 June 2007,  
revision requested 11 July 2007,  
revision received 21 August 2007,  
accepted 22 October 2007  
Correspondence: A. I. Alcalde,  
Fisiología, Departamento de  
Farmacología y Fisiología, Facultad  
de Veterinaria, Miguel Servet 177,  
50013 Zaragoza, Spain.  
E-mail: aalcalde@unizar.es

### Abstract

**Aim:** The aim of this study was to determine the effect of long-term serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) treatment on the human serotonin transporter (hSERT) function and its expression.

**Methods:** This study was carried out in the enterocyte-like cell line Caco-2. These cells constitutively express the hSERT and have been shown to be an excellent model for the study of this protein. We measured serotonin transport, levels of mRNA expression and of the SERT protein after treating the cells with serotonin.

**Results:** Serotonin treatment diminished hSERT activity in a concentration and period-dependent way by increasing the  $K_t$  value and reducing  $V_{max}$ . This inhibition was reversible and was not mediated by either the action of 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> or 5-HT<sub>4</sub> receptors, or by the intracellular second messengers, protein kinase C and cAMP. 5-HT did not seem to affect either the mRNA level of the SERT or the protein transporter measured in either the membrane or the cell lysate. The 5-HT treatment effect was additive to the inhibitory effect of treatment with a low concentration of citalopram and fluoxetine. Nevertheless, 5-HT did not increase the inhibition yielded by treatment with high concentration citalopram.

**Conclusion:** The chronic increase in serotonin in the extracellular medium diminishes the function of the SERT. This effect seems to be due to an effect on the transporter molecule itself in the membrane, without altering protein synthesis, intracellular traffic, or its availability.

**Keywords** Caco-2, regulation, serotonin transporter, serotonin treatment.

Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) is a neurotransmitter, mainly produced in the enterochromaffin cells of the gastrointestinal tract, which regulates activity in the central and peripheral nervous system, as well as in a number of non-neuronal tissues in the gut, cardiovascular system and blood. The effects of 5-HT are mediated by membrane bound receptors, and depend on 5-HT extracellular availability, which is modulated by both 5-HT cellular release ('on') and uptake ('off').

The serotonin transporter (SERT) is involved in 5-HT uptake to enable its clearance from the extracellular

milieu. Consequently, this transporter in part determines 5-HT availability. SERT expression and activity have been described in the central and enteric nervous system (Rudnick & Clark 1993, Chen *et al.* 2001) and in specialized non-neuronal cells including platelets (Lesch *et al.* 1993), placental syncytiotrophoblasts (Balkovetz *et al.* 1989), and epithelial cells of the gastrointestinal mucosa (Wade *et al.* 1996, Chen *et al.* 1998, Martel *et al.* 2003, Iceta *et al.* 2006).

Serotonin is involved in the aetiology of numerous disease states, either in the central nervous system,

including depression, anxiety and schizophrenia (Purselle & Nemeroff 2003), or in the gastrointestinal tract, such as irritable bowel syndrome and ulcerative colitis (Coates *et al.* 2004, Gershon 2004). For this reason, SERT has become an interesting molecular target for multiple therapeutic compounds that modulate 5-HT availability by inhibiting the activity of SERT (selective serotonin reuptake inhibitors, SSRIs). These compounds are effective only after long-term treatment, and recent results have shown that SSRIs themselves may affect human SERT (hSERT) availability after treatment (Iceta *et al.* 2007). Inhibition of SERT activity increases 5-HT availability in the extracellular medium. This, in turn, desensitizes the 5-HT receptors and, in the end, affects serotonergic activity. Nevertheless, long-term modulation of SERT by serotonin remains unknown.

The effect of 5-HT on SERT was already determined after short-term exposure (30 min) in an interesting study which concluded that 5-HT prevented protein kinase C (PKC)-dependent SERT phosphorylation and sequestration (Ramamoorthy & Blakely 1999). On the other hand, recent studies have focused on the short-term effect of 5-HT on antidepressant dissociation rates, in order to characterize the allosteric mechanism of SERT (Chen *et al.* 2005, Neubauer *et al.* 2006, El Mansari *et al.* 2007). However, none of these studies have determined whether long-term treatment with 5-HT affects SERT activity. On the contrary, the effect of long-term serotonin depletion in rat brain has been studied, and the results have been contradictory: Linnet *et al.* (1995) obtained a reduction in SERT gene expression, whereas Dewar *et al.* (1992) did not find any effect on maximum binding capacity ( $B_{\max}$ ) or dissociation constant ( $K_D$ ) of [ $^3\text{H}$ ]paroxetine for the 5-HT uptake recognition site.

The aim of this study was to determine the effect of long-term exposure of 5-HT on SERT activity and expression. For this purpose we used Caco-2 cells, the human enterocyte-like cell line which constitutively expresses hSERT (Martel *et al.* 2003), and that has been shown to be an excellent model for studying the function and regulation of hSERT (Iceta *et al.* 2006, 2007).

Our results show that long-term treatment with 5-HT diminishes 5-HT uptake in a concentration and period-dependent way. This effect was not mediated by 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> or 5-HT<sub>4</sub> receptors, or the intracellular messengers, PKC and cAMP. Treatment with 5-HT did not affect the hSERT mRNA level. In addition, the hSERT protein content in either the whole cell lysate or the membrane was not altered by treatment with 5-HT. The kinetic study showed that 5-HT treatment affects both  $V_{\max}$  (decreasing) and  $K_t$  (increasing). The effect was reversible and was also additive to the inhibition yielded

by treatment with a low concentration of either citalopram or fluoxetine. However, 5-HT treatment was not additive to the inhibitory effect of citalopram treatment at a high concentration. Taken together, it can be concluded that hSERT activity is inhibited by 5-HT treatment, which may act directly on hSERT protein to alter its function. According to these results, the hSERT low affinity binding site might be involved.

These results may be of potential physiological and therapeutical relevance in the regulation of hSERT activity, and they may help to clarify the response of the serotonergic system after long-term treatment with drugs which increase the availability of 5-HT in the extracellular medium. This study may also be very useful in explaining the hSERT response in the acute adverse reaction to medications that enhance serotonergic activity, known as serotonin toxicity or serotonin syndrome.

## Materials and methods

### Cell culture

Caco-2/TC7 cells (Chantret *et al.* 1994) were kindly provided by Dr Edith Brot-Laroche (U-505 INSERM). The cells were cultured at 37 °C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and maintained in high glucose DMEM, supplemented with 50 U mL<sup>-1</sup> penicillin, 50 µg mL<sup>-1</sup> streptomycin, 1% non-essential amino acids and 20% foetal bovine serum (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The cells were passaged enzymatically (0.25% trypsin-1 mM EDTA) and subcultured in 25 or 75 cm<sup>2</sup> plastic culture flasks (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). The medium was changed 48 h after seeding and daily thereafter. The cells were always used between passages 19 and 35. For 5-HT uptake assays, cells were seeded in 24-well plates at a density of 4 × 10<sup>4</sup> cells/well, and uptake measurements were carried out 14 days after seeding (10 days after confluence). Previous results (Iceta *et al.* 2006) have shown that Caco-2 cells express hSERT, whose activity reaches a plateau the fifth day after confluence. Serotonin and the different modifiers were added to the culture medium at different concentrations and periods, depending on the experiment. The culture medium was free of foetal bovine serum 48 h before using the cells in order to prevent the effect of 5-HT present in the foetal bovine serum. This condition did not affect either the status of functional differentiation or the hSERT activity of Caco-2 cells (data not shown).

### 5-HT uptake studies

Uptake measurements were performed on cells attached to 24-well plates either under control or after



different experimental conditions. The transport medium composition in mM was as follows: 137 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 MgSO<sub>2</sub>, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES pH 7.4, 4 glutamine, 0.1% bovine serum albumin (BSA), and both 5-HT 2 × 10<sup>-7</sup> M and <sup>3</sup>[H]-5-HT (specific activity 20 Ci mmol<sup>-1</sup>). Before measuring uptake, cells were pre-incubated at 37 °C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> with substrate-free transport medium for 30 min. The cells were then immediately washed with the substrate-free transport medium at 37 °C, and then incubated with the transport medium at 37 °C for 6 min. Transport was stopped by removing the transport medium and washing the cells twice with an ice-cold substrate-free transport medium containing 10<sup>-3</sup> M 5-HT. Cells were then solubilized in 0.1 M NaOH and samples were taken for radioactivity counting. Protein was measured using the Bradford method (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), with BSA as standard. Transport results were expressed in pmol 5-HT mg<sup>-1</sup> protein.

#### RNA extraction, reverse transcription and semi-quantitative PCR analysis

RNA extractions were carried out with the RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. Total RNA was extracted from Caco-2 cells cultured in 25 cm<sup>2</sup> flasks, 14 days after seeding and under the different experimental conditions. Total RNA (1 µg) was used as a template for first-strand cDNA synthesis using oligo(dT) primers and a modified M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen). Negative amplification control was performed in the absence of reverse transcriptase. One-tenth of the resultant cDNA was used for hSERT PCR amplification using human β-actin as an internal control. The specific primers used were (5'-3'): hSERT sense AAATCCAAGCACCCAGAGAT and hSERT anti-sense AGACTGTGTCCCTGTGGAGA; β-actin sense AGCACGGCATC-GTCACCAACT and β-actin antisense ACATGGCTGGGTGTTGAAGG. Twenty-seven cycles were carried out for hSERT PCR amplification as follows: 94 °C for 30 s, 56 °C for 30 s and 68 °C for 2 min 30 s. PCR amplification of β-actin was obtained after 23 cycles under the following conditions: 94 °C for 30 s, 60 °C for 30 s and 68 °C for 30 s. These final hSERT and β-actin PCR conditions were determined after screening (20–30 cycles). Final PCR amplification conditions were chosen so that none of the RNAs (cDNAs) analysed reached a plateau at the end of the amplification protocol. PCR products were electrophoresed on 1% agarose gel and visualized under UV light after ethidium bromide staining. The images from the gels were captured with BIODOC-IT IMAGING SYSTEM (UVP, Upland, CA, USA). The fragment sizes were 2105 for

hSERT and 193 for β-actin. The hSERT/β-actin ratio in densitometric units was calculated with DOC-IT<sup>®</sup>LS Image Analysis Software (UVP).

#### Preparation of the brush border purified fraction from Caco-2 cells and western blotting

Caco-2 cells were cultured in 25 cm<sup>2</sup> flasks and were used 14 days after seeding and different experimental conditions. The cells were washed twice with phosphate-buffered saline and immediately resuspended with cold Tris–manitol buffer (Tris 2 mM, manitol 50 mM, pH 7.1) containing protease inhibitors and 0.02% sodium azide. The suspension was homogenized and the cells were disrupted by sonication (fifteen 1 s bursts, 60 W). One sample was taken from the lysate for total protein analysis and protein quantification. CaCl<sub>2</sub> (final concentration 20 mM) was added to the cell lysate and after standing for 10 min in ice, the mixture was centrifuged for 10 min at 950 g. The supernatant was taken and centrifuged at 35 000 g for 30 min. The pellet (brush border purified fraction) was then resuspended in phosphate buffer (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, pH 6.8) and a sample was taken for protein analysis. Protein was measured using the Bradford method (Bio-Rad), with BSA as standard.

Brush border purified samples and cell lysate (total protein 60 µg) from Caco-2 cells were electrophoresed in 9% SDS–PAGE gels, and then transferred to polyvinylidene difluoride membranes by electroblotting. The membranes were blocked with 5% non-fat dried milk plus 1% BSA, and probed with a mouse monoclonal anti-human SERT 1 : 500 (Mab Technologies, Stone Maintain, GA, USA). The primary antibody was detected using a secondary goat anti-mouse Ig coupled to horseradish peroxidase (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA) and the ECL Plus detection kit (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) and was visualized with X-ray films (Hyperfilm MP; GE Healthcare). The blots were re-probed, after stripping with a rabbit polyclonal anti-actin antibody to determine differences in the sample load.

#### Chemicals

The following drugs and substances were used (abbreviations and respective suppliers in parentheses): serotonin (5-HT), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), dibutyryl-cAMP (d-cAMP), KT5720 (KT) and bisindolylmaleimide II (BIS) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). <sup>3</sup>[H]-5-HT (Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA). Ritanserin, zacopride hydrochloride and GR 13808 (Tocris Bioscience, Bristol, UK).

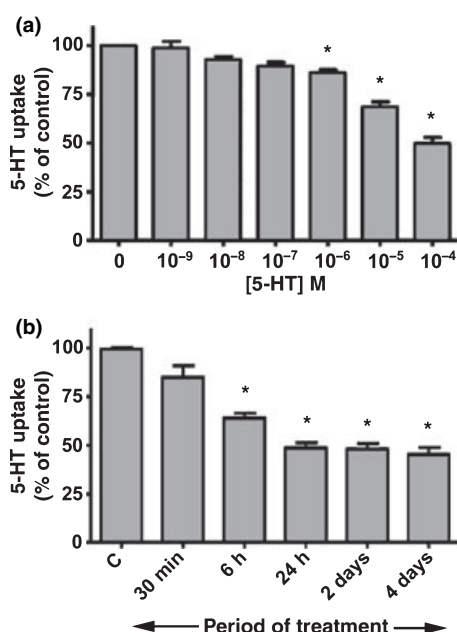
### Statistical analysis

All results are expressed as mean  $\pm$  standard error. Statistical comparisons were performed by paired *t*-test, with a confidence interval of 95% ( $P < 0.05$ ). Kinetic analysis of the 5-HT transport values was performed by nonlinear regression, fitting the results to an equation containing a saturable (Michaelis–Menten) plus a non-saturable (diffusion) component. The 5-HT transport kinetic constants and the statistical analysis were carried out by the computer-assisted PRISM GRAPHPAD Program (Prism version 4.0).

### Results

#### Effect of 5-HT treatment on 5-HT uptake and calculation of kinetic constants

The uptake of 5-HT was measured in Caco-2 cells treated with 5-HT for 4 days at different concentrations ( $10^{-9}$ – $10^{-4}$  M). The results show that 5-HT treatment yields a decrease in 5-HT uptake (Fig. 1a), this being significant only when the cells were treated with high



**Figure 1** Effect of different 5-HT treatments on 5-HT uptake. Uptake was measured after 6 min of incubation of  $^3\text{[H]}$ -5-HT plus  $2 \times 10^{-7}$  M 5-HT. (a) Effect of the 5-HT concentration treatment on 5-HT transport. 5-HT concentration treatment ranged between  $10^{-9}$  and  $10^{-4}$  M. The treatment period was 4 days. (b) Effect of the 5-HT treatment period on 5-HT uptake. 5-HT concentration treatment was  $10^{-4}$  M. The results in both experiments are expressed as the % of the uptake control, and are the mean  $\pm$  standard error of five independent experiments. \* $P < 0.05$  compared with control (untreated cells).

5-HT concentrations ( $10^{-6}$ – $10^{-4}$  M). In addition, the correlation between the treatment period and 5-HT uptake inhibition was also determined. The 5-HT concentration assayed was  $10^{-4}$  M. The results show that 5-HT inhibition was significant after a 6-h treatment and the maximum effect was reached after a 24-h treatment (Fig. 1b). This effect remained constant after 2 and 4 days of 5-HT treatment. As previous results showed that the maximum effect of SSRIs (fluoxetine) on hSERT was reached after 4 days of treatment (Iceta *et al.* 2007), this period was used in subsequent experiments.

In order to characterize kinetically the 5-HT effect on the transport,  $V_{\max}$  (transport capacity) and  $K_t$  (transport affinity) were determined after 4 days of 5-HT treatment. The results obtained show that  $V_{\max}$  was reduced and the  $K_t$  was increased after 5-HT treatment (Table 1).

#### Role of 5-HT receptors and intracellular second messengers in 5-HT uptake alteration produced by 5-HT

In order to ascertain the 5-HT effect on hSERT function with greater accuracy, the involvement of different 5-HT receptors was determined. 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> and 5-HT<sub>4</sub> receptors were tested as they have been described as mediating 5-HT regulation of intestinal epithelial processes (Salvador *et al.* 1997) and results obtained in our laboratory have shown that Caco-2 cells express these receptors. The cells were treated with ritanserin, zacopride or GR 113808 (5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> and 5-HT<sub>4</sub> antagonists respectively;  $10^{-9}$  M), plus 5-HT  $10^{-4}$  M for 4 days. The results show that none of these antagonists blocked the 5-HT effect, nor did they themselves affect 5-HT uptake (Fig. 2).

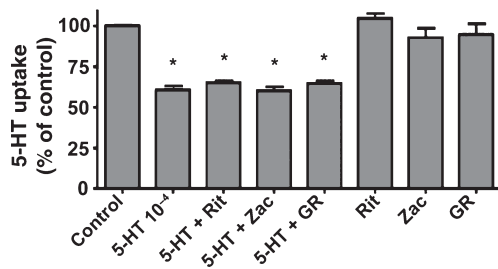
In order to determine in greater depth a possible intracellular mechanism involved in the 5-HT treatment effect, uptake of 5-HT was measured in Caco-2 cells treated simultaneously for 4 days with 5-HT ( $10^{-4}$  M) and either PMA ( $10^{-6}$  M), an activator of PKC, d-cAMP ( $10^{-3}$  M), a non-metabolizable analogue of cAMP, BIS ( $2 \times 10^{-6}$  M), an inhibitor of PKC, or KT ( $10^{-6}$  M), an

**Table 1** Effect of 5-HT treatment on hSERT kinetic constants

Conditions	$V_{\max}$ (pmol 5-HT $\text{mg}^{-1}$ protein)	$K_t$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_D$ ( $\mu\text{L mg}^{-1}$ protein)
Control	$28.12 \pm 3.60$	$0.29 \pm 0.04$	$5.25 \pm 0.71$
5-HT ( $10^{-5}$ M)	$16.91 \pm 2.90^*$	$0.34 \pm 0.07$	$4.74 \pm 0.35$
5-HT ( $10^{-4}$ M)	$12.80 \pm 1.90^*$	$0.49 \pm 0.11^*$	$5.35 \pm 0.91$

Results are the mean  $\pm$  standard error of seven experiments. 5-HT, 5-hydroxytryptamine; hSERT, human serotonin transporter.

\* $P < 0.05$  compared with control value.



**Figure 2** Role of 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> and 5-HT<sub>4</sub> receptors in the 5-HT treatment effect on 5-HT uptake. Transport was measured after 6 min of incubation with <sup>3</sup>[H]-5-HT and 5-HT  $2 \times 10^{-7}$  M. Cells were untreated (control) or treated with 5-HT ( $10^{-4}$  M) and ritanserin (Rit), zacopride (Zac) or GR113808 (GR) (5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> and 5-HT<sub>4</sub> antagonists respectively) ( $10^{-9}$  M) for 4 days. Results are expressed as the % of the uptake control and are expressed as the mean  $\pm$  standard error of six independent experiments. \* $P < 0.05$  compared with the control value.

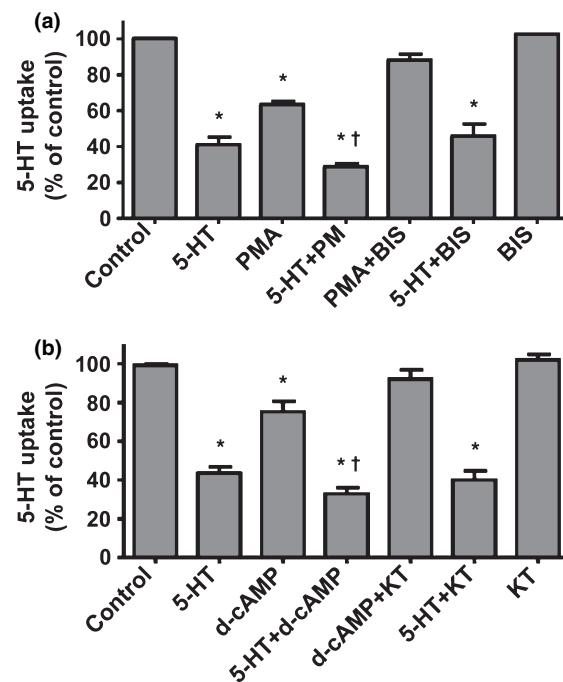
inhibitor of PKA. The results show that both PMA and d-cAMP significantly reduced 5-HT uptake, and this effect was additive to the reduction yielded by 5-HT. On the other hand, the 5-HT effect was not reverted by either BIS or KT, although these inhibitors significantly reverted the PMA and d-cAMP effect on 5-HT uptake, without affecting 5-HT uptake itself (Fig. 3a,b).

#### Study of the 5-HT effect on hSERT mRNA level and hSERT protein expression

As the results pointed mainly to hSERT functional alteration, we determined the molecular effect of hSERT yielded by treatment with 5-HT  $10^{-4}$  M for 4 days, by studying both hSERT mRNA and protein expression. The mRNA level was determined by semi-quantitative RT-PCR and the results showed that 5-HT treatment did not alter the level of mRNA (Fig. 4). In addition, 5-HT treatment did not modify protein expression in the whole cell (cell lysate) or in the brush border membrane (apical membrane) measured by western blot (Fig. 5).

#### Reversibility of the effect of 5-HT treatment on hSERT function

The results indicate that 5-HT treatment diminishes hSERT activity with no alteration of either hSERT synthesis or hSERT availability in the membrane. In order to gain an in-depth knowledge of the effect of 5-HT treatment, the reversibility of hSERT activity was studied. For this purpose a set of experiments was designed, in which after 4 days of treatment with 5-HT  $10^{-4}$  M, 5-HT was removed from the culture medium and 5-HT uptake was measured after different periods.

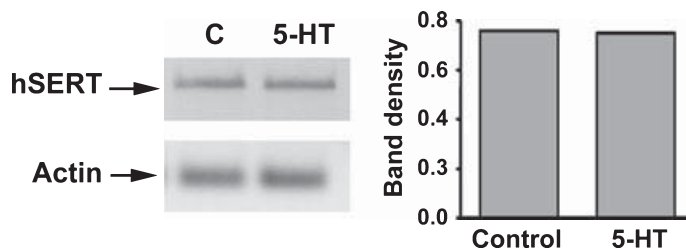


**Figure 3** Role of PKC and cAMP on the 5-HT treatment effect on the 5-HT uptake. 5-HT transport was measured after 6 min of incubation with <sup>3</sup>[H]-5-HT and  $2 \times 10^{-7}$  M 5-HT. In control conditions, cells were not treated. In treatment conditions Caco-2 cells were treated for 4 days. (a) Treatments were as follows: 5-HT, cells were treated with 5-HT ( $10^{-4}$  M); PMA, cells were treated with PMA ( $10^{-6}$  M); 5-HT + PMA, cells were simultaneously treated with 5-HT ( $10^{-4}$  M) plus PMA ( $10^{-6}$  M); PMA + BIS, treatment with PMA ( $10^{-6}$  M) plus bisindolylmaleimide II (BIS) ( $2 \times 10^{-6}$  M); 5-HT + BIS, treatment with 5-HT ( $10^{-4}$  M) plus bisindolylmaleimide II (BIS) ( $2 \times 10^{-6}$  M); BIS, treatment with bisindolylmaleimide II (BIS) ( $2 \times 10^{-6}$  M). (b) Conditions of treatment were: 5-HT, cells were treated with 5-HT ( $10^{-4}$  M); d-cAMP, cells were treated with d-cAMP ( $10^{-3}$  M); 5-HT + d-cAMP, cells treated with 5-HT ( $10^{-4}$  M) plus d-cAMP ( $10^{-3}$  M); d-cAMP + KT, cells treated with d-cAMP ( $10^{-3}$  M) plus KT 5720 (KT) ( $10^{-6}$  M); 5-HT + KT, cells were treated with 5-HT ( $10^{-4}$  M) plus KT 5720 (KT) ( $10^{-6}$  M); KT, treatment with KT 5720 (KT) ( $10^{-6}$  M). Results are expressed as the % of the uptake control, and were the mean  $\pm$  standard error of six independent experiments. \* $P < 0.05$  compared with control value; † $P < 0.05$  compared with 5-HT value.

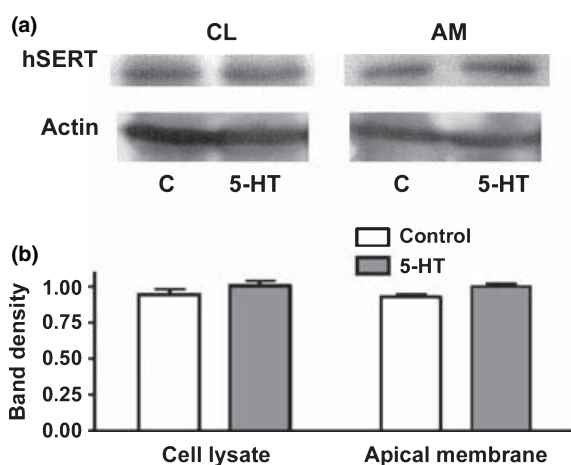
The results show that although inhibition of hSERT activity progressively disappears after withdrawal of the treatment, the control 5-HT uptake level was not reached even after 2 days of recovery (Fig. 6).

#### Effect of citalopram and fluoxetine treatment on hSERT activity in cells treated with 5-HT

Citalopram and fluoxetine are two SSRIs frequently used in human disorders in which the serotonergic

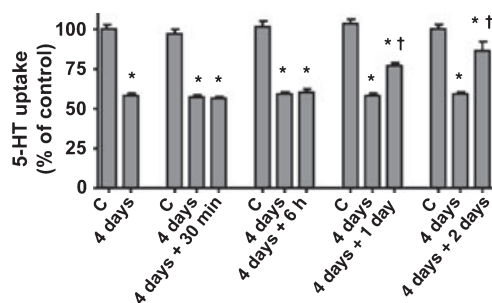


**Figure 4** Effect of 5-HT treatment on hSERT mRNA levels. Cells were treated for 4 days with 5-HT  $10^{-4}$  M, and the total RNA was extracted. On the left-hand side is the PCR product of the semi-quantitative RT-PCR analysis of hSERT and actin in control and treated cells. On the right-hand side, quantification of the hSERT PCR product compared with the actin PCR product (hSERT/ $\beta$ -actin ratio) in control cells and cells treated with 5-HT. Results are expressed in arbitrary densitometric units and are the mean of three independent experiments.



**Figure 5** Effect of 5-HT treatment on hSERT protein expression. Caco-2 cells were treated with 5-HT  $10^{-4}$  M for 4 days. (a) Cell lysate (CL) and the brush border membrane (apical membrane, AM) samples were electrophoresed (SDS-PAGE) and hSERT immunodetected. Actin was probed to determine differences in the sample load. (b) Quantification of hSERT protein in both CL and AM compared with actin (hSERT/ $\beta$ -actin ratio). Results are expressed in arbitrary densitometric units, and are the mean  $\pm$  standard error of six independent experiments.

system is involved. As SSRIs increase 5-HT availability, it seemed useful to study the interaction between either the chronic effect of citalopram or fluoxetine, and the treatment effect of 5-HT on hSERT function. For this purpose, a set of experiments was designed to measure 5-HT uptake in cells treated with 5-HT ( $10^{-4}$  M) and SSRIs (citalopram or fluoxetine), and thus determine their interaction on hSERT activity. The period of treatment was 2 days in order to avoid a maximum effect of fluoxetine and citalopram which may hide an additive effect of 5-HT. The results indicate that treatment with citalopram ( $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-5}$  and  $10^{-4}$  M) or fluoxetine ( $10^{-8}$  and  $10^{-7}$  M) reduced 5-HT uptake. This effect was additive to 5-HT treatment

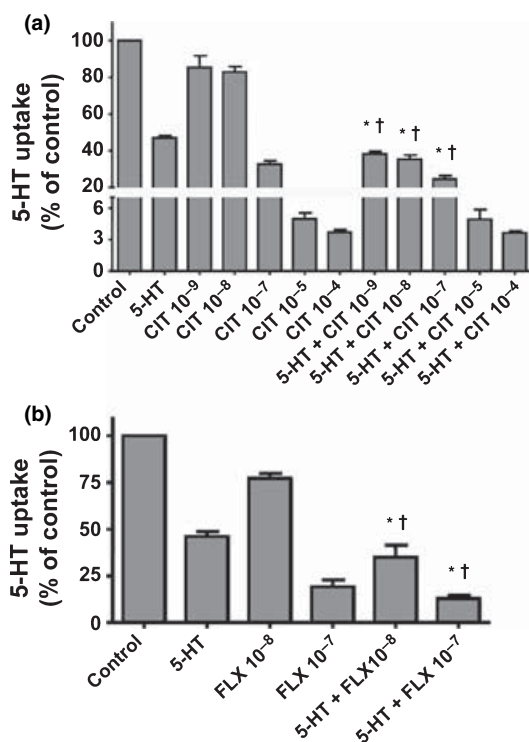


**Figure 6** Recovery of 5-HT uptake after treatment with 5-HT. Conditions of the experiments were: control, untreated cells; 4 days, cells treated for 4 days with 5-HT ( $10^{-4}$  M); 4 days + 30 min, 5-HT treatment for 4 days and withdrawal 30 min before the experiment; 4 days + 6 h, 5-HT treatment for 4 days and withdrawal 6 h before the experiment; 4 days + 1 d, 5-HT treatment for 4 days and withdrawal 1 day before the experiment; 4 days + 2 days, 5-HT treatment for 4 days and withdrawal 2 days before the experiment. In each experiment, 5-HT uptake was measured in control, 5-HT 4 days treatment and the corresponding recovery condition. 5-HT concentration for uptake determination was  $2 \times 10^{-7}$  M and the period of incubation was 6 min. Results are indicated as the % of 5-HT uptake by the corresponding control, and are the mean  $\pm$  standard error of five independent experiments. \* $P < 0.05$  compared with the control of each condition. † $P < 0.05$  compared with corresponding 5-HT uptake after 4 days of treatment.

when either citalopram  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$  or  $10^{-7}$  M (Fig. 7a) or fluoxetine ( $10^{-8}$  and  $10^{-7}$  M) (Fig. 7b) were included in the treatment. Nevertheless, simultaneous treatment with 5-HT plus citalopram ( $10^{-5}$  or  $10^{-4}$  M) (Fig. 7a) did not yield additive inhibition.

## Discussion and conclusions

The alteration of serotonergic activity has been described as being involved in the aetiology of numerous pathologies either in the central nervous system (Purselle & Nemeroff 2003), or in the gastro-intestinal



**Figure 7** Effect of citalopram and fluoxetine treatment on 5-HT uptake in cells treated with 5-HT. In control conditions, cells were not treated. Cells were treated for 2 days with 5-HT  $10^{-4}$  M. (a) Treatment with citalopram (CIT) for 2 days at different concentrations. (b) Cells were treated with fluoxetine (FLX) at different concentrations for 2 days. 5-HT concentration in uptake determination was  $2 \times 10^{-7}$  M and incubation time was 6 min. Results are expressed as a percentage of the control uptake and are the mean  $\pm$  standard error of five independent experiments. \* $P < 0.05$  compared with 5-HT treatment. † $P < 0.05$  compared with corresponding citalopram concentration treatment (a) or corresponding fluoxetine concentration treatment (b).

tract (Coates *et al.* 2004, Gershon 2004). SERT is the molecular target for multiple therapeutic compounds (SSRIs) that increase 5-HT availability by inhibiting SERT activity. Nevertheless, the efficacy of this pharmacological treatment is achieved only after long-term treatment. Treatment with SSRIs increases 5-HT availability in the extracellular medium, not only by inhibiting SERT activity but also by modulating SERT protein expression (Iceta *et al.* 2007). 5-HT increase has been described to affect serotonergic activity by desensitizing 5-HT receptors. However, long-term modulation of SERT by serotonin remains unknown.

The aim of this research was to study the effect of long-term treatment with 5-HT on hSERT activity and expression in order to gain an in-depth knowledge of serotonergic activity modulation mediated by an increase in extracellular 5-HT availability. This study was carried out on Caco-2 cells, which have been

described as being an excellent model of SERT expression (Martel *et al.* 2003, Iceta *et al.* 2006).

The results obtained show that 5-HT treatment diminishes hSERT activity. This effect was dependent on both the treatment period, reaching a maximum response after 1 day of treatment, and 5-HT concentration, inhibition being significant when the cells were treated with a high 5-HT concentration ( $10^{-6}$ – $10^{-4}$  M). These concentrations are included in the 5-HT physiological range, as exposure to 5-HT concentrations as high as  $6 \times 10^{-3}$  M have been described in pre-synaptic SERT, although after diffusion into the extracellular compartment, 5-HT concentration was 55 nM (Bunin & Wightman 1998). Similarly, in Caco-2 cells, 5-HT concentration in the culture medium may decrease progressively during the period of treatment, as far as the culture medium is replaced (the day after), as Caco-2 cells are able to uptake 5-HT through hSERT.

To learn more of the functional characteristics of this inhibitory effect, a kinetic study was carried out to determine the effect of 5-HT treatment on the kinetic transport constants  $V_{max}$  and  $K_t$ . The results show that  $V_{max}$  was reduced and  $K_t$  was increased after 5-HT treatment, and consequently, both hSERT capacity and affinity seem to be affected by 5-HT treatment.

The physiological effects of 5-HT are mediated by different 5-HT receptors widely distributed throughout the body. 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> and 5-HT<sub>4</sub> receptors, which have been described as being involved in 5-HT modulation of intestinal epithelial processes (Salvador *et al.* 1997), are also expressed in Caco-2 cells (data not shown). Although exposure to 5-HT yields receptor desensitization, the involvement of 5-HT receptors in 5-HT treatment effect on SERT cannot be discarded. In order to clarify this point, the involvement of 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> and 5-HT<sub>4</sub> receptors was determined by treating the cells with specific receptor antagonists. The results show that none of these receptors seems to mediate 5-HT action.

Short-term exposure to 5-HT prevented phosphorylation of SERT through PKC, besides increasing the availability of SERT in the membrane of transfected cells (Ramamoorthy & Blakely 1999). Moreover, long-term treatment of Caco-2 cells with either PKC or PKA activators reduced hSERT function (Iceta *et al.* 2006). In order to determine the mechanism of 5-HT treatment inhibition of hSERT, the role of intracellular processes mediated by second messengers like PKC and cAMP was studied. The results obtained in this study show that treatment of Caco-2 cells with PKC and cAMP-specific activators (PMA and d-cAMP respectively) inhibited hSERT function, which was reverted by simultaneous treatment of the cells with PKC and cAMP inhibitors (BIS or KT respectively). However, hSERT inhibition produced by treatment with 5-HT was additive to the

inhibition yielded by PMA and d-cAMP, and the effect of 5-HT treatment was not reverted by BIS or KT. Consequently the 5-HT effect did not appear to be mediated through PKC or cAMP. These results disagree in part with the effect shown by 5-HT after short-term treatment (Ramamoorthy & Blakely 1999) as long-term treatment with 5-HT, and the phosphorylation mediated by PKC, appear to affect independently hSERT activity, and, moreover, both effects are additive.

Numerous transporter molecules have been described as being regulated by their substrates. In the case of 5-HT, the results obtained under depletion conditions have shown to be controversial. Thus, hSERT mRNA levels have been shown to be reduced by chronic 5-HT depletion in rat brain (Linnet *et al.* 1995). Nevertheless, neither the maximum binding capacity ( $B_{\max}$ ) nor the dissociation constant ( $K_D$ ) of [ $^3\text{H}$ ]paroxetine for the 5-HT uptake recognition sites were affected (Dewar *et al.* 1992). Our results show that mRNA levels were not affected by treatment with 5-HT, thus indicating that 5-HT may not affect hSERT transcription. In addition, the results obtained by western blotting show that 5-HT treatment did not affect hSERT expression in brush border membrane and total cell homogenate. As the kinetic study has shown that 5-HT treatment increases  $K_t$  (competitive inhibition) and reduces  $V_{\max}$  (uncompetitive inhibition), a mix type of inhibition may be hypothesized. In accordance with this result, Ramamoorthy *et al.* (2007) showed that SERT capacity ( $V_{\max}$ ) alteration is not always due to a modification in the abundance of SERT in the membrane, and it may be independent of a trafficking mechanism.

From the results obtained, it can be inferred that 5-HT treatment alters hSERT activity by affecting the hSERT molecule itself located in the membrane, and this effect did not seem to be mediated by intracellular PKC and cAMP. The possibility of a direct effect of 5-HT on the hSERT molecule modulating its activity has been previously hypothesized (Ramamoorthy & Blakely 1999).

Several studies using brain neuronal and platelet membranes have revealed that at least two binding sites are present on the SERT protein; a primary high-affinity binding site that mediates 5-HT reuptake, and an allosteric low-affinity binding site that regulates the binding of ligands at the primary site (Plenge & Mellerup 1985, Wennogle & Meyerson 1985, Plenge *et al.* 1991). 5-HT has been found to possess affinity for both sites (Neubauer *et al.* 2006) and to act as an allosteric effector at a number of SERT high-affinity ligands (Chen *et al.* 2005). This raises the possibility that 5-HT may act as a self-regulating allosteric effector modulating the transport function. In our study 5-HT reduced its own transport after treatment with a high 5-HT concentration [ $10^{-4}$  M much more than the  $K_t$  described for hSERT activity

( $6 \times 10^{-7}$  M)] (Iceta *et al.* 2006). This fact indicates that the 5-HT effect might be mediated by the action of a low-affinity binding in hSERT.

The results obtained in the experiments, in which cells were treated simultaneously with 5-HT and citalopram or fluoxetine, may be useful to clarify this point. Citalopram binds to both high affinity (transport) and low affinity (allosteric) binding sites in SERT. On the other hand, fluoxetine does not possess any significant binding affinity for the allosteric site (Chen *et al.* 2005). Our results show that the effect on hSERT activity of treatment with low citalopram concentration ( $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$  and  $10^{-7}$  M), at which the allosteric effect of citalopram is scarce, was additive to the 5-HT treatment effect, whereas citalopram treatment at high concentration, at which citalopram binds to the allosteric site, was not additive to the 5-HT treatment effect. However, the 5-HT treatment effect was additive to the effect of the treatment with fluoxetine, thus indicating that 5-HT and fluoxetine treatments may act through different mechanisms. Iceta *et al.* (2007) showed that fluoxetine treatment diminishes hSERT availability in the membrane through a post-translational mechanism. Taken together, it may be deduced that 5-HT may act at the low affinity site.

This is the first time that the effects of the treatment with 5-HT on hSERT activity and expression have been studied. The role of 5-HT as a modulator after long-term treatment at high concentrations may be of potential physiological importance in the regulation of hSERT activity, and may represent interesting information in relation to therapy interventions with SSRIs. Moreover, the results of this study may be useful in clarifying serotonin toxicity (serotonin syndrome), which is the acute adverse reaction to medication that enhances serotonergic activity. Most serotonin toxicity studies have focused on the role of drug–drug interactions in the increase in 5-HT availability responsible for toxicity (Gillman 2006). Nevertheless, the role of 5-HT in the regulation of 5-HT availability cannot be discarded.

In summary, the results of this study show that 5-HT treatment inhibits hSERT activity through an independent mechanism on the transcription, on protein synthesis or on protein trafficking processes. This effect might be the consequence of an action on the hSERT molecule itself located in the membrane.

### Conflict of interest

There are no conflicts of interest.

This work was funded by a grant from the Spanish Ministry of Science and Technology and the European Regional Development Fund (ERDF/FEDER) (BFI 2003-01541), as well as a grant from the Aragon Regional Government (Ref. B61 2006/2007). The research group is a member of the Network for



Acta Physiol 2007

Cooperative Research on Membrane Transport Proteins (REIT), co-funded by the Spanish Ministry of Education and Science and the European Regional Development Fund (ERDF) (Grant BFU2005-24983-E/BFI).

## References

- Balkovetz, D.F., Tirupathi, C., Leibach, F.H., Mahesh, V.B. & Ganapathy, V. 1989. Evidence for an imipramine-sensitive serotonin transporter in human placental brush-border membranes. *J Biol Chem* **264**, 2195–2198.
- Bunin, M.A. & Wightman, R.M. 1998. Quantitative evaluation of 5-hydroxytryptamine (serotonin) neuronal release and uptake: an investigation of extrasynaptic transmission. *J Neurosci* **18**, 4854–4860.
- Chantret, I., Rodolosse, A., Barbat, A., Dussaulx, E., Brot-Laroche, E., Zweibaum, A. & Rousset, M. 1994. Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell-line Caco-2 – evidence for glucose-dependent negative regulation. *J Cell Sci* **107**, 213–225.
- Chen, J.X., Pan, H., Rothman, T.P., Wade, P.R. & Gershon, M.D. 1998. Guinea pig 5-HT transporter: cloning, expression, distribution, and function in intestinal sensory reception. *Am J Physiol* **38**, G433–G448.
- Chen, J.J., Li, Z., Pan, H., Murphy, D.L., Tamir, H., Koepsell, H. & Gershon, M.D. 2001. Maintenance of serotonin in the intestinal mucosa and ganglia of mice that lack the high-affinity serotonin transporter: abnormal intestinal motility and the expression of cation transporters. *J Neurosci* **21**, 6348–6361.
- Chen, F., Larsen, M.B., Neubauer, H.A., Sánchez, C., Plenge, P. & Wiborg, O. 2005. Characterization of an allosteric citalopram-binding site at the serotonin transporter. *J Neurochem* **92**, 21–28.
- Coates, M.D., Mahoney, C.R., Linden, D.R., Sampson, J.E., Chen, J., Blaszyk, H., Crowell, M.D., Sharkey, K.A., Gershon, M.D., Mawe, G.M. & Moses, P.L. 2004. Molecular defects in mucosal serotonin content and decreased serotonin reuptake transporter in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* **126**, 1657–1664.
- Dewar, K.M., Grondin, L., Carli, M., Lima, L. & Reader, T.A. 1992. [<sup>3</sup>H]Paroxetine binding and serotonin content of rat cortical areas, hippocampus, neostriatum, ventral mesencephalic tegmentum and midbrain raphe nuclei region following p-chlorophenylalanine and p-chloroamphetamine treatment. *J Neurochem* **58**, 250–257.
- El Mansari, M., Wiborg, O., Mnie-Filali, O., Bentruquia, N., Sánchez, C. & Haddjeri, N. 2007. Allosteric modulation of the effect of escitalopram, paroxetine and fluoxetine: in vitro and in vivo studies. *Int J Neuropsychopharmacol* **10**, 31–40.
- Gershon, M.D. 2004. Serotonin receptors and transporters. Roles in normal and abnormal gastrointestinal motility. *Aliment Pharmacol Ther* **20**, 3–14.
- Gillman, P.K. 2006. A review of serotonin toxicity data: implications for the mechanisms of antidepressant drug action. *Biol Psychiatry* **59**, 1046–1051.
- Iceta, R., Mesonero, J.E., Aramayona, J.J. & Alcalde, A.I. 2006. Molecular characterization and intracellular regulation of the human serotonin transporter in Caco-2 cells. *J Physiol Pharmacol* **57**, 119–130.
- Iceta, R., Mesonero, J.E. & Alcalde, A.I. 2007. Effect of long-term fluoxetine treatment on the human serotonin transporter in Caco-2 cells. *Life Sci* **80**, 1517–1524.
- Lesch, K.P., Wolozin, B.L., Murphy, D.L. & Reiderer, P. 1993. Primary structure of the human platelet serotonin uptake site: identity with the brain serotonin transporter. *J Neurochem* **60**, 2319–2322.
- Linnert, K., Koed, K., Wiborg, O. & Gregersen, N. 1995. Serotonin depletion decreases serotonin transporter mRNA levels in rat brain. *Brain Res* **697**, 251–253.
- Martel, F., Monteiro, R. & Lemos, C. 2003. Uptake of serotonin at the apical and basolateral membranes of human intestinal epithelial (Caco-2) cells occurs through the neuronal serotonin transporter (SERT). *J Pharmacol Exp Ther* **306**, 355–362.
- Neubauer, H.A., Hanmsen, C.G. & Wiborg, O. 2006. Dissection of an allosteric mechanism on the serotonin transporter: a cross-species study. *Mol Pharmacol* **69**, 1242–1250.
- Plenge, P. & Mellerup, E.T. 1985. Antidepressive drugs can change the affinity of [<sup>3</sup>H]imipramine and [<sup>3</sup>H]paroxetine binding to platelet and neuronal membranes. *Eur J Pharmacol* **119**, 1–8.
- Plenge, P., Mellerup, E.T. & Laursen, H. 1991. Affinity modulation of [<sup>3</sup>H]imipramine, [<sup>3</sup>H]paroxetine and [<sup>3</sup>H]citalopram binding to the 5-HT transporter from brain and platelets. *Eur J Pharmacol* **206**, 243–250.
- Purselle, D.C. & Nemeroff, C.B. 2003. Serotonin transporter: a potential substrate in the biological suicide. *Neuropsychopharmacology* **28**, 613–619.
- Ramamoorthy, S. & Blakely, R.D. 1999. Phosphorylation and sequestration of serotonin transporters differentially modulated by psychostimulants. *Science*, **285**, 763–766.
- Ramamoorthy, S., Samuvel, D.J., Buck, E.R., Rudnick, G. & Jayanthi, L.D. 2007. Phosphorylation of threonine residue 276 is required for acute regulation of serotonin transporter by cyclic GMP. *J Biol Chem* **282**, 11639–11647.
- Rudnick, G. & Clark, J. 1993. From synapse to vesicle – the reuptake and storage of biogenic-amine neurotransmitters. *Biochim Biophys Acta* **1144**, 249–263.
- Salvador, M.T., Rodríguez-Yoldi, M.C., Alcalde, A.I. & Rodríguez-Yoldi, M.J. 1997. 5-HT receptor subtypes involved in the serotonin-induced inhibition of L-leucine absorption in rabbit jejunum. *Life Sci* **61**, 309–318.
- Wade, P.R., Chen, J., Jaffe, B., Kassem, I.S., Blakely, R.D. & Gershon, M.D. 1996. Localization and function of a 5-HT transporter in crypt epithelia of the gastrointestinal tract. *J Neurosci* **16**, 2352–2364.
- Wennogle, L.P. & Meyerson, L.R. 1985. Serotonin uptake inhibitors differentially modulate high affinity imipramine dissociation in human platelet membranes. *Life Sci* **36**, 1541–1550.





## **VII.5. Resumen / Summary**



## Resumen

La serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) es un neuromodulador sintetizado fundamentalmente en las células enterocromafines del tracto gastrointestinal que actúa como regulador de la actividad del sistema nervioso central y periférico, y de otros tejidos no neuronales localizados en el tracto gastrointestinal, sistema cardiovascular y en la sangre. La 5-HT ejerce sus efectos a través de su unión a receptores de membrana. La disponibilidad extracelular de 5-HT depende de un sistema de síntesis y liberación (“on”) y de un sistema de recaptación (“off”). El transportador de serotonina (SERT) se encarga de la captación hacia el interior celular de la 5-HT y, en consecuencia, reduce la concentración de 5-HT en el medio extracelular. SERT se ha convertido en una diana farmacológica efectiva en las patologías en las que el sistema serotoninérgico se encuentra alterado, tales como las alteraciones de la conducta y síndromes gastrointestinales. La mayor parte de los estudios realizados sobre SERT se han realizado en modelos celulares heterólogos. Por ello, el primer objetivo del presente trabajo fue determinar si las células humanas de tipo enterocitario Caco-2 expresaban endógenamente SERT humano (hSERT) y si podían ser un modelo celular para su estudio. Los resultados muestran que las células Caco-2 expresan hSERT con características funcionales, moleculares y de regulación similares a las descritas para hSERT de cerebro. Ello indica que esta línea celular puede constituir un excelente modelo para el estudio de la regulación fisiológica y farmacológica de hSERT. A partir de este primer resultado se ha utilizado la línea Caco-2 para estudiar su regulación fisiológica determinando el efecto del tratamiento a largo plazo con 5-HT sobre hSERT. Los resultados muestran que la exposición de las células a 5-HT disminuye la función de hSERT debido a la interacción de 5-HT con el sitio alostérico de baja afinidad de hSERT, sin alterar su expresión molecular. Por último se consideró interesante determinar la regulación farmacológica de hSERT estudiando el efecto del tratamiento a largo plazo con fluoxetina. Los resultados muestran que la fluoxetina reduce la actividad de hSERT ya que afecta a la disponibilidad del hSERT en la membrana, sin alterar la transcripción del transportador, ello indica un efecto post-traducciona. En resumen, los resultados del presente trabajo establecen un nuevo modelo celular que expresa endógenamente hSERT y que puede ser una herramienta útil para el estudio de hSERT y su regulación. Asimismo, los resultados mostrados en el presente trabajo pueden presentar interés para incrementar el conocimiento de la regulación fisiológica y farmacológica de hSERT.



## Summary

Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) is a neuromodulator, mainly produced in the enterochromaffin cells of the gastrointestinal tract, which regulates the activity in the central and peripheral nervous system, as well as in a number of non-neuronal tissues in the gut, cardiovascular system and blood. The effects of 5-HT are mediated by membrane bound receptors, and depend on 5-HT extracellular availability, which is modulated by both 5-HT cellular release (“on”) and uptake (“off”). The serotonin transporter (SERT) is involved in 5-HT uptake to enable its clearance from the extracellular milieu. Consequently, this transporter in part determines 5-HT availability. The serotonin transporter has shown itself to be an effective pharmacological target in the treatment of mood disorders and some kinds of gastrointestinal syndromes. Most of the molecular studies of SERT in humans have been carried out using heterologous models. The first aim of the present work has been to study the human enterocyte-like Caco-2 cell line as a potential in vitro model to study the human serotonin transporter (hSERT). The results have shown that the function, regulation, expression and molecular characteristics of the hSERT in Caco-2 cells are similar to the ones described in hSERT from human brain, and they indicate that this cell line may be an ideal tool to study in vitro the physiology and pharmacology of hSERT. Secondly, we have determined hSERT physiological and pharmacological long-term regulation by using this cell model. The results have shown that hSERT function is reduced after long term treatment of the cells with 5-HT. The 5-HT effect seems to be due to an allosteric effect of 5-HT mediated by the interaction with the low affinity site of the transporter. 5-HT treatment did not show to alter the molecular expression of hSERT. In relation with the pharmacological regulation of hSERT, we have determined the effect of the long-term treatment of Caco-2 cells with fluoxetine. The results show that hSERT function is reduced after treatment with fluoxetine, mainly due to a diminution of the hSERT protein availability in the membrane with no alteration of the hSERT mRNA level, thus indicating a post-translational effect. In summary, the results of the present work, on one hand, establish a new cell model, which expresses endogenously hSERT and that may be a useful tool to study hSERT function and regulation. On the other hand, the results obtained may be potentially of physiological and therapeutical relevance in the knowledge of the regulation of hSERT activity.





**FACULTAD DE VETERINARIA**

Unidad de Fisiología