

CONICET



I F I S E

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA EXPERIMENTAL

Tesis de Doctorado

**“EFECTO BENEFICIOSO DE GLP-2 SOBRE LA
EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE
TRANSPORTADORES ABC INTESTINALES EN
LA ENDOTOXEMIA EXPERIMENTAL.”**

Lic. Maite Rocío Arana

Director: Aldo D. Mottino

Co-director: Silvina S.M. Villanueva

2018

**“EFECTO BENEFICIOSO DE GLP-2 SOBRE LA
EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE
TRANSPORTADORES ABC INTESTINALES EN
LA ENDOTOXEMIA EXPERIMENTAL.”**

Autor: Lic. Maite Rocío Arana

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctora en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Fisiología Experimental (IFISE)-CONICET, dependiente de la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 1 de Marzo de 2013 y el 5 de enero de 2018, bajo la dirección del Dr. Aldo Domingo Mottino y la codirección de la Dra. Silvina Stella Maris Villanueva.

AGRADECIMIENTOS

Estos cinco años no los he transitado sola y este trabajo no hubiera sido posible sin la colaboración de un montón de gente. A todos ellos quiero agradecer y dedicar esta Tesis:

- ❖ En primer lugar quiero agradecer a Aldo Mottino por recibirme en su grupo, por su paciencia, por guiarme en el mundo de la Ciencia sin impedir que me valga por mí misma. Por exigir a veces de más, a veces de menos, y de alguna manera siempre en la medida justa.
- ❖ A Silvina Villanueva por estar siempre presente y dispuesta a ayudarme en todo momento, por escuchar mis inquietudes y aportarme ideas.
- ❖ A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme las becas que me han permitido realizar este trabajo.
- ❖ A mis tutores Anabel Brandoni y Cristián Favre por tomarse el tiempo de leer los informes, escuchar, aconsejar y hacer las reuniones interesantes y agradables.
- ❖ A los jurados Osvaldo Rey, José Manautou y Cristián Favre por dedicar su tiempo a leer y evaluar esta Tesis.
- ❖ A los técnicos Alejandra Martínez, José Pellegrino y Marcelo Luquita porque su aporte es invaluable y no debe pasar desapercibido.
- ❖ A Claudia Banchio (IBR) y su grupo por su aporte en los aspectos concernientes a la participación de factores de transcripción.
- ❖ Quiero agradecer a Virginia y a Juan Pablo, quienes cuando llegué me abrieron sus brazos, me hicieron sentir recibida y me guiaron. Sin ellos el primer año de Tesis no hubiera sido lo mismo.
- ❖ Agradecer también a los que llegaron después al grupo: a Guille, Felipe y Camila, por estar siempre dispuestos a colaborar, por las mañanas madrugadas, por las jornadas largas y los fines de semana. De más está decir que este trabajo no lo hubiera podido hacer sola.
- ❖ A Sofi, quien en un momento se convirtió en un desafío y me ha enseñado más a mí que yo a ella. Quien siempre me ha ayudado cuando lo necesitaba, quien con gracia y buena onda ha superado mi mal humor y se ha convertido en poco tiempo en una amiga imprescindible.
- ❖ A Laura y Viviana por estar siempre presentes y dispuestas a darme una mano aunque no fuese su obligación.
- ❖ A Daniel y Flavia por su ayuda y conocimiento sobre estrés oxidativo.
- ❖ Al IFISE, porque un lugar lo hace su gente, porque el compañerismo, la paciencia, buena voluntad y buena onda hacen que el todo sea más que la suma de sus partes.

Porque sabemos que no existe otro instituto de investigación como este. Por lo académico: los congresos, los reactivos, las explicaciones... y lo no tan académico: los mates, los afters, los asados... Me sería imposible nombrar uno por uno pero, de una manera u otra, todos han dejado su huella en esta Tesis y una marca en mí que voy a recordar siempre.

No puedo dejar de nombrar a la gente que colaboró desde afuera, mis amigos, quienes son el apoyo constante, que me han escuchado, hecho reír y me han distraído cada vez que lo necesitaba:

- ❖ A los chicos del club quienes son mis amigos más antiguos, quienes me demuestran que el tiempo pasa, la gente cambia y aún puede seguir presente, como si la Tierra no girara, como si la vida no transcurriera.
- ❖ A las chicas de la facu, que aunque no hayamos cursado juntas, son el regalo más bello que me dejó esta facultad. Tener personas como Uds. que comprendan las vicisitudes de cada día no tiene precio.
- ❖ Quiero mencionar especialmente a Maju, quien pasó sus vacaciones de enero escribiendo conmigo, sé que esta Tesis la hubiese escrito igual, pero la hubiese padecido más. Gracias!
- ❖ A Lucre que como siempre más que una amiga es una hermana y eso nunca se cambia.
- ❖ A Barby porque la vida da miles de vueltas y en una de esas vueltas encontré a una amiga que no me esperaba y se convirtió en un apoyo incondicional invaluable.
- ❖ A Meli y Belu la distancia podrá hacer que se sea más difícil estar en contacto pero no por eso están menos presentes en mi corazón.

Por último quiero agradecer a mi familia, las personas más importantes en mi vida.

- ❖ A mis hermanos, no creo que haya otras dos personas tan distintas a mí que pueda querer tanto como a ellos.
- ❖ A mi cuñada, Josefina, gracias por ser la cuñada que todos deseábamos tener.
- ❖ A Santi y Sofi, su alegría se contagia y me hace feliz.
- ❖ A mi abuela pocas personas son tan fuertes y persistentes como ella y lo más valioso que me ha enseñado es a ser yo misma.
- ❖ Y en especial a mis padres quienes siempre me han dado todo, sin esperar nada a cambio, quienes no serán perfectos pero son grandes personas, no podría haber pedido por mejores padres que ellos.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	- 2 -
DIVULGACIÓN	- 8 -
RESUMEN	- 10 -
SUMMARY	- 12 -
1. INTRODUCCIÓN	- 14 -
1.1. Intestino delgado	- 14 -
1.1.1. Generalidades	- 14 -
1.1.2. Funciones	- 15 -
1.2. Biodisponibilidad oral	- 16 -
1.3. Reacciones de biotransformación	- 17 -
1.3.1. Reacciones de fase I y II	- 18 -
1.3.2. Reacciones de fase III	- 18 -
1.4. Transportadores ABC	- 20 -
1.4.1. Generalidades	- 20 -
1.4.2. Transportadores ABC intestinales	- 21 -
1.4.2.1. Proteína de resistencia a multidrogas 1	- 21 -
Generalidades	- 21 -
Expresión, localización y función	- 22 -
Sustratos	- 23 -
Regulación transcripcional de su expresión	- 24 -
1.4.2.2. Proteína asociada a resistencia a multidrogas 2	- 26 -
Generalidades	- 26 -
Expresión, localización y función	- 27 -
Sustratos	- 27 -
Regulación transcripcional de su expresión	- 28 -
Regulación postranscripcional de su expresión y actividad	- 29 -
1.5. Modelos de intestino delgado	- 30 -
1.5.1. Modelo <i>in vivo</i>	- 30 -
1.5.2. Modelo <i>in vitro</i>	- 31 -
1.6. Péptido tipo glucagon 2	- 32 -
1.7. Endotoxemia	- 36 -
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	- 38 -
2. OBJETIVOS	- 39 -
3. MATERIALES Y MÉTODOS	- 40 -
3.1. Reactivos químicos	- 40 -
3.2. Experimentos en animales	- 40 -
3.2.1. Generalidades	- 40 -
3.2.2. Tratamientos	- 41 -
3.2.2.1. Tratamientos de prevención y reversión con GLP-2 en la endotoxemia inducida por LPS	- 41 -
3.2.2.2. Tratamiento para evaluar la participación de GLP-2 en la regulación de Mrp2 intestinal	- 43 -
3.2.2.3. Tratamiento para evaluar la participación de IL-1 β en la regulación de Mrp2 y P-gp intestinales en la endotoxemia inducida por LPS	- 44 -

3.2.3. Recolección de muestras	- 45 -
3.2.4. Obtención de membranas plasmáticas enriquecidas en BBM	- 46 -
3.2.5. Medidas de actividad de transportadores <i>in vitro</i>	- 46 -
3.2.5.1. Actividad de Mrp2	- 46 -
3.2.5.2. Actividad de P-gp	- 48 -
3.2.6. Cuantificación de la actividad de enzimas antioxidantes y marcadores de estrés oxidativo	- 49 -
3.2.6.1. Actividad catalasa	- 49 -
3.2.6.2. Actividad superóxido dismutasa	- 50 -
3.2.6.3. Lipoperoxidación	- 50 -
3.2.6.4. Glutati3n reducido y oxidado	- 51 -
3.2.7. Cuantificación de citoquinas	- 51 -
3.2.8. Fraccionamiento de células intestinales	- 52 -
3.2.9. Caracterización de subpoblaciones de enterocitos	- 53 -
3.2.9.1. Actividad fosfatasa alcalina	- 54 -
3.2.9.2. Actividad sacarasa-isomaltasa	- 54 -
3.2.9.3. Expresión de cromogranina A	- 54 -
3.3. Experimentos en la línea celular Caco-2	- 55 -
3.3.1. Mantenimiento	- 55 -
3.3.2. Cultivo y tratamientos	- 55 -
3.3.3. Medidas de viabilidad celular	- 57 -
3.3.4. Procesamiento de las células	- 57 -
3.3.5. Obtención de lisados celulares totales	- 58 -
3.3.6. Obtención de membranas celulares totales	- 58 -
3.3.7. Medidas de actividad de MRP2	- 58 -
3.3.8. Ensayo de co-inmunoprecipitación	- 59 -
3.3.9. Análisis <i>in silico</i> de la región promotora de <i>MRP2</i>	- 60 -
3.3.10. Ensayos de transfección y estudio del promotor del gen <i>MRP2</i>	- 60 -
3.3.11. Ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)	- 61 -
3.3.12. Ensayo de sobreexpresión de c-JUN	- 62 -
3.4. Técnicas de uso general	- 62 -
3.4.1. Cuantificación de proteínas	- 62 -
3.4.1.1. Método de Sedmak y Grossberg	- 62 -
3.4.1.2. Método de Lowry	- 63 -
3.4.2. Inmunocuantificación de proteínas	- 63 -
3.4.3. Aislamiento de ARN total	- 66 -
3.4.4. Reacción de retrotranscripción	- 67 -
3.4.5. PCR cuantitativa en tiempo real	- 68 -
3.4.6. Cuantificación de AMPc	- 69 -
3.4.7. Marcación por inmunofluorescencia	- 70 -
3.4.8. Microscopía confocal y de campo claro	- 71 -
3.4.9. Estudios estadísticos	- 72 -
4. RESULTADOS I: GLP-2 previene la alteración de Mrp2 y P-gp intestinales en la endotoxemia experimental	- 74 -
4.1. Protocolo de prevención	- 74 -
4.1.1. Efecto del LPS y GLP-2 sobre la expresión y actividad de Mrp2 y P-gp intestinales	- 74 -
4.1.2. Efecto del LPS y GLP-2 sobre la localización de Mrp2 y P-gp intestinales	- 78 -
4.1.3. Efecto del LPS y GLP-2 sobre la estructura y morfología intestinal	- 78 -
4.1.4. Efecto del LPS y GLP-2 sobre los niveles de citoquinas pro-inflamatorias	- 79 -
4.1.5. Efecto del LPS y GLP-2 sobre el equilibrio redox y defensas antioxidantes	- 81 -
4.1.5.1. Marcadores de estrés oxidativo	- 81 -

4.1.5.2. Actividad de enzimas antioxidantes	- 82 -
4.2. Protocolo de reversión	- 83 -
4.2.1. Efecto de LPS y GLP-2 sobre la expresión de Mrp2 y P-gp intestinales	- 83 -
4.3. CONCLUSIÓN PARCIAL I	- 85 -
5. RESULTADOS II: IL-1β media la alteración de Mrp2 intestinal en la endotoxemia experimental. Posible regulación postraducciona	- 86 -
5.1. Estudios en animales	- 86 -
5.1.1. Efecto de LPS y a-IL1- β sobre la expresión y actividad de Mrp2 y P-gp intestinales	- 86 -
5.1.2. Efecto de LPS y a-IL1- β sobre la morfología intestinal y la localización de Mrp2	- 88 -
5.2. Estudios en células Caco-2	- 90 -
5.2.1. Efecto de IL-1 β sobre la expresión y localización de MRP2	- 90 -
5.3. CONCLUSIÓN PARCIAL II	- 93 -
6. RESULTADOS III: AMPc media la inducción de Mrp2 intestinal por GLP-2. Regulación transcripcional por la vía PKA	- 94 -
6.1. Estudios en animales	- 94 -
6.1.1. Efecto de GLP-2 sobre los niveles de AMPc intestinal	- 94 -
6.1.2. Efecto de GLP-2 sobre la expresión de Mrp2 intestinal	- 94 -
6.1.3. Efecto de GLP-2 sobre los niveles de AMPc en fracciones de enterocitos aislados	- 95 -
6.2. Estudios en células Caco-2	- 98 -
6.2.1. Efecto de db-AMPc sobre la expresión de MRP2	- 98 -
6.2.2. Efecto de forskolina sobre la expresión de MRP2 y los niveles de AMPc	- 100 -
6.2.3. Efecto de db-AMPc sobre la actividad de MRP2	- 101 -
6.2.4. Participación de la vía de PKA en la inducción de MRP2 por db-AMPc	- 102 -
6.2.5. Participación de los factores de transcripción CREB y AP-1 en la inducción de MRP2 por db-AMPc	- 103 -
6.2.6. Efecto de db-AMPc sobre la interacción c-JUN/ATF2 y su unión al promotor de <i>MRP2</i>	- 107 -
6.3. CONCLUSIÓN PARCIAL III	- 110 -
7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	- 111 -
7.1. Discusión I	- 111 -
7.2. Discusión II	- 115 -
7.3. Discusión III	- 117 -
7.4. CONCLUSIÓN GENERAL	- 121 -
BIBLIOGRAFIA	- 124 -

DIVULGACIÓN

Los resultados presentados en este trabajo han sido dados a conocer en las siguientes publicaciones y reuniones científicas:

A. PUBLICACIONES

- a. “Coordinated induction of GST and MRP2 by cAMP in Caco-2 cells: Role of protein kinase A signaling pathway and toxicological relevance.” Maite Rocío Arana, Guillermo Nicolás Tocchetti, Pablo Domizi, Agostina Arias, Juan Pablo Rigalli, María Laura Ruiz, Marcelo Gabriel Luquita, Claudia Banchio, Aldo Domingo Mottino, Silvina Stella Maris Villanueva. *Toxicology and Applied Pharmacology* 287 (2015) 178–190.
- b. “Glucagon-like peptide 2 prevents down-regulation of intestinal multidrug resistance-associated protein 2 and P-glycoprotein in endotoxemic rats.” Maite Rocío Arana, Guillermo Nicolás Tocchetti, Felipe Zecchinati, Ana Sofía Londero, Camila Dominguez, Virginia Perdomo, Juan Pablo Rigalli, Silvina Stella Maris Villanueva, Aldo Domingo Mottino. *Toxicology* 390 (2017) 22–31.

B. PRESENTACIONES EN REUNIONES CIENTÍFICAS

- a. “El enteroglucagon (GLP-2) previene la pérdida de expresión y actividad de la proteína asociada a resistencia a multidroga 2 (Mrp2) intestinal inducida por lipopolisacárido bacteriano (LPS)”. Maite Rocío Arana, Guillermo Nicolás Tocchetti, Ana Sofía Londero, Virginia Perdomo, Marcelo Gabriel Luquita, Silvina Stella Maris Villanueva, Aldo Domingo Mottino. LIX Reunión de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. 19-22 de Noviembre de 2014, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.
- b. “Coordinated induction of GST and Mrp2 by cAMP in Caco-2 cells. Role of protein kinase A signaling pathway”. Maite Rocío Arana, Guillermo Nicolás Tocchetti, Pablo Domizi, Agostina Arias, Juan Pablo Rigalli, María Laura Ruiz, Marcelo Gabriel Luquita, Claudia Banchio, Aldo Domingo Mottino, Silvina Stella Maris Villanueva. III South American Symposium in Signal and Molecular Medicine - SISTAM 2015., 1-6 de Abril de 2015, Bariloche, Rio Negro, Argentina.

- c. “Glucagon-like peptide 2 (GLP-2) prevents down-regulation of expression and activity of intestinal P-glycoprotein (P-gp) in endotoxemic rats”. Maite Rocío Arana, Guillermo Nicolás Tocchetti, Ana Sofía Londero, Felipe Zecchinati, Camila Dominguez, Silvina Stella Maris Villanueva, Aldo Domingo Mottino. LXI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. 16-19 de Noviembre de 2016, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.

RESUMEN

La función de los transportadores ABC se ve afectada en varias enfermedades intestinales en los seres humanos, en particular las que cursan con inflamación local o sistémica. En el modelo de inflamación inducido por la administración de LPS a ratas (5 mg/kg de peso corporal por vía i.p.), confirmamos que a las 24 h se produce una disminución en la expresión y actividad de los transportadores Mrp2 y P-gp intestinales. Observamos que LPS, por un lado, disminuyó los niveles de ARNm de ambos transportadores y por otro, produjo la internalización de los transportadores en vesículas endocíticas. Estas observaciones señalan que los cambios a nivel proteico de los transportadores resultan complejos y dependen de una regulación a nivel transcripcional y postranscripcional. Determinamos también que IL-1 β media la regulación postraduccional observada para Mrp2. Sin embargo, IL-1 β no media la regulación de P-gp, ni la regulación a nivel transcripcional de Mrp2.

Recientemente, a GLP-2 le fue asignado un papel clínico como potencial agente terapéutico debido a su capacidad para proteger al intestino en varios modelos de daño intestinal. Nos propusimos entonces estudiar la capacidad de GLP-2 de contrarrestar los efectos del LPS sobre ambos transportadores. Utilizamos dos tipos de protocolos de tratamiento con GLP-2. Uno que evalúe la capacidad preventiva de la hormona, administrándola antes de la inducción de la endotoxemia (7 dosis de 125 μ g/kg de peso corporal por vía s.c. separadas cada 12 h en un total de 72 h consecutivas). Y otro que evalúe la capacidad de GLP-2 de revertir los efectos inducidos por LPS una vez instalados (2 dosis de 125 μ g/kg de peso corporal por vía s.c. comenzando 3 h después de la inyección con LPS). Los resultados muestran que las alteraciones en la expresión y actividad de los transportadores producidas por LPS pudieron ser prevenidos mediante el tratamiento con GLP-2, siendo estos cambios al menos en parte

dependientes de una regulación transcripcional. GLP-2 *per se* indujo los niveles de Mrp2 intestinal tanto a nivel de proteína como de ARNm, mientras que no ocurrió lo mismo para P-gp. En cambio, el tratamiento de reversión con GLP-2 fue ineficiente en recuperar los niveles de Mrp2 y P-gp (proteína y ARNm). En el caso particular de Mrp2, GLP-2 administrado sólo tampoco pudo producir cambios en la expresión de proteínas o ARNm, en contraste con la inducción observada para el protocolo de prevención. Claramente, más de dos dosis de GLP-2 son necesarias para modular la expresión de Mrp2.

La observación de que GLP-2 induce Mrp2 a nivel de ARNm sugiere la posibilidad de una regulación transcripcional. GLP-2 actuaría presuntamente mediante su receptor asociado a proteína G, el cual activa adenilato ciclasa. Confirmamos la mediación de AMPc *in vivo* y en células Caco-2. Estudiamos la posible vía de señalización por la cual GLP-2 induce transcripcionalmente a MRP2 en células Caco-2 tratadas con db-AMPc, un análogo permeable del AMPc. Observamos que db-AMPc activó PKA, que luego fue capaz de activar de forma directa o indirecta por forforilación a ATF-2 y c-JUN. Luego estos factores formaron heterodímeros y se unieron a la región regulatoria proximal (-789/-603) del promotor de *MRP2* que contiene sitios putativos AP-1 y CRE. De esta manera db-AMPc aumentaría la transcripción de *MRP2* resultando en un aumento de la expresión del transportador en la membrana apical y en un aumento de su actividad.

En conclusión, la modulación de estos importantes transportadores de eflujo apicales puede representar un efecto beneficioso adicional de GLP-2 bajo condiciones de inflamación, que contribuyen a restaurar la barrera transcelular, limitando así la absorción de compuestos potencialmente tóxicos.

SUMMARY

ABC transporters function is affected in various intestinal diseases in humans, particularly those with local or systemic inflammation. We confirm that at 24 h there is a decrease in the expression and activity of intestinal P-gp and Mrp2 transporters in the inflammatory model induced by administration of LPS to rats (5 mg/kg of body weight by i.p. injection). We observed that LPS decreased the mRNA levels of both transporters and also produced internalization of Mrp2 and P-gp to endocytic vesicles. These observations indicate that changes at transporters protein levels are complex and depend on transcriptional and post-transcriptional regulation. We also determined that IL-1 β is involved in the post-translational regulation observed for Mrp2. However, IL-1 β neither regulates P-gp nor is involved in the transcriptional regulation of Mrp2.

Recent reports gave GLP-2 a clinical role as a potential therapeutic agent due to its ability to protect the bowel in various models of intestinal injury. However, no report evaluates the role of GLP-2 in the regulation of the transcellular barrier associated with drug transporters. We then decided to study the ability of GLP-2 to neutralize the effects of LPS on both transporters. Two types of GLP-2 protocols were used. One evaluates the preventive capacity of GLP-2, starting its administration before the induction of endotoxemia (7 s.c. injections of 125 μ g/kg b.w. separated every 12 h for a total of 72 consecutive hours). The second protocol evaluates the capacity of GLP-2 to revert the effects of LPS once inflammation is installed (2 s.c. injections of 125 μ g/kg b.w. beginning 3 h after LPS injection). The results show that the altered expression and activity of the transporters produced by LPS could be prevented by GLP-2 treatment, due, at least in part, to transcriptional regulation. GLP-2 alone induced intestinal Mrp2 both at protein and mRNA levels, while it did not affect P-gp expression. In contrast, the reversion protocol with GLP-2 was ineffective in recovering

Mrp2 and P-gp levels (protein and mRNA). GLP-2 administered alone did not change the expression of Mrp2 protein or mRNA, in contrast to the induction observed for the prevention protocol. Clearly, more than two doses of GLP-2 are necessary to modulate Mrp2 expression.

The fact that GLP-2 induces *Mrp2* mRNA suggests the possibility of a transcriptional regulation. GLP-2 would presumably act through its receptor associated to G protein, which activates adenylyl cyclase. We confirm the involvement of cAMP *in vivo* and in Caco-2 cells. We studied the possible signaling pathway of GLP-2 that leads to transcriptional induction of MRP2 by treating Caco-2 cells with db-cAMP, a cAMP permeable analog. As a result, db-cAMP activated PKA, which was then able to activate ATF-2 and c-JUN directly or indirectly by phosphorylation. Then these nuclear factors formed heterodimers and bound the proximal regulatory region (-789/-603) of *MRP2* promoter which contains putative sites AP-1 and CRE. This way db-cAMP would increase the transcription of *MRP2*, resulting in increased expression of the transporter in the apical membrane and increased activity.

In conclusion, positive modulation of these important apical efflux transporters may represent an additional beneficial effect of GLP-2 under conditions of inflammation, contributing to restoring the transcellular barrier, thereby limiting the absorption of potentially toxic compounds.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Intestino delgado

1.1.1. Generalidades

El sistema gastrointestinal comienza en la boca y se extiende a través de la faringe, esófago, estómago, intestino delgado y grueso hasta el ano (Figura 1.1A). Cumple la función de digestión de los alimentos, absorción de nutrientes y eliminación de productos no digeribles y del metabolismo endógeno. El intestino delgado es la porción del tracto gastrointestinal en la cual se produce principalmente la absorción de los nutrientes. La principal especialización del intestino delgado está constituida por la presencia de gran cantidad de pliegues que aumentan la superficie de contacto con la luz intestinal y le confieren una alta capacidad de absorción.

El intestino delgado consiste en un tubo de alrededor de 6-7 m de longitud y 3 cm de diámetro en el adulto que comienza luego de la válvula pilórica y finaliza en la válvula ileocecal. Se divide longitudinalmente en tres secciones: duodeno, yeyuno e íleon (Figura 1.1A). De afuera hacia adentro el intestino delgado se compone de: capa serosa, capa muscular, submucosa y mucosa (Figura 1.1B). La serosa consiste en una capa de células mesoteliales escamosas que recubren el tracto gastrointestinal. La capa muscular está comprendida por una capa cuyas fibras musculares están orientadas en forma circular y otra capa más externa cuyas fibras se orientan a lo largo del eje longitudinal del tubo. Estas fibras musculares lisas contraen el intestino y hacen circular el contenido de la luz intestinal. Más hacia el interior del intestino se encuentra la submucosa. Esta capa consiste en tejido conjuntivo laxo en la cual se encuentran grandes troncos nerviosos y vasos sanguíneos y linfáticos. Por último se encuentra la mucosa. Esta capa está formada por una capa muscular (llamada muscular de la mucosa), la lámina propia (tejido conjuntivo laxo que contiene vasos linfáticos,

nódulos, capilares, fibras nerviosas y glándulas) y está recubierta por una capa epitelial que se encuentra en contacto con la luz intestinal. El epitelio intestinal consiste en un epitelio simple columnar formado por distintas células especializadas, principalmente enterocitos. Los enterocitos son las células especializadas en la absorción, por ello su membrana apical se encuentra plegada formando lo que se denomina ribete en cepillo (*brush border membrane*, BBM), lo cual le confiere una gran superficie de absorción en la cual se expresan proteínas digestivas como peptidasas e hidrolasas, y transportadores de membrana. También se encuentran en este epitelio células caliciformes, células de Paneth y células endocrinas. Además, la mucosa intestinal se encuentra formando estructuras con forma de dedos denominadas vellosidades que incrementan aún más la superficie de absorción.

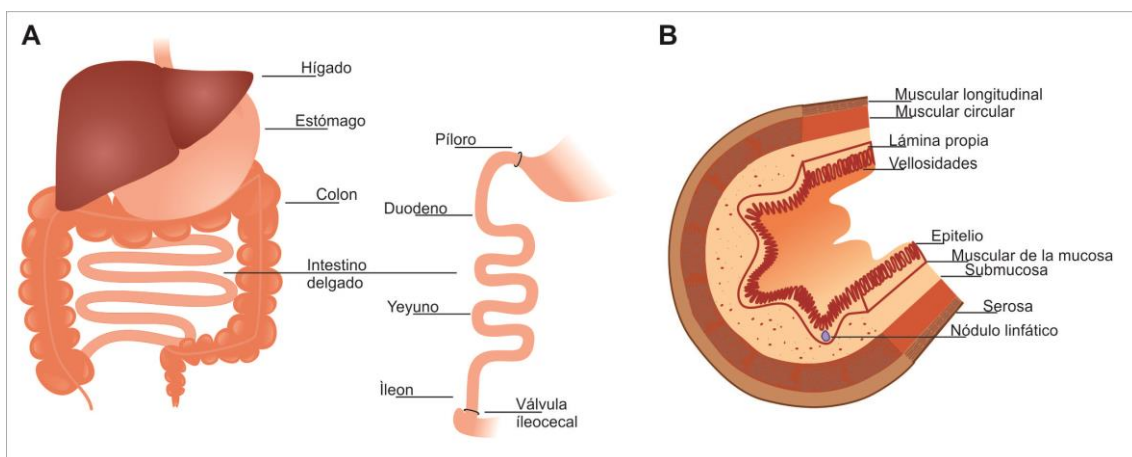


Figura 1.1: Sistema gastrointestinal: A. Anatomía general de sistema gastrointestinal y segmentos del intestino delgado. **B.** Morfología del intestino delgado.

1.1.2. Funciones

Además de su función primordial en la absorción de agua y nutrientes, el intestino delgado representa la primer barrera ante la absorción de drogas y xenobióticos que pueden estar presentes en los alimentos. Así, la mucosa intestinal está involucrada en la determinación de la biodisponibilidad de drogas y en la toxicidad de

xenobióticos. Los factores que afectan estos procesos son la absorción, el metabolismo y la eliminación de las drogas o xenobióticos.

1.2. Biodisponibilidad oral

La absorción intestinal de un compuesto será un factor crítico para determinar la biodisponibilidad del mismo. Existen dos rutas por las que un xenobiótico puede atravesar el epitelio intestinal: vía paracelular y vía transcelular.

La vía paracelular (Figura 1.2B) consiste en el pasaje de sustancias de manera pasiva a través de las uniones entre las células. Algunos compuestos pequeños e hidrofílicos pueden atravesar el epitelio intestinal por esta vía [1]. Este tipo de absorción está limitada por las proteínas de unión entre células como las proteínas de las uniones estrechas o adherentes. Estas uniones generalmente restringen el movimiento transepitelial y limitan la absorción de compuestos de forma inespecífica.

La vía transcelular consiste en el pasaje de un compuesto desde el lumen intestinal a través de la membrana apical y basolateral hacia la sangre (Figura 1.2A). En primer lugar los compuestos hidrofóbicos podrán ingresar al enterocito difundiendo pasivamente por su membrana apical [2] o bien, los xenobióticos hidrofílicos pueden ser traslocados por transportadores específicos (Figura 1.2C). En ambos casos, una vez en el interior celular podrán ser transportados nuevamente al lumen intestinal [3], [4] (Figura 1.2D). Este transporte es generalmente activo y es llevado a cabo principalmente por proteínas ABC (“*ATP binding cassette*”). Cabe señalar que los compuestos excretados hacia el lumen intestinal por estos transportadores pueden consistir también en productos del metabolismo endógeno, provenientes de la sangre. Estos ingresan a los enterocitos a través de transportadores de cationes orgánicos o de

aniones orgánicos (Octs, Octns, Oatps o SLC21) [5] de ubicación basolateral (Figura 1.2D).

Por otro lado, los xenobióticos pueden ser sustratos de sistemas metabólicos intracelulares (Figura 1.2E). El conjunto de procesos llevado a cabo por estas proteínas se ha denominado reacciones de biotransformación y generan compuestos que a la vez son sustratos de las bombas exportadoras, y por lo tanto fácilmente excretados hacia el lumen intestinal (Figura 1.2E).

Aquellos xenobióticos que no sufren biotransformación y/o excreción pueden ser transportados a la sangre a través de la membrana basolateral (Figura 1.2F).

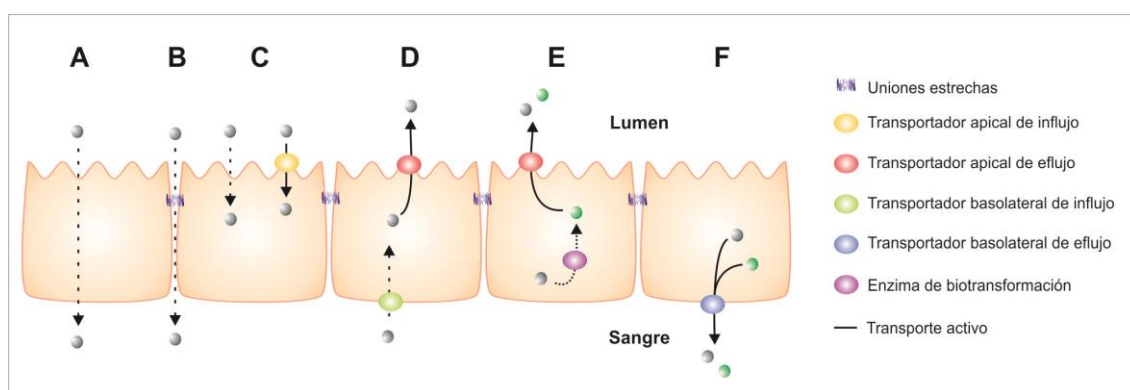


Figura 1.2: Transporte de sustancias a través del epitelio intestinal. **A.** La absorción transcelular de compuestos consiste en el pasaje a través de la membrana apical, el citoplasma del enterocito y de la membrana basolateral. **B.** La absorción de sustancias por la vía paracelular está restringida por las uniones estrechas intercelulares. **C.** Los compuestos pueden ingresar a la célula desde el lumen intestinal por difusión pasiva a través de la membrana apical o por transporte activo mediante bombas de influjo. **D.** Productos del metabolismo endógeno provenientes de la sangre pueden ingresar al enterocito a través de transportadores activos basolaterales, una vez en el citosol los compuestos pueden ser devueltos al lumen intestinal mediante transportadores de eflujo apicales. **E.** Las bombas exportadoras y las enzimas metabolizadoras pueden actuar coordinadamente transformando y excretando compuestos, generando así una barrera efectiva contra el ingreso de xenobióticos dietarios. **F.** Si los compuestos no son excretados pueden ser absorbidos por medio de transportadores de eflujo basolaterales.

1.3. Reacciones de biotransformación

Las reacciones de biotransformación representan un importante paso en la detoxificación de xenobióticos, incluyendo toxinas, carcinógenos y drogas de uso

terapéutico. Estas reacciones se basan generalmente en la modificación química de los compuestos haciéndolos más hidrofílicos y fácilmente eliminables.

1.3.1. Reacciones de fase I y II

Existen dos tipos de reacciones involucradas en la biotransformación de xenobióticos. Las reacciones de fase I consisten en la oxidación (mayoritariamente hidroxilaciones) llevadas a cabo por la familia del Citocromo P-450, comprendida por alrededor de 60 isoformas en humanos. Estas reacciones se han llamado “de fase I” ya que suelen ser el primer paso en la modificación química de xenobióticos o sustancias nocivas, precediendo así a las reacciones de fase II (Figura 1.3). Sin embargo, es posible que los xenobióticos sean sometidos directamente a las reacciones de fase II o que sufran un único tipo de biotransformación. Las reacciones de fase II consisten en la conjugación de los compuestos con otras sustancias. Las enzimas del metabolismo de fase II más importantes son: UDP-glucuronosiltransferasas, glutatión-S-transferasas, sulfotransferasas y acetiltransferasas [6].

Cabe destacar, que las reacciones de biotransformación no siempre inactivan toxinas, pueden en ocasiones generar metabolitos más reactivos o tóxicos.

1.3.2. Reacciones de fase III

Otra importante etapa en la detoxificación de xenobióticos consiste en el transporte de estas sustancias hacia el exterior celular. Esta etapa disminuye la concentración local del compuesto reduciendo así su toxicidad. La eliminación de los productos de las reacciones de fase I y II se ha llamado metabolismo de fase III (Figura 1.3), para remarcar la estrecha relación entre estos tres procesos. Sin embargo, muchas sustancias que ingresan a la célula no requieren una transformación previa para ser

transportadas y pueden ser eliminadas de forma directa. Este proceso suele llamarse metabolismo de fase 0 [6] (Figura 1.3).

Las reacciones de fase 0 y III son llevadas a cabo por transportadores presentes en la membrana plasmática (apical o basolateral) de células epiteliales como los enterocitos. En particular, los transportadores localizados apicalmente en intestino transportan compuestos hacia la luz intestinal favoreciendo su eliminación del organismo. Los transportadores pertenecientes a la superfamilia de transportadores ABC constituyen un componente fundamental del metabolismo de fase III.

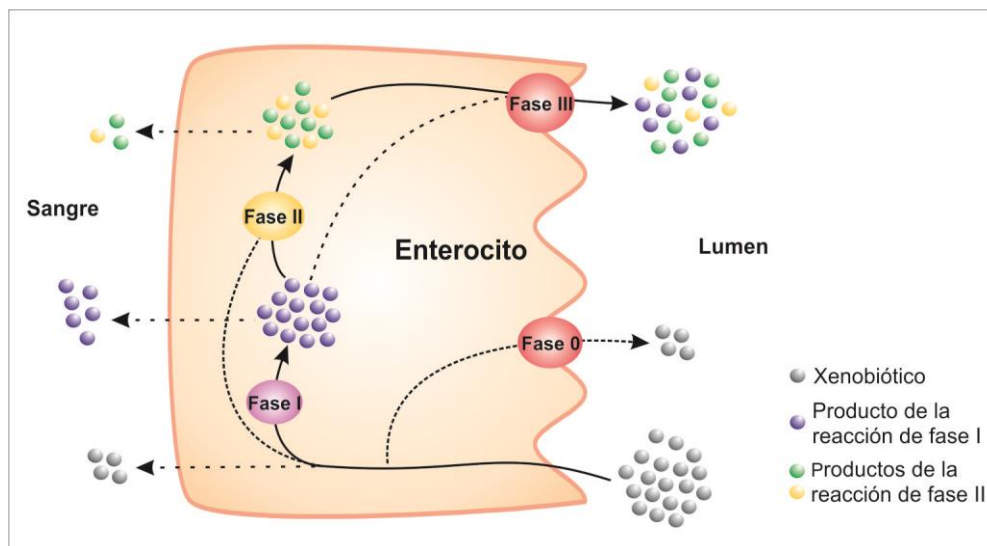


Figura 1.3: Reacciones de biotransformación: Un compuesto presente en el lumen intestinal puede atravesar la membrana apical del enterocito ya sea de forma pasiva o activa. Una vez en el citosol este compuesto puede sufrir varios destinos. Por un lado, puede ser eliminado del enterocito, ya sea absorbido a la circulación sistémica o devuelto al lumen (proceso llamado de fase 0). Sin embargo lo más probable es que sufra algún tipo de biotransformación, principalmente una reacción de fase I, que consiste en la oxidación del compuesto. Pero es también posible que sufra reacciones de fase II que conjugan el compuesto con glucuronato, glutatión, sulfato o acetato. El producto oxidado de fase I puede, a su vez, sufrir reacciones de fase II. Los productos de las reacciones de biotransformación de fase I y II pueden finalmente ser absorbidos a la circulación sistémica o (más probablemente) ser transportados al lumen intestinal de forma activa por transportadores de eflujo presentes en la membrana apical del enterocito, proceso llamado reacción de fase III.

1.4. Transportadores ABC

1.4.1. Generalidades

Los transportadores ABC son una de las más grandes y mejor caracterizadas familias de proteínas. Se encuentran presentes en bacterias, hongos, plantas y animales y están involucrados en gran variedad de procesos fisiológicos. En humanos se encuentran 48 miembros que se dividen en 7 subfamilias según similitudes en su secuencia (ABCA-ABCG) [7]. Si bien los transportadores ABC presentan estructuras oligoméricas variadas, es posible describir una estructura funcional básica. Esta estructura consiste en 2 mitades, cada una formada por un dominio transmembrana (TM), formado generalmente por 6 hélices α TM, y un dominio de unión a nucleótidos (NBD) (Figura 1.4). Comúnmente ambas mitades se encuentran en un único polipéptido, como es el caso de P-glicoproteína (P-gp, MDR1, ABCB1) (Figura 1.4A). En algunos casos, como es el de la proteína asociada a resistencia a multidrogas 2 (MRP2, ABCC2), se observa un dominio TM adicional en la región N-terminal compuesto, en este caso, por 5 hélices α TM (Figura 1.4B). En la Figura 1.4C se muestra la estructura de proteína de resistencia en cáncer de mama (BCRP, ABCG2), la cual se compone de un único NBD y un dominio TM. Es probable que BCRP funcione como un homodímero.

Los dominios TM suelen ser altamente variables y determinan la especificidad de sustrato. En contraste, los NBD muestran una estructura muy conservada responsable de la unión e hidrólisis del nucleótido. Ésta proporciona la energía para la translocación del sustrato a través de la membrana, en contra de su gradiente de concentración.

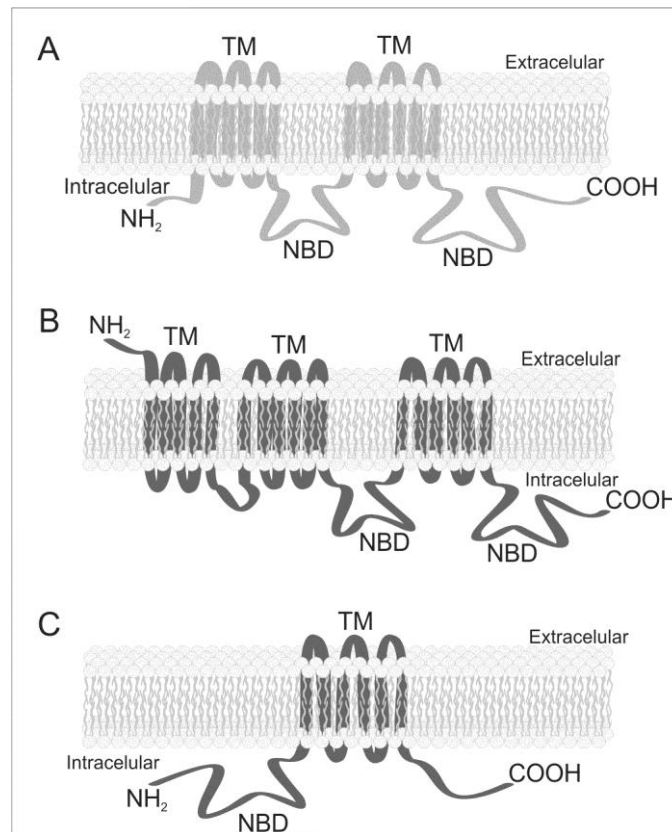


Figura 1.4: Estructura y dominios de los transportadores ABC. **A.** Este tipo de transportadores posee 12 hélices transmembrana (TM) y 2 sitios de unión a nucleótidos (NBD). Dentro de este grupo encontramos a MDR1. **B.** Estructura típica de transportadores MRPs que poseen 5 regiones TM extras en el dominio N-terminal. Dentro de este grupo encontramos a MRP2 y MRP3. **C.** Estructura de los “medios transportadores”, como BCRP, que poseen sólo 6 hélices TM y un NBD.

1.4.2. Transportadores ABC intestinales

1.4.2.1. Proteína de resistencia a multidrogas 1

Generalidades

Uno de los transportadores ABC mejor caracterizados es la P-glicoproteína (P-gp), también llamada proteína de resistencia a multidrogas 1 (MDR1). Según la nueva nomenclatura para las proteínas ABC, se lo clasificó dentro de la clase B y se lo denominó ABCB1. Este transportador fue indentificado por primera vez por Juliano y Ling en 1976 [8] en la membrana plasmática de células de ovario de hámster chino que presentaban resistencia a colchicina. Más tarde se lo encontró en líneas celulares tumorales humanas que presentaban resistencia a múltiples drogas quimioterapéuticas,

de allí que el gen que codifica a dicho transportador se denominó *MDR1* (*multidrug resistance protein 1*) [9]. En roedores se ha encontrado que hay dos genes homólogos que codifican para P-gp, *Mdr1a* y *Mdr1b*. Las proteínas derivadas de los dos genes de roedores y del gen en humanos presentan similar distribución y especificidad de sustrato, indicando que su función fisiológica es redundante.

Expresión, localización y función

Desde su descubrimiento se ha observado que P-gp se expresa en gran medida en tumores sólidos de origen epitelial. Son ejemplos los tumores de colon, de riñón, y de mama [10]–[12]. P-gp le confiere a estos tumores resistencia a numerosos agentes quimioterápicos, por lo que tiene gran importancia farmacológica.

P-gp no sólo se expresa en tumores sino que también se expresa en forma constitutiva en varios tejidos normales. Está presente en altos niveles en riñones y glándulas suprarrenales, en niveles intermedios en hígado, intestino delgado, colon y pulmón, y en niveles bajos en próstata, piel, bazo, corazón, músculo esquelético, estómago y ovario [13]. También se expresa en cerebro [14]–[16], plexo coroideo [17], y placenta [18].

En cuanto a su localización, P-gp se ubica en la membrana apical de células polarizadas como enterocitos, hepatocitos y células tubulares renales [13], [19]–[21]. También se expresa en la membrana apical de los sincitiotrofoblastos de la placenta y de las células endoteliales de los capilares del cerebro [22].

La importancia fisiológica de P-gp se determinó en ratones *knock out* para ambos genes *Mdr1*: *Mdr1a* (-/-) y *Mdr1b* (-/-). Estos ratones deficientes en P-gp fueron viables, fértiles y no mostraron ninguna anomalía fenotípica evidente respecto de ratones de genotipo salvaje [23]. Sin embargo, cuando fueron expuestos a diversas drogas, los animales *knock out* mostraron una sensibilidad elevada. Se observó

incrementada sensibilidad a drogas de uso oral, especialmente aquellas cuyo blanco es el sistema nervioso central [24]. Estos estudios sugerían que P-gp intestinal podría jugar un rol importante en la biodisponibilidad de fármacos administrados por vía oral. A partir de estudios con líneas celulares humanas provenientes de cáncer de colon (Caco-2, HT29 y T84), se confirmó que P-gp limita la absorción de drogas, por ejemplo del agente anti-cancerígeno, vinblastina [25], [26]. En monocapas de células Caco-2 se observó que P-gp es capaz de transportar drogas como celiprolol [27], digoxina [28], y eritromicina [29], [30], entre otras. En conjunto estos estudios demuestran que P-gp actúa en el intestino como una barrera evitando el ingreso de xenobióticos [31] limitando así su toxicidad, lo cual le da a este transportador una gran importancia toxicológica. Por el mismo motivo, P-gp también puede limitar la biodisponibilidad de medicamentos de uso oral, reduciendo su acción terapéutica.

Sustratos

P-gp presenta afinidad por una amplia variedad de sustratos. En general, transporta compuestos anfipáticos y relativamente hidrofóbicos, que usualmente contienen anillos aromáticos o átomos de nitrógeno cargados positivamente [7]. Son compuestos de alto peso molecular, generalmente comprendido entre 200-1900 Da. La lista de sustratos de P-gp es variada e incluye drogas anticancerígenas, antibióticos, agentes inmunosupresores, antiarrítmicos, antihistamínicos, productos naturales y pesticidas, entre muchos otros (Tabla 1.1).

Tabla 1.1: Ejemplos de sustratos de MDR1/Mdr1a/b

Analgésicos	Asimodolina Fentanilo Morfina Pentazocina	β-bloqueantes	Bunitrolol Carvedilol Celiprolol Tanilolol	Antibióticos	Eritromicina Levofloxacina Ofloxacina Rifampicina
Antihistamínicos	Fexofenadina Terfenadina	Esteroides	Dexametasona Metilprednisolona	Imunosupresores	Cyclosporine Sirolimus Tacrolimus
Anticancerígenos	Docetacel Doxorrubicina Etopósido Imatinib Paclitaxel Tenipósido Vinblastina	Antirretrovirales	Amprenavir Indinavir Nelfinavir Saquinavir Ritonavir	Antiarrítmicos	Amiodarona Digitoxin Digoxina Lidocaína Propafenona Quinidina Verapamilo
Antieméticos	Ondansetron	Antimitóticos	Colchicina	Colorantes fluorescentes	Rodamina 123
Productos naturales	Curcumanoides Flavonoides	Antidepresivos	Amitriptilina	Antiepilépticos	Fenitoína

Se presentan los sustratos de mayor difusión y más utilizados de MDR1/Mdr1a/b. Los datos se extrajeron de [7], [30].

Regulación transcripcional de su expresión

Ciertos receptores nucleares funcionan como reguladores maestros de la defensa contra la toxicidad de xeno y endobióticos, modulando la expresión de enzimas del metabolismo y transportadores. Los principales son el receptor de pregnanos X (PXR), el receptor constitutivo de androstanos (CAR), el receptor del hígado X (LXR) y el receptor de farnesoides X (FXR) [32]. Comúnmente estos receptores nucleares heterodimerizan con otro miembro de la familia de receptores nucleares, el receptor de retinoides X (RXR), cuyo ligando es el ácido 9-cis-retinoico y puede actuar como un activador sinérgico del heterodímero. CAR es activada por fármacos como el fenobarbital y el ácido valproico [33], [34], FXR es activada por las sales biliares [35] y LXR α es activado por oxysterol [36], [37]. Otros receptores nucleares importantes en la regulación de transportadores ABC son los *peroxisome proliferator-activated receptor* α y γ (PPAR α y PPAR γ) [38].

En particular, la regulación transcripcional del gen *MDR1* humano depende de varias proteínas que se unen a elementos consenso del promotor *MDR1*. Por ejemplo, el factor de transcripción Sp1 se une a una región rica en GC que se encuentra entre las bases -56 a -45 del sitio de inicio de la transcripción principal. SP1 y el elemento CCAAT invertido (caja Y) son esenciales para la activación de MDR1 bajo irradiación de la luz ultravioleta [39].

Un factor nuclear muy importante en la regulación de *MDR1* es la proteína de unión a la caja Y1 (YB-1). Este factor puede ser activado no sólo por drogas, sino también por estrés [40]. En células cancerosas la actividad de YB-1 es mayor tanto por inducción por quimioterapéuticos como por el daño celular producido por los mismos [41].

El antibiótico rifampicina ha sido identificado como un agonista potente y específico de PXR humano [42]–[44]. La activación de PXR por el antibiótico rifampicina se traduce en un aumento de la expresión de MDR1. Además el benznidazol, una droga que se utiliza para el tratamiento del mal de Chagas, y el diurético espironolactona también son capaces de inducir a MDR1 a través de la activación de PXR [45].

Por otro lado, se ha observado que algunos quimioterapéuticos regulan la expresión de *MDR1* de manera transcripcional mediante modificaciones epigenéticas específicas en el locus. Es posible que este tipo de modificaciones presenten además un componente postranscripcional ya que se ha establecido que estos mecanismos no son mutuamente excluyentes y dependen del estado de metilación del promotor de *MDR1* [46].

Finalmente, los componentes de nuestra dieta también pueden afectar la actividad de MDR1. Se ha observado que el jugo de pomelo modifica la actividad de MDR1,

aunque los resultados de estudios *in vivo* e *in vitro* son contradictorios acerca de cómo esto ocurre [47]–[49]. También se ha observado *in vitro* que las metoxiflavonas del jugo de naranja inhiben la actividad de MDR1 [50].

1.4.2.2. Proteína asociada a resistencia a multidroga 2

Generalidades

La proteína asociada a resistencia a multidroga 2 (MRP2) pertenece a la clase C de transportadores ABC, que consta de 13 miembros [7]. Algunos de ellos se han relacionado con el transporte de drogas aunque, a diferencia de MRP2, se localizan en la membrana basolateral. MRP2 fue caracterizada por primera vez por Jansen y col. en 1993 [51] en hígado de rata y se la denominó inicialmente cMOAT (transportador canalicular multiespecífico de aniones orgánicos). Años después se detectó también en la membrana apical de los enterocitos de rata [52] y humanos [4] y de células epiteliales renales [53].

La ausencia de Mrp2 se caracterizó en ratas TR⁻ (*transport deficient rats*) [54]. Estos animales presentan una mutación en el gen que codifica para Mrp2, de manera que no expresan el transportador. Así estos animales no pueden eliminar bilirrubina por medio de la bilis produciéndose una acumulación de bilirrubina conjugada en sangre. En humanos la ausencia del transportador produce una enfermedad conocida como síndrome de Dubin-Johnson, que al igual que en ratas conduce a una hiperbilirrubinemia conjugada crónica [55], [56]. Este síndrome es producido por una mutación sin sentido en el gen que codifica para MRP2, conduciendo así a la producción de una proteína trunca que finalmente es degradada. Como resultado los pacientes con este síndrome no expresan MRP2 en ningún tejido. Los síntomas de esta enfermedad son poco llamativos y a excepción de la ictericia, no se observan

diferencias en la calidad de vida, supervivencia, ni fertilidad. Esto hace que generalmente la enfermedad no requiera tratamiento alguno. Sin embargo es previsible una mayor sensibilidad de estos pacientes a drogas y xenobióticos.

Expresión, localización y función

MRP2 se expresa normalmente en la membrana apical de células epiteliales polarizadas. Se ha observado su expresión en hígado, riñón, duodeno, yeyuno, colon vesícula biliar, bronquios y placenta. No se ha detectado en piel, tejido conectivo, páncreas, ni en los sistemas reproductor femenino, linfático o cardiovascular [57].

En el intestino delgado MRP2 presenta una expresión en gradiente, siendo mayor en la zona del duodeno y yeyuno proximal, disminuyendo hacia el yeyuno distal. Este gradiente en la expresión se observa tanto en humanos como en roedores. Por otro lado, MRP2 presenta niveles mayores en la punta de la vellosidad disminuyendo su expresión hacia la zona de la cripta [52], [58]. Se ha observado una distribución similar en la expresión de enzimas de conjugación de fase II como UDP-glucuronosiltransferasa (UGT) y glutation-S-transferasas (GST). Esto sugiere que el metabolismo y eliminación de aniones orgánicos conjugados se regula en forma coordinada para disminuir la absorción de xenobióticos a través del tracto digestivo [59].

Al igual que P-gp, MRP2 se expresa en gran cantidad de tumores, principalmente en tumores sólidos de origen epitelial y se encuentra relacionado con la resistencia a múltiples agentes quimioterápicos observada en tumores malignos [60].

Sustratos

Los sustratos de MRP2 suelen ser aniones orgánicos y compuestos anfipáticos no cargados. A diferencia de los sustratos de P-gp, los sustratos de MRP2 incluyen metabolitos conjugados de compuestos endógenos y exógenos [61]. En la Tabla 1.2 se

detallan sustratos de MRP2. Además, MRP2 transporta glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG). Este último con mayor afinidad por lo que MRP2 cumple un rol importante en la defensa contra el estrés oxidativo [62], [63].

Tabla 1.2: Ejemplos de sustratos de MRP2/Mrp2

Anticancerígenos	Cisplatín <i>Doxorubicina</i> Epirubicina <i>Etopósido</i> Irinotecan Metotrexato <i>Vinblastina</i>	Antirretrovirales	<i>Indinavir</i> <i>Nelfinavir</i> <i>Saquinavir</i> <i>Ritonavir</i> Adevovir Cidofovir Lopinavir	Antibióticos	Ampicilina Azitromicina Ceftriaxona Grepafloxacina Irinotecan <i>Rifampicina</i>
Antihipertensivos	Olmesartán, Temocaprilato	Otros	Etinilestradiol-3-O-glucurónido Genistein-7-glucósido p-aminohippurato Floridzina Dinitrofenil-S-glutatión Vinca alcaloides		

Se presentan los sustratos de mayor difusión y más utilizados de MRP2/Mrp2. Los datos se extrajeron de [7]. Los sustratos en *Italica* son transportados tanto por MRP2 como por P-gp.

MRP2 y P-gp presentan especificidad de sustrato parcialmente superpuesta (Tabla 1.2). Además, la colocalización en la membrana apical y la coexpresión en duodeno y yeyuno sugieren que estos transportadores trabajan en forma concertada para constituir una importante barrera contra la absorción de gran variedad de compuestos tóxicos y xenobióticos [59]. Por ejemplo, la absorción de grepafloxacina, colchicina y darunavir está directamente influenciada por el efecto combinado de P-gp y MRP2 [59].

Regulación transcripcional de su expresión

La clonación y caracterización de la región promotora de *MRP2* [64], permitió la identificación de varios sitios de unión para factores de transcripción específicos [65], [66]. Entre ellos se identificó un elemento de respuesta a hormonas en el promotor de *Mrp2* de rata, al cual se unen heterodímeros del receptor RXR α con FXR, PXR o CAR [35].

Además de los compuestos hidrofóbicos que se unen a receptores nucleares, otros xenobióticos actúan predominantemente uniéndose a receptores de membrana o interactuando con proteínas de la membrana. En estos casos, la vía de señalización puede estar asociada a un aumento de la actividad adenilato ciclasa y resultando así en mayores niveles de AMPc intracelular.

Además de los mecanismos descritos anteriormente, el estudio del promotor de *MRP2* humano ha revelado la presencia de sitios de unión para factores de transcripción como el *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2), PPAR α , CCAAT/enhancer-binding protein- β y factores nucleares hepáticos, entre otros [64], [66]. Si bien la regulación de *MRP2* por estos factores fue principalmente descrita en hígado, es posible que participen también en la regulación de *MRP2* intestinal ya que se expresan constitutivamente en este tejido [67].

Regulación postranscripcional de su expresión y actividad

La actividad y la expresión de *MRP2* pueden ser también reguladas sin modificación en los niveles de ARNm. Los mecanismos son diversos y comprenden regulación a nivel postranscripcional (modificaciones en el transporte o procesamiento del ARNm), traduccional (modulación de la síntesis de proteínas) o postraduccional (cambios en la estabilidad, localización o afinidad de sustrato de la proteína). Un ejemplo de regulación postranscripcional se observa en el síndrome de Dubin-Johnson en el que el procesamiento del ARNm resulta en una proteína trunca y no funcional [68], [69].

En cuanto a la regulación traduccional, se describió un aumento en la expresión de *Mrp2* hepática en ratas tratadas con pregnenolona-16 α -carbonitrilo y una disminución en el tratamiento de ratas preñadas [70]. Estos autores, demostraron la presencia de varios sitios de inicio de la transcripción en el promotor de *Mrp2*. El uso

alternativo de estos sitios lleva a varias 5'UTR (región 5' no traducida) con diferente eficiencia de traducción [71], [72]. Una explicación posible es la presencia o ausencia de sitios blanco de microARN. Es decir la presencia de un sitio blanco de un microARN conduce a una eficiencia de traducción menor, la ausencia de dicho sitio equivale a una eficiencia de traducción mayor.

Como ejemplo de regulación postraducciona de MRP2 se puede mencionar la modificación de la localización del transportador, es decir desde la membrana apical a compartimientos subapicales y viceversa, que impacta directamente en la actividad de transporte de MRP2. Este tipo de regulación se encuentra ampliamente descrito en hígado en diferentes condiciones fisiológicas y fisiopatológicas [73]. En intestino, la información sobre la regulación postraducciona de MRP2 es escasa y restringida a un estudio realizado por Nakano y col. (2009) [74], mostrando la internalización de Mrp2 de rata en respuesta a la activación de la proteína quinasa C clásica con la participación de la defosforilación de ezrina.

1.5. Modelos de intestino delgado

Existen numerosos modelos de intestino delgado que permiten estudiar múltiples aspectos de la fisiología y fisiopatología intestinal. En este trabajo de Tesis se aplicaron dos modelos de acuerdo a las necesidades experimentales.

1.5.1. Modelo *in vivo*

La principal ventaja de los modelos *in vivo* es que representan modelos pluricelulares que exhiben las características morfológicas y fisiológicas de un organismo entero. Para el estudio del intestino delgado se han utilizado en gran medida

modelos murinos, como el ratón y la rata. Esta última presenta la ventaja de poseer órganos de mayor tamaño, facilitando el trabajo experimental [75].

El intestino delgado de rata presenta distribución de las enzimas metabólicas y transportadores similar a la de humanos [76]. Por ello, se ha utilizado como modelo de intestino delgado humano para el estudio de la permeabilidad y barrera intestinal [77]. Por otro lado, representa un modelo válido para el estudio de enfermedades inflamatorias intestinales [75].

1.5.2. Modelo *in vitro*

Para el estudio del mecanismo molecular de manera sencilla es preferible un modelo de células en cultivo, que permita además aislar los procesos que ocurren en el enterocito del resto de los tipos celulares. En este caso lo ideal sería utilizar un cultivo primario de enterocitos de rata. Sin embargo, este tipo de cultivo es difícil de obtener y presenta baja viabilidad [77]. Por otro lado requiere la utilización de grandes cantidades de antibióticos para evitar contaminaciones, los cuales muy probablemente afecten la expresión y/o actividad de los transportadores en estudio [78].

Surge como una alternativa para estudios *in vitro* la línea celular Caco-2. Esta línea, derivada de adenocarcinoma de colon, es la línea celular más usada como modelo de epitelio intestinal humano [79]. En cultivo, las células Caco-2 se diferencian espontáneamente, según la densidad celular [80]. Normalmente crecen como una monocapa de células indiferenciadas, pero cuando alcanzan la confluencia y se mantienen en cultivo entre 14 (Figura 1.5) y 40 días, llegan a formar monocapas de células bien polarizadas mostrando, a nivel ultraestructural, uniones estrechas y desarrollo apical de microvellosidades, características de los enterocitos maduros [80]–[83]. Durante la diferenciación se producen enzimas características de BBM de

intestino humano adulto como fosfatasa alcalina, aminopeptidasa y proteínas estructurales como villina [80], [81], [83].

A pesar de su origen colónico, esta línea celular expresa la mayoría de las características morfológicas y funcionales de las células epiteliales del intestino delgado, incluyendo las enzimas de fase I y II [77]. Además presenta una muy buena correlación con el intestino delgado en lo referente a la expresión de los principales transportadores ABC [84], [85]. En efecto, la expresión de MRP2, MDR1 y MRP3 es muy similar a la observada en el intestino delgado proximal (MRP2) y en el intestino delgado distal y colon (MDR1 y MRP3) [85]–[87], por lo que pueden considerarse un modelo híbrido del intestino en su totalidad.

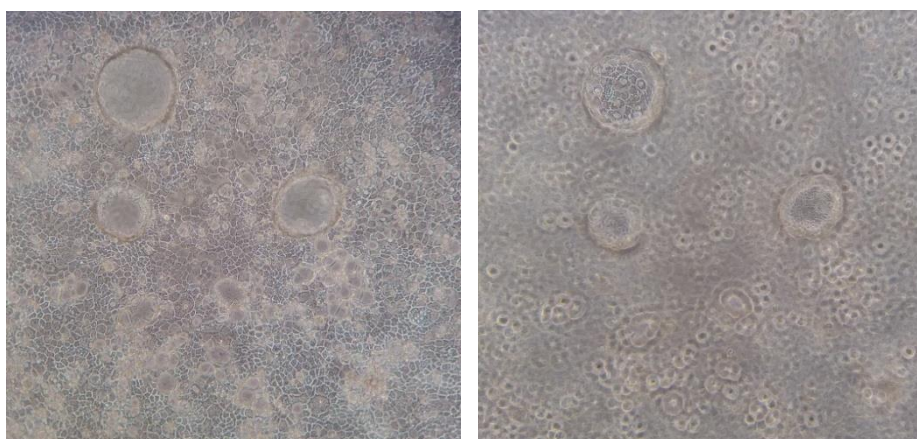


Figura 1.5: Aspecto microscópico de las células Caco-2. Imágenes resultantes de crecer una cantidad inicial de células Caco-2 de $2,5 \times 10^5$ durante 14 días en placas de 6 pocillos. Las fotografías corresponden a un aumento total 10X en las que se observa las células confluentes y la presencia de domos (células en un plano focal diferente, imagen derecha). La formación de domos es una característica de diferenciación de algunas células epiteliales.

1.6. Péptido tipo glucagon 2

GLP-2 (*glucagon-like peptide 2*) es una hormona peptídica compuesta por 33 aminoácidos. En la Figura 1.6A se detalla la secuencia de GLP-2 humano y de rata, las cuales presentan variación en un único aminoácido. Esta hormona se produce a partir del procesamiento del gen del proglucagon, codificado en el cromosoma 2 en humanos y en el 3 en ratas. El proglucagon sufre distinto procesamiento de acuerdo al tejido del

cual se trate (Figura 1.6B). En el páncreas el proglucagon es sintetizado en las células α y procesado por la prohormona convertasa 2, la cual genera como productos principales glucagon y MPGF (fragmento principal del proglucagon). En cambio, en intestino y cerebro el proglucagon es procesado por la prohormona convertasa 1 y 3, generando como productos glicetina, oxitomodulina, GLP-1, GLP-2 e IP-2 (péptido interviniente 2). En intestino este procesamiento se produce en las células L enteroendócrinas las cuales se encuentran principalmente en la zona distal del intestino delgado. GLP-1 y GLP-2 se producen en forma equimolar y se cosecretan, luego de la ingesta de nutrientes. GLP-1 tiene como principales blancos el páncreas y otros órganos, mientras que GLP-2 ejerce su acción principalmente en el intestino, en particular el intestino delgado proximal [88].

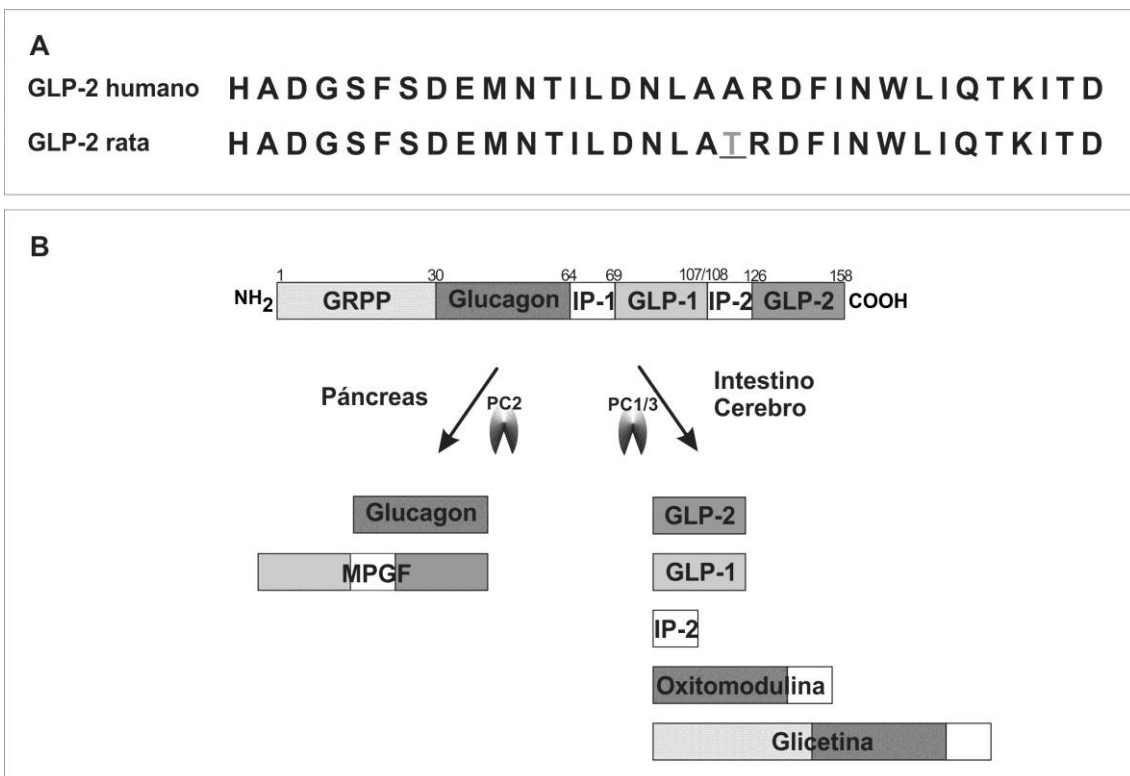


Figura 1.6: Secuencia y síntesis de GLP-2: **A.** Secuencia aminoacídica de GLP-2 humana y de rata. En gris y subrayado se señala el único aminoácido que difiere en la secuencia entre ambas especies. **B.** GLP-2 se sintetiza a partir del procesamiento del proglucagon por la prohormona convertasa. Distintas isoformas de prohormona convertasa en páncreas e intestino y cerebro realizan un procesamiento diferencial generando distintos productos. En intestino uno de los productos principales es GLP-2. MPGF: fragmento principal del proglucagon; IP: péptido interviniente; GLP: péptido tipo glucagon.

GLP-2 es una hormona enterotrófica cuyos efectos consisten en hipertrofia e hiperplasia del epitelio intestinal, resultando en mayor superficie intestinal, altura de la vellosidad y absorción de nutrientes [88]. De esta manera GLP-2 regula la morfología, función e integridad de la mucosa, durante procesos fisiológicos como el desarrollo y durante la lactancia o regeneración intestinal luego de una injuria en el adulto [89], [90]. Además, GLP-2 está asociada con el crecimiento y adaptación intestinal en una variedad de condiciones patológicas como por ejemplo síndrome del intestino corto [91], *bypass* gástrico [92] y enfermedades inflamatorias intestinales [93]. En estos casos la acción de GLP-2 se basa principalmente en la regeneración epitelial, la mayor absorción de nutrientes, la reducción de la inflamación intestinal y una mejora en la función de barrera intestinal [88], [93].

GLP-2 actúa a través de un receptor de membrana, denominado GLP-2R, perteneciente a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G (PGCR) (Figura 1.7). Este tipo de receptores poseen 7 dominios TM y se asocian a proteína G. Esta última se encuentra a su vez asociada a la membrana y está compuesta por 3 subunidades denominadas α , β y γ . Cuando el ligando se une al receptor asociado, la proteína G une GTP y se disocia liberando la subunidad α . Existen distintos tipos de subunidad α con la capacidad de inducir o inhibir sus proteínas blanco. En este caso, GLP-2R se asocia a proteínas $G\alpha_s$ que luego de su activación estimulan la síntesis de AMPc por la enzima adenilato ciclasa (AC). Luego AMPc activa la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA), la cual fosforila residuos de Ser o Thr en sus proteínas blanco, entre los cuales se encuentran varios factores de transcripción.

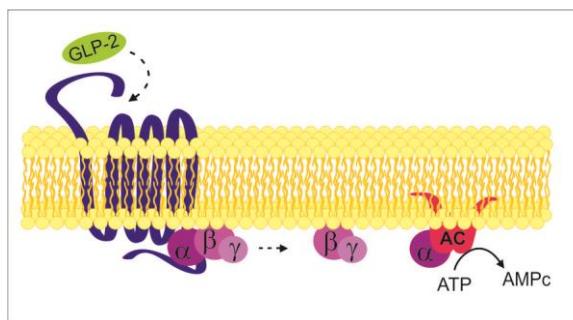


Figura 1.7: Mecanismo de activación de receptores acoplados a proteína G: El receptor de GLP-2, GLP-2R, pertenece a la superfamilia de receptores asociados a proteína G. Tras la unión del sustrato (GLP-2) al receptor, la unión de GTP a la proteína G produce la disociación de la subunidad α . La subunidad α activada induce la activación de adenilato ciclasa (AC) la cual produce AMPc a partir de ATP. Finalmente, el incremento de AMPc activa proteínas efectoras.

GLP-2R se expresa en miofibroblastos, células enteroendócrinas y neuronas entéricas pero no se expresa en los enterocitos [94]. De esta manera, el efecto que GLP-2 ejerce sobre el epitelio intestinal debe probablemente producirse de manera indirecta.

Como se mencionó anteriormente, GLP-2 se encuentra relacionado a la adaptación intestinal en ciertas situaciones fisiológicas. Por ejemplo, se ha observado que los niveles plasmáticos de dicha hormona se encuentran marcadamente incrementados en ratas madres durante la lactancia, lo cual representa una adaptación fisiológica a la mayor demanda energética, y por ende, a la mayor ingesta de alimentos. Se ha observado además que las ratas madres en lactancia muestran un incremento en la excreción intestinal de xenobióticos aniónicos conjugados como resultado del aumento de la expresión de Mrp2 [95]. Recientemente demostramos que ratas hembras normales, tratadas con GLP-2 recombinante de rata por vía s.c., presentan una inducción en la expresión y actividad de Mrp2 intestinal [96], demostrando por primera vez que GLP-2 está relacionada con el incremento de Mrp2 durante la lactancia.

1.7. Endotoxemia

El lipopolisacárido (LPS) es el principal componente de la membrana externa de la mayoría de las bacterias Gram-negativas [97]. Se encuentra anclado a dicha membrana mediante su porción lipídica denominada lípido A (Figura 1.8). El lípido A es un disacárido de glucosamina fosforilado que se encuentra unido a varios ácidos grasos. Está compuesto además por un núcleo de oligosacárido conformado por un núcleo interno, que contiene al menos un ácido 2-keto-3-deoxioctanato (KDO) que se une covalentemente al lípido A y suele contener heptosas entre otros residuos sacáridos y no sacáridos, mientras que el núcleo externo está generalmente conformado por hexosas. A este oligosacárido se une generalmente un polioligosacárido específico altamente variable también denominado antígeno O.

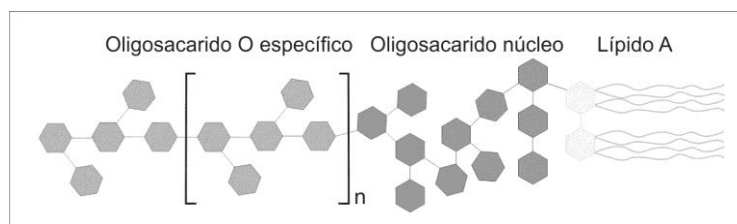


Figura 1.8: Estructura general del lipopolisacárido bacteriano. El lipopolisacárido bacteriano consta de varias cadenas de ácidos grasos mediante las cuales se une a la membrana externa bacteriana, un núcleo de oligosacáridos que posee el azúcar ácido 2-keto-3-deoxioctanato mediante el cual se une al lípido A, y un oligosacárido específico también denominado antígeno O.

El LPS al solubilizarse y alcanzar el torrente sanguíneo es denominado endotoxina, resultando en una respuesta inflamatoria aguda [98], [99]. Esta respuesta incluye una variedad de mediadores de inflamación, entre los cuales se encuentran las citoquinas pro-inflamatorias interleuquina-1 β (IL-1 β), interleuquina 6 (IL-6) y factor necrótico tumoral α (TNF α), mediadores de estrés oxidativo como óxido nítrico y prostaglandinas y derivados de la lipooxigenasa [100]. En los mamíferos, el aumento de la expresión de estas citoquinas es acompañado por una disminución de receptores nucleares, como FXR, PXR y CAR. Estos receptores nucleares participan en la

regulación de enzimas de biotransformación y transportadores ABC a nivel transcripcional [101], [102]. De esta manera, el proceso de endotoxemia afecta la barrera bioquímica intestinal, alterando la expresión y la actividad de enzimas de biotransformación [103]–[105] y de transportadores de drogas [106]–[108]. En particular, se ha demostrado que la endotoxemia producida por LPS (5 mg/kg p.c. vía i.p.) reduce la expresión y actividad de Mrp2 y P-gp en ratas [109], [110] y que esta regulación podría producirse a nivel transcripcional por citoquinas inflamatorias. Sin embargo ningún estudio ha demostrado en forma directa la relación de causa-efecto entre las citoquinas y estos transportadores. Por otro lado, se ha demostrado que en hígado el LPS produce una regulación aguda dentro de las 3 h posteriores al tratamiento y una regulación a nivel transcripcional que ocurre luego de las 12 h; siendo ambos efectos prevenidos por la droga antiinflamatoria dexametasona [111].

ABREVIATURAS y SÍMBOLOS

5'UTR: región 5' no traducida	LXR: receptor del hígado X
ABC: cassette de unión a ATP	MCT: membranas celulares totales
AC: adenilato ciclasa	MDA: malonil di-aldehído
ActD: actinomicina D	MDR1 (<i>multidrug resistance protein 1</i>): proteína de resistencia a multidrogas 1
a-IL-1 β : anticuerpo anti-interleuquina 1 β	MPGF: fragmento principal del proglucagon)
BBM : membrane del ribete en cepillo	MRP2/Mrp2: proteína asociada a resistencia a multidrogas 2
BCRP (<i>breast cancer resistance protein</i>): protein de resistencia al cáncer de mama	NBD: dominio de unión a nucleótidos
BSA: albúmina sérica bovina	Oatps o SLC21: Transportadores de aniones orgánicos
CAR: receptor constitutivo de androstanos	Octs/Octns: Transportadores de cationes orgánicos
CDNB: 1-cloro-2,4-dinitrobenceno	PGCR: receptores acoplados a proteína G
ChIP: inmunoprecipitación de la cromatina	P-gp: P-glicoproteína
cMOAT: transportador canalicular multiespecífico de aniones orgánicos	PKA: proteína quinasa dependiente de AMPc
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol	PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonio
db-AMPc: dibutilil-AMP cíclico	Pro: probenecid
DDA: 2',3'-dideoxiadenosina	PXR: receptor de pregnanos X
DMSO: dimetilsulfóxido	R123: rodamina 123
DNP-SG: dinitrofenil-S-glutación	RXR: receptor de retinoides X
DTT: ditioneitol	s.c.: subcutánea
FXR: receptor de farnesoides X	SOD: superóxido dismutasa
GLP-1 y 2: péptido tipo glucagon 1 y 2	Sp1: Proteína específica 1
GLP-2R: receptor de GLP-2	TBARS: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
GSH: glutation reducido	TM: transmembrana
GSSG: glutation oxidado	TNF α : factor necrótico tumoral α
i.p., intraperitoneal	ZO-1: zonula occludens
IL-1 β : interleuquina-1 β	
IL-6: interleuquina 6	
IP-2: péptido interviniente 2	
KDO: ácido 2-keto-3-deoxioctanato	
LPS: lipopolisacárido	

2. OBJETIVOS

2.1. Considerando la capacidad de GLP-2 de inducir la barrera bioquímica intestinal, específicamente de inducir la expresión y actividad de Mrp2 intestinal en ratas, nos propusimos evaluar la capacidad de dicha hormona de compensar situaciones de alteración de la barrera bioquímica intestinal en particular aquella dependiente de transportadores de drogas. Evaluamos esta capacidad en un modelo inflamatorio ya caracterizado en la rata, como es el modelo de endotoxemia. En particular este modelo presenta alteraciones en la expresión y actividad de los transportadores intestinales P-gp y Mrp2, por lo tanto estudiamos la capacidad de GLP-2 de contrarrestar las alteraciones en ambos transportadores. Nos propusimos además utilizar dos tipos de protocolos de tratamiento con GLP-2. Uno que evalúe la capacidad preventiva de la hormona, el cual comienza previo a la inducción de la endotoxemia. Y otro que evalúe la capacidad de GLP-2 de revertir los efectos del LPS sobre los transportadores intestinales Mrp2 y P-gp, el cual se inicia luego del establecimiento del estado inflamatorio.

2.2. Nos propusimos además evaluar el mecanismo de regulación de LPS sobre los transportadores intestinales Mrp2 y P-gp, considerando la participación de un posible intermediario, la IL-1 β . Para ello utilizamos un protocolo de neutralización con anticuerpo anti-IL-1 β en un modelo *in vivo*. Por otro lado evaluamos el efecto agudo y a largo plazo de IL-1 β en la línea celular Caco-2.

2.3. Una vez observada la capacidad de GLP-2 de inducir la expresión y actividad de Mrp2 intestinal, nos propusimos caracterizar el efecto de esta hormona sobre la expresión y actividad de MRP2 en un modelo de epitelio intestinal humano constituido por el cultivo de células Caco-2, así como identificar los mecanismos moleculares subyacentes.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos químicos

GLP-2 y anticuerpo anti-interleuquina 1 β (a-IL-1 β) se adquirieron en Abcam (Cambridge, UK) y el LPS de *E. coli* 055:B5 (LPS), ácido 5-(3-(2-(7-chloroquinolina-2-il)etil)fenil)-8-dimetilcarbamil-4,6-ditiaoctanoic de sodio (MK571), KT5720 y PSC833 se adquirieron en Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, USA). N-[2-(p-bromocinamilamino)etil]-5-isoquinolinesulfonamida dihidrocloruro (H89), forskolina y 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB), dinitrofenil-S glutación (DNP-SG), leupeptina, fluoruro de fenilmetilsulfonio (PMSF), dibutiril-AMP cíclico (db-AMPC), pepstatina A, dimetilsulfóxido (DMSO), probenecid (Pro), glutación (GSH), rodamina 123 (R123), actinomicina D (ActD), Gö6976, 2',3'-dideoxiadenosina (DDA) y bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) se obtuvieron de Sigma Aldrich Co. (Missouri, EE.UU.). Los restantes reactivos fueron del máximo grado analítico disponible comercialmente.

3.2. Experimentos en animales

3.2.1. Generalidades

Se utilizaron ratas Wistar hembras adultas (200-215 g), de 90 días de edad, provenientes del bioterio del Centro de Medicina Comparada-Instituto de Cs.Veterinarias del Litoral (UNL-CONICET), Esperanza, Santa Fe, Argentina. Los animales se alimentaron *ad-libitum* con una dieta comercial estándar y agua, se mantuvieron bajo condiciones de temperatura (21-24 °C) y humedad (45-50%) controladas, y bajo ciclos de luz-oscuridad de 12 h de duración cada uno. Todo tratamiento o manipulación efectuado sobre los animales de laboratorio se realizó de acuerdo a las normas internacionales para el cuidado de animales de laboratorio

(“*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” National Institutes of Health, EE.UU. Octava edición, 2011) y al “Reglamento sobre uso y manejo de animales de laboratorio” (Exp. N° 6109/012-Resol. C.D. N° 267/02) aprobado por el Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR. Los protocolos experimentales han sido aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de nuestra Facultad (Resol. C.D. N° 410 /2014 y N° 457 /2014).

3.2.2. Tratamientos

3.2.2.1. Tratamientos de prevención y reversión con GLP-2 en la endotoxemia inducida por LPS

Se realizaron dos esquemas de tratamiento con GLP-2 de manera de evaluar la capacidad del enteroglucagon de prevenir o revertir los efectos de la endotoxemia sobre la expresión y actividad de los trasportadores intestinales. Para cada esquema de tratamiento los animales se dividieron al azar en 4 grupos que recibieron inyecciones de LPS (5 mg/kg p.c.) vía i.p., GLP-2 (125 µg/kg p.c.) vía s.c., ambos o sus vehículos (2 y 0,5 ml/kg p.c. respectivamente) de acuerdo a los esquemas detallados en la Figura 3.1A. Los grupos se nombraron y fueron tratados de la siguiente manera:

- Para los estudios de prevención con GLP-2 (N=4):

Grupo LPS: una inyección de LPS y 7 inyecciones de PBS 1X (vehículo de GLP-2); (preparado a partir de PBS 10X: NaCl 1,4 M, KCl 27 mM, Na₂HPO₄ 100 mM, KH₂PO₄ 18 mM, pH=7,30).

Grupo GLP-2: 7 inyecciones de GLP-2 y una inyección de solución fisiológica (vehículo de LPS).

Grupo LPS + GLP-2: 7 inyecciones de GLP-2 y una inyección de LPS.

Grupo Control: 7 inyecciones de PBS 1X y una inyección de solución fisiológica.

- Para los estudios de reversión con GLP-2 (N=4):

Grupo LPS: una inyección de LPS y 2 inyecciones de PBS 1X (vehículo de GLP-2).

Grupo GLP-2: 2 inyecciones de GLP-2 y una inyección de solución fisiológica (vehículo de LPS).

Grupo LPS + GLP-2: 2 inyecciones de GLP-2 y una inyección de LPS.

Grupo Control: 2 inyecciones de PBS 1X y una inyección de solución fisiológica.

En ambos protocolos, las muestras se recolectaron 24 h después de la dosis de LPS o solución fisiológica y se realizaron las determinaciones detalladas en la Figura 3.1B.

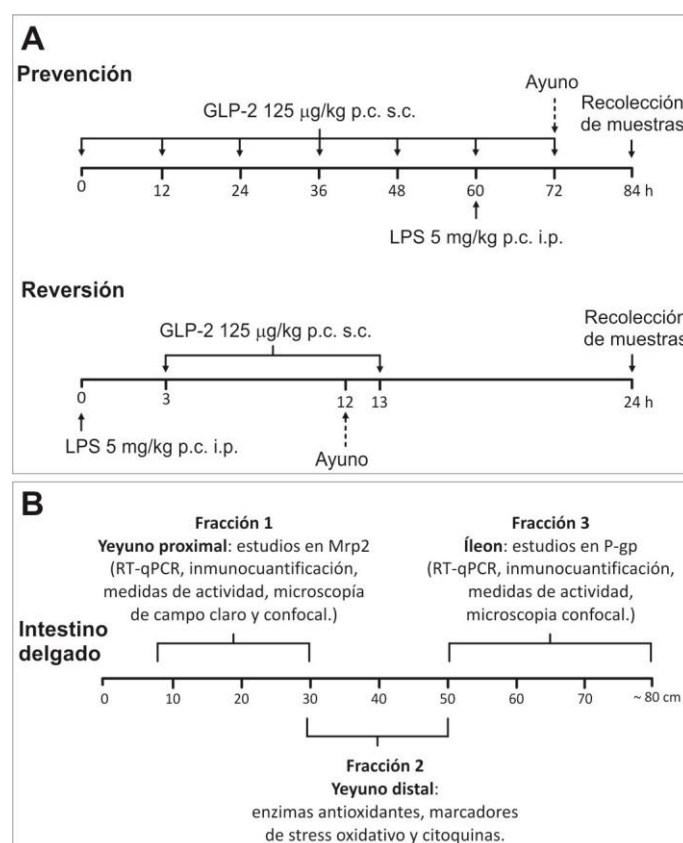


Figura 3.1: Esquemas de tratamiento con LPS y GLP-2 y ensayos realizados. A. El tratamiento con LPS consistió en una inyección única i.p. de LPS (5 mg/kg p.c.), mientras que el tratamiento con GLP-2 consistió en 7 (protocolo de prevención) ó 2 (protocolo de reversión) inyecciones s.c. de GLP-2 recombinante de rata (125 µg/kg p.c.). Los animales se ayunaron 12 h antes de la recolección de muestras. **B.** Detalle del fraccionamiento realizado en el intestino delgado y ensayos realizados en cada fracción.

3.2.2.2. Tratamiento para evaluar la participación de GLP-2 en la regulación de Mrp2 intestinal

Los animales se dividieron al azar en 4 grupos que recibieron inyecciones de GLP-2 (125 µg/kg p.c.) vía s.c., DDA (150 µg/kg p.c.) vía i.p., ambos, o sus vehículos (0,5 y 2 ml/kg p.c. respectivamente), de acuerdo al esquema detallado en la Figura 3.2A. La recolección de muestras se realizó 2 h después de la última dosis. Los grupos se nombraron (N=4) y fueron tratados de la siguiente manera:

Grupo GLP-2: 7 inyecciones de GLP-2 y 7 inyecciones de solución fisiológica.

Grupo DDA: 7 inyecciones de DDA y 7 inyecciones de PBS 1X (vehículo de GLP-2).

Grupo DDA + GLP-2: 7 inyecciones de GLP-2 y 7 inyecciones de DDA.

Grupo Control: 7 inyecciones de PBS 1X y 7 inyecciones de solución fisiológica (vehículo de DDA).

Los animales fueron ayunados 12 h antes de la recolección de muestras y se realizaron las determinaciones detalladas en la Figura 3.2B.

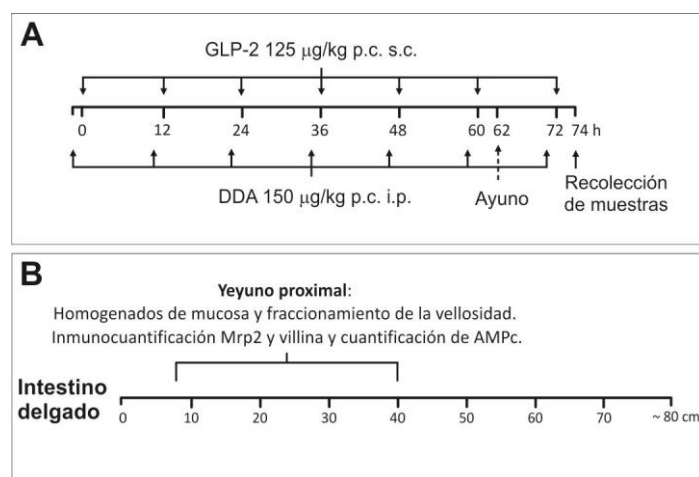


Figura 3.2: Esquema de tratamiento con GLP-2 y ensayos realizados. **A.** El tratamiento con GLP-2 consistió en 7 inyecciones s.c. de GLP-2 recombinante de rata (125 µg/kg p.c.) y 7 inyecciones i.p. de DDA (150 µg/kg p.c.) suministradas 10 min antes de la dosis de GLP-2. Los animales se ayunaron 12 h antes de la recolección de muestras. **B.** Ensayos realizados en yeyuno proximal.

3.2.2.3. Tratamiento para evaluar la participación de IL-1 β en la regulación de Mrp2 y P-gp intestinales en la endotoxemia inducida por LPS

Los animales se dividieron al azar en 3 grupos que recibieron inyecciones de LPS (5 mg/kg p.c.), LPS y anticuerpo anti-interleuquina 1 β (a-IL-1 β) (25 μ g/kg p.c.), o sus vehículos (2 ml/kg p.c.) de acuerdo al esquema detallado en la Figura 3.3A. Los grupos (N=3) se nombraron y fueron tratados de la siguiente manera:

Grupo LPS: una inyección de LPS y 4 inyecciones de PBS 1X (vehículo de a-IL-1 β).

Grupo LPS + a-IL-1 β : 4 inyecciones de a-IL-1 β y una inyección de LPS.

Grupo Control: 4 inyecciones de PBS 1X (vehículo de a-IL-1 β) y una inyección de solución fisiológica (vehículo de LPS).

Las muestras se obtuvieron 24 h después de la dosis de LPS o solución fisiológica. En la Figura 3.3B se detallan las determinaciones realizadas en cada fracción del intestino delgado.

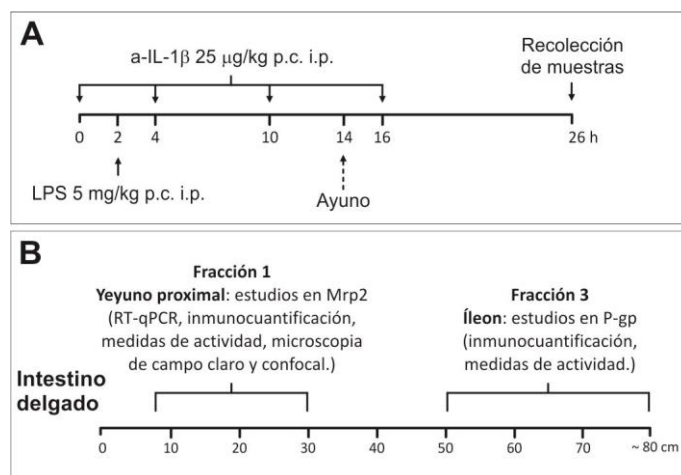


Figura 3.3: Esquema de tratamiento con LPS y a-IL-1 β y ensayos realizados. **A.** El tratamiento con LPS consistió en una inyección única i.p. de LPS (5 mg/kg p.c.), mientras que el tratamiento con a-IL-1 β consistió en 4 inyecciones i.p. de a-IL-1 β (25 μ g/kg p.c.). Los animales se ayunaron 12 h antes de la recolección de muestras. **B.** Detalle del fraccionamiento realizado en el intestino delgado y ensayos realizados en cada fracción.

3.2.3. Recolección de muestras

Los animales fueron anestesiados con una inyección i.p. de ketamina: xilacina (100 mg/kg: 15 mg/kg) y luego se les realizó una incisión abdominal. Los animales fueron sacrificados por punción cardíaca, se extrajo el intestino delgado y se lo lavó con solución fisiológica helada. El intestino delgado fue fraccionado de acuerdo a los ensayos a realizar luego de cada tratamiento (Figuras 3.1B; 2B y 3B). Comenzando desde la válvula pilórica, los primeros 8 cm, correspondientes al duodeno, fueron descartados, los siguientes 20-22 cm se consideraron como yeyuno proximal y se utilizaron para estudios de expresión y actividad de Mrp2; aislamiento de enterocitos y medidas de AMPc celular. Los siguientes 20 cm se utilizaron para estudios de marcadores de estrés oxidativo, enzimas antioxidantes y cuantificación de citoquinas. El resto del intestino delgado, alrededor de 30 cm correspondientes al íleon, se utilizó para estudios de expresión y actividad de P-gp.

Los fragmentos se mantuvieron en solución fisiológica fría hasta el fraccionamiento y procesamiento de los mismos. Se separaron alícuotas de las fracciones 1 y 3 de yeyuno proximal e íleon para la extracción de ARN total, las cuales se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y para estudios por microscopia de campo claro y confocal, las cuales se congelaron a -70 °C en 2-metilbutano. Las muestras se mantuvieron a -70 °C hasta su utilización. Alícuotas de las fracciones 1, 2 y 3 se abrieron en forma longitudinal, se retiró la capa de mucus, la mucosa intestinal se obtuvo por raspado, se pesó y se utilizó para la preparación de homogenados totales, aislamiento de enterocitos o fracciones de membrana plasmática enriquecida en BBM. Estas últimas se utilizaron para la inmunocuantificación de Mrp2 y P-gp.

3.2.4. Obtención de membranas plasmáticas enriquecidas en BBM

Se pesaron 100 mg de mucosa intestinal de las fracciones 1 y 3 y se homogenizaron en 2 ml del *buffer* A (pH=7,10; Manitol 50 mM; Tris/HCl 2 mM; Leupeptina 25 µg/ml; PMSF 40 µg/ml; Pepstatina A 0,5 µg/ml). La homogenización se realizó con un émbolo de teflón estándar y camisa de vidrio (20 golpes a 3.000 rpm). La obtención de las membranas plasmáticas ricas en BBM se realizó utilizando el método de precipitación por catión divalente [112], con algunas modificaciones [52]. Para ello, una vez obtenidos los homogenados, se les adicionaron 20 µl de CaCl₂ 1 M y se incubaron durante 15 min en hielo, mezclando por inversión cada 5 min. Posteriormente, los homogenados se centrifugaron a 3.000 g durante 15 min a 4 °C y los sobrenadantes se volvieron a centrifugar a 27.000 g durante 40 min a 4 °C. El *pellet* enriquecido en BBM se resuspendió en 100 µl de *buffer* B (pH=7,50; Manitol 300 mM; Hepes 10 mM; Tris 10 mM; Leupeptina 25 µg/ml; PMSF 40 µg/ml; Pepstatina A 0,5 µg/ml).

Se cuantificaron las proteínas por el método de Sedmak-Grossberg y se determinó el contenido Mrp2 y P-gp en BBM por inmunocuantificación.

3.2.5. Medidas de actividad de transportadores *in vitro*

3.2.5.1. Actividad de Mrp2

La actividad de Mrp2 *in vitro* se determinó en secciones de 3 cm de longitud de la fracción 1 (Figura 3.1). El armado de los saquitos se realizó sobre una placa de vidrio permanentemente enfriada sobre hielo. Los segmentos de intestino se evertieron antes del armado de los mismos, quedando el compartimento seroso dentro del saquito y el mucoso por fuera. Los saquitos intestinales evertidos se llenaron con *buffer* Krebs-Henseleit (118 mM NaCl; 4,8 mM KCl; 1,2 mM MgSO₄; 1,25 mM CaCl₂; 1 mM

KH_2PO_4 ; 1,6 mM MgCl_2 ; 24 mM NaHCO_3 ; 40 mM glucosa; pH=7,4) previamente burbujeado con O_2/CO_2 (95:5) (compartimento seroso). Los mismos se incubaron durante 20 min en 7 ml del mismo *buffer* con el agregado de 100 μM de CDNB (compartimento mucoso). El compartimento mucoso se mantuvo con burbujeo de O_2/CO_2 (95:5) durante todo el experimento (Figura 3.4).

El CDNB difunde libremente a través de la membrana plasmática y es metabolizado en el interior de los enterocitos convirtiéndose en DNP-SG, sustrato modelo de Mrp2 (Tabla 1.2). La formación de DNP-SG es muy eficiente y está catalizada principalmente por el sistema enzimático de la glutatión S-transferasa. Este compuesto, una vez formado, es excretado desde las células en forma ATP-dependiente, a través de Mrp2.

Todos los experimentos se realizaron en presencia o ausencia de MK571 10 μM en el compartimiento mucoso, para inhibir la actividad de Mrps [85]. Se tomaron alícuotas de 120 μl del compartimiento mucoso a los 0; 5; 10; 15 y 20 min de incubación. Después de la incubación, los saquitos se vaciaron, secaron sobre un papel absorbente y se pesaron.

Las alícuotas del contenido del compartimiento mucoso se trataron con 6 μl de HClO_4 70% (v/v) y luego se centrifugaron a 3.500 g durante 5 min. El contenido de DNP-SG se determinó en los sobrenadantes utilizando un HPLC modelo M-600 (Waters, Massachusetts, EE.UU.), equipado con una columna Luna 5 μ C18 (mBONDAPAK, Waters) 100 Å 250 x 4,60 nm (Phenomenex, California, EE.UU.) [95].

La elución se realizó de modo isocrático con una fase móvil de acetonitrilo, 0,01% H_3PO_4 (1:3 v/v) y a una velocidad de flujo de 1,0 ml/min. El compuesto DNP-SG se detectó a 365 nm y se cuantificó la altura del pico obtenido, previa identificación

del mismo utilizando como testigo DNP-SG. Se determinaron los moles totales de DNP-SG en el compartimiento mucoso y se relativizaron al peso del saquito intestinal correspondiente. Dicho valor se graficó en función del tiempo de incubación.

3.2.5.2. Actividad de P-gp

La actividad de P-gp *in vitro* se determinó en secciones de 4 cm de longitud de la fracción 3 del intestino delgado (Figura 3.1). El armado de los saquitos se realizó sobre una placa de vidrio permanentemente enfriada sobre hielo. Los segmentos de intestino se evertieron antes del armado de los mismos, quedando el compartimento seroso dentro del saquito y el mucoso por fuera. Los saquitos intestinales evertidos, se llenaron (compartimento seroso) con *buffer* Krebs-Henseleit previamente burbujeado con O₂/CO₂ (95:5) con el agregado de 12,5 μM de R123, sustrato modelo de P-gp (Tabla 1.1). Los mismos se incubaron en 5 ml del mismo *buffer* (compartimento mucoso), durante 30 min a 37 °C. El compartimento mucoso se mantuvo con burbujeo de O₂/CO₂ (95:5) durante todo el experimento (Figura 3.4).

Todos los experimentos se realizaron en presencia o ausencia de PSC833 10 μM en el compartimento mucoso, para inhibir la actividad de P-gp. Se tomaron alícuotas de 100 μl del compartimento mucoso a los 0; 5; 10; 15; 20; 25 y 30 min de incubación. Después de la incubación, los saquitos se vaciaron, secaron sobre un papel absorbente y se pesaron.

Las alícuotas del contenido del compartimento mucoso se colocaron en una placa de 96 pocillos negra y se midió la emisión de fluorescencia a 535 nm excitando la muestra a 485 nm en un espectrofluorómetro *DTX880 Multimode Detector* (Beckman-Coulter; CA, EE.UU). Se cuantificó el contenido de R123 en cada muestra mediante comparación con una curva de calibración. El contenido de R123 se normalizó al peso

del saquito intestinal correspondiente. Dicho valor se graficó en función del tiempo de incubación.

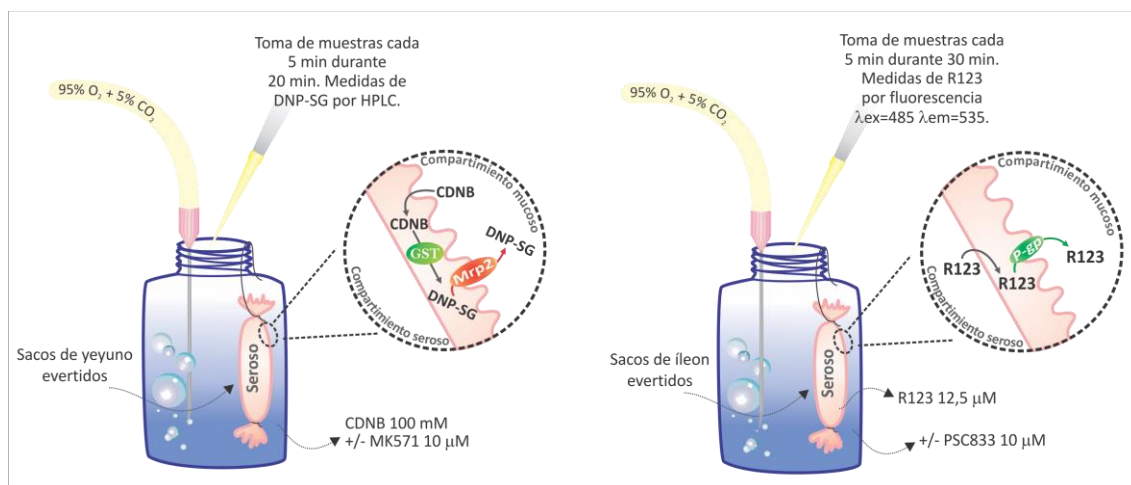


Figura 3.4: Esquemas de medidas de actividad de Mrp2 y P-gp *in vitro*. Todas las soluciones se prepararon en *buffer* Krebs-Henseleit previamente burbujeadas.

3.2.6. Cuantificación de la actividad de enzimas antioxidantes y marcadores de estrés oxidativo

Alícuotas de mucosa intestinal de la fracción 2 fueron homogeneizadas en solución salina (1:3 p/V) y se centrifugaron a 2.000 g durante 5 min. Los sobrenadantes (que llamaremos SN₁ de aquí en adelante) se utilizaron en la determinación de actividad superóxido dismutasa (SOD) y catalasa, y en la cuantificación de marcadores de estrés oxidativo. La concentración de proteínas se obtuvo por el método de Lowry.

3.2.6.1. Actividad catalasa

La actividad catalasa se determinó a través del consumo de H₂O₂ [113]. En 990 μl de *buffer* (K₃PO₄ 11,5 g/ml; 100 μl H₂O₂ (100 vol.); pH=7) se agregaron 10 μl de SN₁. Se midió la disminución de la absorbancia a 240 nm durante 90 s. La pendiente de dicha curva se utilizó para calcular la actividad enzimática como unidades por mg de proteína del SN₁.

3.2.6.2. Actividad superóxido dismutasa

La actividad SOD se evaluó en un gel de actividad como lo describen Weydert y Cullen [114], que mide la actividad SOD mediante la inhibición de la reducción de nitroazul de tetrazolio a su derivado formazán de color azul. Se prepararon geles de poliacrilamida 12% (v/v) como se detalla en la sección 3.4.2, exceptuando el agregado de SDS. En dicho gel se sembraron 35 µg de proteínas totales de los SN₁, preparadas en *buffer* de siembra (sección 3.4.2), exceptuando el agregado de SDS y DTT. De esta manera la enzima se encuentra en su estado nativo y conserva su actividad. Los geles se corrieron a 20 mA/gel a 4 °C, durante 1 h después de la salida del frente de corrida, en *buffer Laemmli* (sección 3.4.2) sin SDS. Luego se desmontó el gel y se incubó en *buffer* de equilibrio (K₃PO₄ 50 mM; EDTA 10 mM; pH=7,8) durante 30 min con agitación suave, luego se incubó en *buffer* de reacción (*buffer* de equilibrio; nitroazul de tetrazolio 0,24 mM; Riboflavina 33,2 µM, TEMED 0,2% v/v) durante 30 min con agitación suave en oscuridad. Finalmente, se expuso a luz blanca hasta visualizar bandas claras, sobre un precipitado azul. Los resultados se analizaron con el *Software Gel Pro Analyzer* (Media Cybernetics, Silver Spring, EE.UU.).

3.2.6.3. Lipoperoxidación

Se evaluó el nivel de lipoperoxidación mediante la cuantificación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) [115]. Para ello se preparó una mezcla de reacción (SDS 0,4%; ácido acético 7,5%; ácido tiobarbitúrico 7 µg/ml; volumen de reacción: 500 µl) y a esta mezcla se le agregó 25 µl de SN₁ o testigo (1,1,3,3-tetramethoxypropano 60 µM). Se incubó durante 1 h a 95 °C. Luego se midió la cantidad de producto, malonil di-aldehído (MDA), mediante la medición de

absorbancia a 532 nm. La cantidad de TBARS se expresó en términos de MDA por mg de proteína.

3.2.6.4. Glutación reducido y oxidado

Para evaluar el balance redox de glutación se mezclaron dos volúmenes del SN₁ con un volumen de ácido sulfosalicílico al 10% y se centrifugó a 5.000 g durante 5 min. Estos sobrenadantes (SN₂) fueron utilizados inmediatamente en la evaluación de glutación total y GSSG. Para la determinación de GSSG se realizó previamente una derivatización de manera de enmascarar el GSH. Con esta finalidad, a una alícuota de 100 µL del SN₂ se le añadió 3 µl de 2-vinilpiridina, 5 µL de TAE y se incubó a 30 °C por 1 h. De esta manera obtenemos los SN₃.

Para determinar los niveles de glutación total en los SN₂ y de GSSG en los SN₃ se utilizó el método descrito por Tietze en 1969 [116] con ligeras modificaciones. Para ello, 2 µl de SN₂, 20 µl de SN₃ o 5 µl de testigo (GSH 50 µg/ml) se mezclaron con β-NADPH 0,21 mM y DTNB 0,6 mM en *buffer* (pH= 7,5; Na₂HPO₄ 125 mM; EDTA 6,3 mM). Se midió absorbancia a 412 nm durante 90 s y la pendiente de dicha curva se utilizó para estimar el valor de glutación total o GSSG según corresponda. El contenido de GSH se calculó como la diferencia entre glutación total y GSSG. Se determinaron el cociente GSSG/GSH y el valor de GSSG por mg de proteína del SN₁ como indicadores del estrés oxidativo.

3.2.7. Cuantificación de citoquinas

Alícuotas de mucosa de la fracción 2 se homogeneizaron en PBS (1:3 p/V) y se sonicaron 6 veces durante 20 s con un ultrasonifier Sonics Vibra células VCX 130 (Newtown, CT, EE.UU.). Luego se centrifugaron a 15.000 g por 10 min a 4 °C y los

sobrenadantes se utilizaron para la cuantificación de citoquinas mediante la utilización de *kits* de ELISA comerciales: *Rat IL-1 beta Tissue Culture ELISA Ready-SET-Go!* (88-6010, Affymetrix) y *Rat Interleukin-6 ELISA Kit* (KRC0062, BioSource International). Las mediciones fueron realizadas según protocolo del fabricante y se relativizaron al contenido de proteína de los homogenados, determinados mediante el método de Lowry.

3.2.8. Fraccionamiento de células intestinales

Con la finalidad de caracterizar el efecto del GLP-2 sobre la expresión de Mrp2 y producción de AMPc, se utilizó el modelo del enterocito aislado con algunas modificaciones [117]. Este método asegura la preservación de la integridad estructural y bioquímica de las células. Se fraccionaron células del extremo de la vellosidad (fracción T), en los cuales Mrp2 tiene una alta expresión y los enterocitos se encuentran diferenciados. Luego se separaron células de la región media de la vellosidad (fracción M). Para aislar ambas fracciones, una alícuota de yeyuno proximal se evertió y se cortó en secciones pequeñas. Los fragmentos se colocaron en solución salina de Hank oxigenada (KCl 400 mg/L; KH₂PO₄ 60 mg/L; NaCl 8 mg/ml; NaHCO₃ 350 mg/L; Na₂HPO₄ 48 mg/L; D-glucosa 1 mg/ml), conteniendo DTT 0,5 mM y se agitaron en hielo durante 5 min. Luego se transfirieron a un *buffer* quelante de calcio oxigenado (Na-citrato 27 mM; Na₂HPO₄ 5 mM; NaCl 96 mM; KH₂PO₄ 8 mM; KCl 1,5 mM; D-sorbitol 20 mM; sacarosa 20 mM; glutamina 2 mM; DTT 1,5 mM, pH=7,40) y se agitaron en hielo durante 10 min, obteniendo así la fracción T (Figura 3.5). Las secciones de tejido restantes se transfirieron a *buffer* quelante nuevo y se agitaron en hielo durante 15 min para obtener la fracción M (Figura 3.5). Los enterocitos de ambas extracciones se recogieron por centrifugación (1000 g, 6 min a 4 °C) y se lavaron dos

veces con PBS 1X. A todas las soluciones utilizadas se les agregó IBMX (un inhibidor de la fosfodiesterasa) 100 μM e inhibidores de proteasas (PMSF 0,1 μM y pepstatina A 35 nM). La eficacia de cada etapa del procedimiento se determinó mediante la examinación del tejido por tinción con hematoxilina-eosina, confirmándose que se extrajeron solamente porciones superiores y medias de la vellosidad (Figura 3.5). Estas fracciones se utilizaron para la evaluación de la expresión de Mrp2 y villina en fracciones de BBM (preparadas como se indica en la sección 3.2.4) y para la determinación de los niveles de AMPc celular.

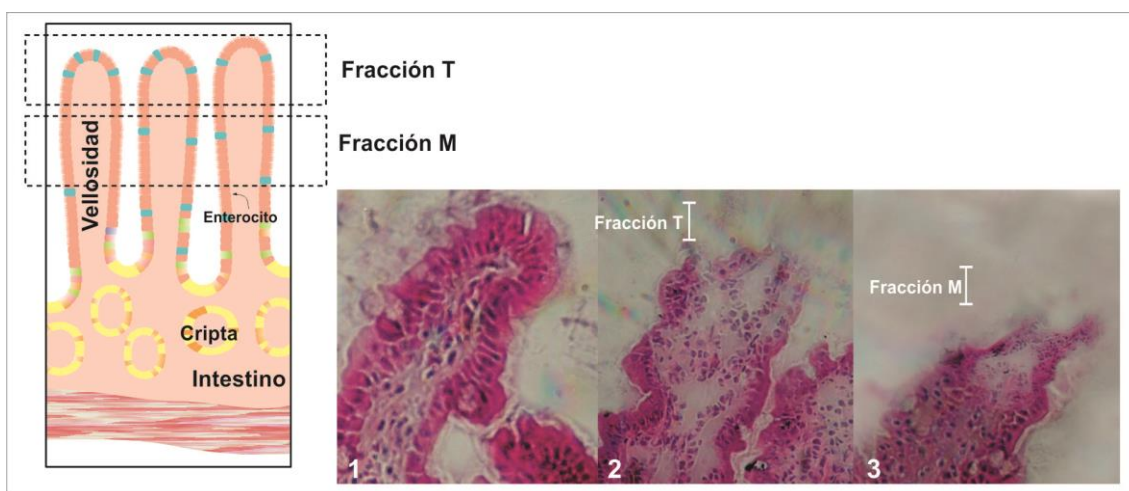


Figura 3.5: Fraccionamiento de células de la mucosa intestinal. El esquema representa las vellosidades intestinales y se señalan las secciones transversales de las mismas a las cuales corresponden las fracciones T y M. La imagen 1 corresponde al tejido intestinal intacto, previo a la incubación en *buffer* Hank. La imagen 2 corresponde al tejido luego de la primera incubación en *buffer* quelante, la punta de la vellosidad se encuentra ausente y corresponde a la fracción T que se recolecta en el *buffer*. La imagen 3 corresponde al tejido intestinal luego de la segunda incubación en *buffer* quelante. En este caso se observa una mayor fracción de la vellosidad ausente, sección correspondiente a la fracción M.

3.2.9. Caracterización de subpoblaciones de enterocitos

Con la finalidad de caracterizar las subpoblaciones de enterocitos aislados se analizaron distintos parámetros funcionales.

3.2.9.1. Actividad fosfatasa alcalina

La enzima fosfatasa alcalina se expresa principalmente en enterocitos maduros por lo que su actividad es mayor en la punta de la vellosidad. La actividad se determinó utilizando el *kit* ALP 405 cinética optimizada (*Wiener lab*) siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones. Se utilizó 1 ml del reactivo reconstituido, se agregaron 10 µg de proteína por muestra y se midió absorbancia a 405 nm durante 90 min a 37 °C. La pendiente de la curva se utilizó para calcular la actividad como indica el fabricante.

3.2.9.2. Actividad sacarasa-isomaltasa

Al igual que la fosfatasa alcalina, la sacarasa-isomaltasa se expresa principalmente en el extremo de la vellosidad, donde se encuentran los enterocitos maduros. La actividad sacarasa-isomaltasa se determinó como lo indica Walsh et al., (2003) [118] mediante el agregado de 10 µl de la fracción de células aisladas a 1 ml de *buffer* fosfato 50 mM conteniendo sacarosa 28 mM. La mezcla se incubó a 37 °C durante 1 h y luego se determinó la cantidad de glucosa producida mediante el método de la glucosa oxidasa utilizando el *kit* Glicemia enzimática AA (*Wiener lab*). La cantidad de glucosa se calculó por comparación con un estándar de glucosa y se normalizó a la cantidad de proteína en la fracción de enterocitos aislados.

3.2.9.3. Expresión de cromogranina A

La cromogranina A es un marcador establecido de células endócrinas por lo cual se utilizó para detectar células endócrinas en las fracciones celulares. Se realizó una RT-PCR para cromogranina A. La extracción de ARN total y la reacción de retrotranscripción se llevaron a cabo como se describe en las secciones 3.4.3 y 3.4.4.

Para la reacción de PCR se utilizó una temperatura de anillado de 58 °C durante 26 ciclos [118]. Se utilizaron los oligonucleótidos específicos: GAGGGTCCTCTCCATCCTTC (directo); CGCCTTCTCCTCTTTCTCCT (reverso) y los valores obtenidos se normalizaron al valor obtenido para la expresión de β -actina, utilizando los oligonucleótidos: CAACCTTCTTGCAGCTCCTC (directo); TTCTGACCCATACCCACCAT (reverso).

3.3. Experimentos en la línea celular Caco-2

3.3.1. Mantenimiento

Las células Caco-2 se obtuvieron de la *American Type Culture Collection* (ATTC, Manassas, VA, EE.UU.) y se mantuvieron en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37 °C en el siguiente medio de crecimiento: DMEM (*Gibco*); suero fetal bovino 10% (v/v) (*Natocor*; Cordoba, Argentina); aminoácidos no esenciales 1% (v/v) (*Gibco*); L-glutamina 1% (v/v) (*Gibco*); Estreptomicina/Penicilina 1% (v/v) (*Gibco*) y Anfotericina 6 ng/ml B. El medio se renovó 3 veces por semana. Las células se repicaron cuando alcanzaron 70-80% de confluencia utilizando Tripsina/EDTA 0,25% (*Gibco*).

3.3.2. Cultivo y tratamientos

Para los estudios de cuantificación de proteínas y niveles de ARNm se sembraron 250.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos y se cultivaron durante 14 días hasta que las mismas confluyeron y se diferenciaron. Luego el medio se reemplazó por medio fresco conteniendo 1, 10 ó 100 μ M del análogo permeable de AMPc, db-AMPc. El tiempo de tratamiento fue de 48 h para los ensayos de inmunocuantificación y actividad de MRP2 y de 3 h para los ensayos de RT-qPCR. En tratamientos con

inhibidores de la proteína quinasa A (PKA) se agregaron 1 μ M de KT5720 ó 10 μ M de H89, 30 min antes del agregado de db-AMPC. Los tratamientos con IL-1 β se realizaron en un soporte permeable (*Polycarbonate Membrane Transwell[®] Inserts*, Cat. 3412, Corning) en placas de 6 pocillos. Se colocó IL-1 β en el compartimiento basolateral a una concentración de 1, 10 ó 100 ng/ml durante 24 h para estudios de inmunocuantificación y 10 ng/ml durante 30 min para estudios de localización por microscopia confocal. En el compartimiento apical se colocó medio fresco en todos los casos. La acción de Act D, un inhibidor de la ARN polimerasa, se evaluó a través del pretratamiento de las células durante 30 min a una concentración de 5 mg/ml. Adicionalmente a los experimentos con db-AMPC, se utilizó forskolina, un activador de la adenilato ciclasa para confirmar el rol de AMPc generado en forma endógena. Se trataron las células con 0,1; 1 ó 10 μ M de forskolina durante 48 h para análisis de MRP2 y 20 min para cuantificación de los niveles de AMPc. Para los estudios de cuantificación de factores de transcripción e inmunoprecipitación, las células fueron tratadas con 10 μ M de db-AMPC durante 60 min. Para la determinación de sus niveles de fosforilación fueron tratadas durante 30 min. En el caso de los ensayos que incluyeron KT5720, los pretratamientos se realizaron como se describió anteriormente.

Todos los reactivos fueron disueltos en DMSO, a excepción de IL-1 β que fue disuelto en agua Milli-Q estéril. Las células utilizadas como grupo control fueron tratadas con DMSO solamente, el cual se mantuvo siempre a una concentración final menor a 0,1% (v/v).

Para realizar estudios por microscopía confocal, se colocó previamente un cubreobjetos estéril en cada pocillo de la placa sobre los que se sembraron 250.000 células y se crecieron de la manera habitual. Luego de 14 días en cultivo, las células ya diferenciadas, se sometieron al tratamiento con db-AMPC 10 μ M durante 48 h. En el

caso del estudio por microscopía confocal realizado luego del tratamiento con IL-1 β durante 30 min, la tinción se realizó directamente sobre el soporte permeable.

3.3.3. Medidas de viabilidad celular

Se evaluó el efecto de los tratamientos realizados durante el transcurso de esta Tesis sobre la viabilidad de las células. Para ello, se utilizó el método basado en la capacidad de las células viables de reducir el MTT a formazán, ya que poseen la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa activa. En cambio las células muertas han perdido dicha actividad.

En placas de 96 pocillos se sembraron 8.500 células por pocillo, se cultivaron durante 14 días y luego se sometieron al tratamiento correspondiente. Una vez finalizado el tiempo de tratamiento, se retiró el medio de tratamiento y se agregó medio fresco conteniendo 0,5 g/l de MTT. Luego de 2 h de incubación (37 °C; 5% CO₂) se cambió el medio por 200 μ l de DMSO para disolver el precipitado de formazán. Se realizaron medidas de absorbancia a 530 y 630 nm (LD400, Beckman-Coulter). Finalmente se calcularon los cocientes Abs530/Abs630 y se compararon con los obtenidos para células no tratadas.

3.3.4. Procesamiento de las células

Finalizados los tratamientos, las células se lavaron dos veces con PBS 1X frío, y se obtuvieron los lisados celulares totales, membranas celulares totales (MCT) o ARN total.

3.3.5. Obtención de lisados celulares totales

Para la obtención de los lisados celulares totales, las células se lisaron en *buffer* RIPA (Thermo Scientific Pierce Inc. Illinois, EE.UU) suplementado con inhibidores de proteasas (leupeptina 5 mg/ml, PMSF 1mM y Pepstatina A 5 µg/ml). El lisado se sometió a 20 pasajes a través de una jeringa de 1,0 ml y aguja de 25G para permitir una mejor homogenización del mismo. Estas muestras se utilizaron para la detección de los factores de transcripción por ensayos de inmunocuantificación, previa cuantificación de las proteínas por el método de Sedmak-Grossberg.

3.3.6. Obtención de membranas celulares totales

Para la determinación de la expresión proteica de MRP2 se utilizaron fracciones de MCT. Para obtener dicha fracción las células se levantaron en 1 ml de sacarosa 0,3 M, conteniendo leupeptina 5 mg/ml, PMSF 1mM y Pepstatina A 5 µg/ml y se lisaron por sonicación con 3 pulsos (30% de amplitud) de 5 s cada uno, separados por intervalos de 10 s, manteniendo las muestras en hielo constantemente. Los lisados se centrifugaron a 500 g a 4 °C durante 5 min. Los sobrenadantes se centrifugaron a 56.000 rpm a 4 °C durante 1 h. Los *pellets*, que contienen la fracción de MCT, se resuspendieron en 100 µl de sacarosa 0,3 M (conteniendo inhibidores de proteasas).

3.3.7. Medidas de actividad de MRP2

La actividad de MRP2 se evaluó a través de la determinación de la cantidad de DNP-SG transportado por células Caco-2 hacia el medio de cultivo [119], [120]. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 8.500 células por pocillo y se cultivaron durante 14 días. Luego de tratar las células con db-AMPC 10 µM, el medio fue reemplazado por medio fresco conteniendo CDNB 0,5 mM. Las

células se incubaron a 10 °C por 30 min para permitir que el CDNB difunda en forma pasiva hacia el citosol. En esta condición, la mayoría de la conversión de CDNB a DNP-SG es espontánea, es decir, independiente de la actividad de la glutatión S-transferasa [121]. Después de la incubación se extrajo el medio y las células rápidamente se lavaron dos veces con PBS 1X frío. Para evaluar la tasa de secreción de DNP-SG, las células se incubaron con solución salina de Hank a 37 °C durante 60 min. Al final de las incubaciones, se centrifugaron alícuotas de medio (3 min, 300 g, 4 °C), los sobrenadantes fueron tratados con ácido perclórico 10% v/v y centrifugados (2 min, 14.000 g, 4 °C). Estos sobrenadantes se utilizaron en la detección de DNP-SG por HPLC (como se describe en sección 3.2.5.1). Este ensayo fue realizado en presencia o ausencia de Pro (1 mM), para confirmar la participación de MRP2 [122].

3.3.8. Ensayo de co-inmunoprecipitación

Para determinar la posible interacción entre los factores de transcripción ATF-2 y c-JUN, se utilizó la técnica de inmunoprecipitación. Esta técnica consiste en precipitar el complejo mediante la interacción con un anticuerpo específico para una de las dos proteínas y luego detectar, por inmunocuantificación, el otro factor de transcripción del presunto complejo. Brevemente, una vez terminado el tratamiento de 30 min con db-AMPC, las células se lavaron y recolectaron en *buffer* de lavado 1 (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, Nonidet P40 1%, deoxicolato de sodio 0,5%). Luego se disgregaron por sonicación y se eliminaron aquellas proteínas que se unen en forma inespecífica a la matriz, por el agregado de agarosa-proteína A (Roche). Una vez descartada la matriz con las proteínas inespecíficas, se agregó el anticuerpo con el cual se desea precipitar la proteína de interés (anti-ATF-2 o anti-c-JUN, Tabla 3.2). Como control negativo se utilizó IgG normal de conejo. Después se agregó la matriz de agarosa-proteína A para

precipitar el complejo anticuerpo-proteína. Los complejos recuperados se lavaron primero con *buffer* de lavado 1 y luego con *buffer* de lavado 2 (Tris 50 mM, NaCl 500 mM, Nonidet P40 0,1%, deoxicolato de sodio 0,05%). Finalmente se resuspendieron en *buffer* de siembra (sección 3.4.2) y se calentaron para desnaturalizar los complejos y eliminar la matriz. Se procedió a realizar una inmunocuantificación (sección 3.4.2) revelando con el anticuerpo contrario al utilizado en la inmunoprecipitación y con el mismo anticuerpo como control de eficiencia de la inmunoprecipitación.

3.3.9. Análisis *in silico* de la región promotora de *MRP2*

Se realizó un análisis *in silico* de la región promotora proximal comprendida entre las bases -1090 y -1 (Figura 3.5) desde el sitio de inicio de la transcripción del gen *MRP2* humano. Con la finalidad de realizar este análisis se utilizó la base de datos *TFSearch database* (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>).

3.3.10. Ensayos de transfección y estudio del promotor del gen *MRP2*

La región (-789/-603) del promotor de *MRP2* se amplificó por PCR usando los oligonucleótidos 1 y 2 (Figura 3.6). La reacción de PCR se mantuvo por 35 ciclos con el siguiente régimen: 30 s a 95 °C, 30 s a 60 °C y 1 min a 72 °C. Luego se ligó al plásmido pGL3 *promoter vector* (Promega) digerido con la enzima *SmaI* (Figura 3.6). La orientación del inserto se evaluó por secuenciación de ADN (Maine University). Las células Caco-2 se cultivaron durante 14 días en placas de 6 pocillos. A este tiempo se transfectaron con 1 µg del constructo (formado por el promotor de *MRP2* y el vector conteniendo el gen reportero de la luciferasa *luc*⁺) usando el método de liposomas (Lipofectamine 3000, *Invitrogen*). Luego de 24 h de la transfección, las células se trataron con db-AMPC 10 µM durante 24 h adicionales. Las medidas de actividad

luciferasa se realizaron con *Promega assay systems*, como recomienda el fabricante y las medidas de luminiscencia se realizaron utilizando *Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader* (BioTek). La concentración de proteínas se midió por el método de Sedmak y Grossberg y la actividad luciferasa se normalizó a la concentración de proteínas.

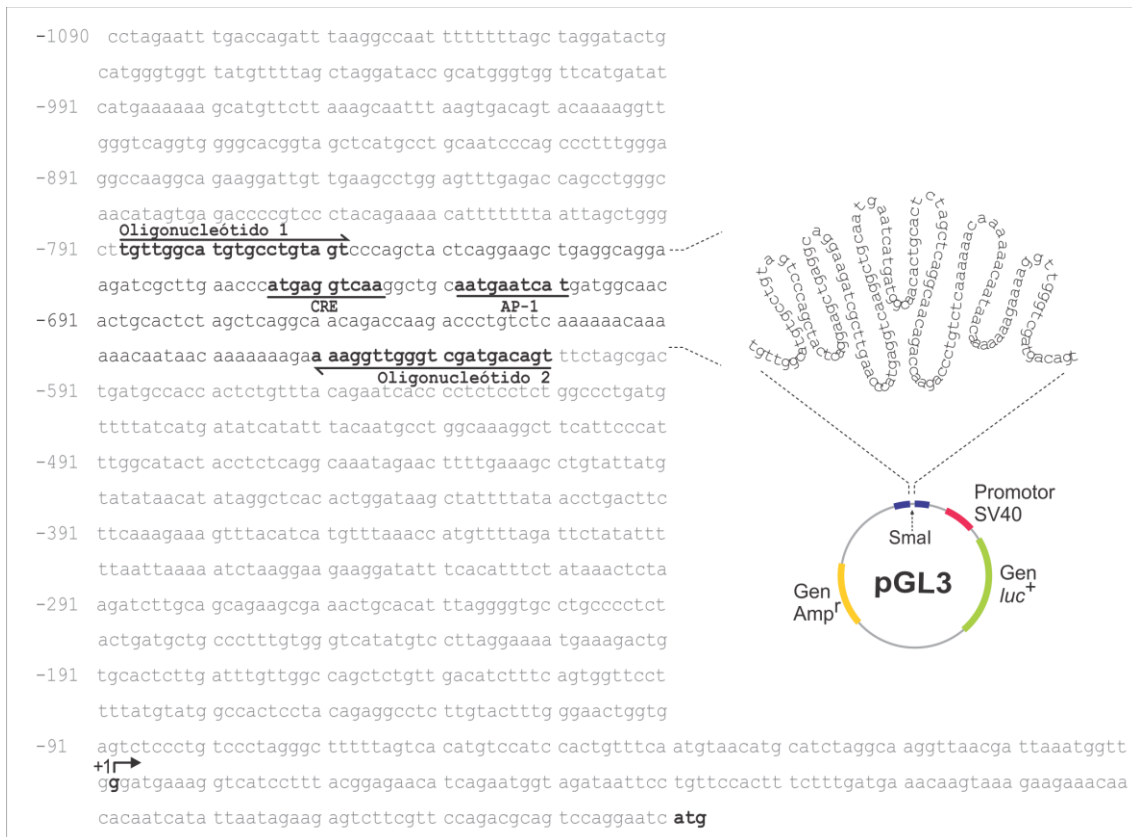


Figura 3.6: Región promotora proximal del gen *MRP2* humano y construcción en el plásmido pGL3. Se detalla la secuencia de la región promotora del gen *MRP2* humano analizada mediante análisis *in silico* con la base de datos *TFsearch*. Se señalan los oligonucleótidos utilizados para amplificar la región (-789/-603) que contienen los sitios putativos de unión a factores de transcripción AP-1 y CRE. Esta región se insertó en el plásmido pGL3 (Promega) digerido con la enzima *SmaI*. Este plásmido contiene el gen reportero que codifica para la enzima luciferasa bajo el control del promotor del SV40.

3.3.11. Ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

Luego de tratar las células con db-AMPC 10 μ M durante 24 h, se agregó formaldehído 1% (37 °C, 10 min) para fijar las interacciones intermoleculares. El ensayo de ChIP se realizó de acuerdo al protocolo del fabricante (Upstate Biotech, NY)

usando anticuerpos de conejo con especificidad para c-JUN o ATF2, (Tabla 3.2) o IgG normal de conejo (SC-2027) como control negativo. Se utilizó una alícuota de 20 µl de cada uno de los lisados como control de la muestra de partida (*input*). El ADN se purificó por extracción con fenol/cloroformo y se precipitó con etanol. La región del promotor de *MRP2* humano comprendida entre -789 y -603 pb desde el sitio de inicio de la transcripción (Figura 3.5) se amplificó como se indica en la sección 3.3.10. Esta región incluye sitios de unión putativos para los factores de transcripción AP-1 y CREB, con los cuales podrían interactuar c-JUN y ATF-2.

3.3.12. Ensayo de sobreexpresión de c-JUN

Con la finalidad de sobreexpresar c-JUN en la línea celular Caco-2 se procedió como se describe en Ruiz et al., (2013) [123]. Brevemente, los plásmidos se purificaron utilizando el *kit Wizard Miniprep* (Promega). Las células se crecieron como se describió en la sección 3.3.1 y se co-transfectaron con un plásmido conteniendo c-JUN y otro conteniendo GFP (como control de la eficiencia de transfección) [124] utilizando *Lipofectamine 3000* (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego se incubaron las células con db-AMPC 10 µM durante 24 h. Finalmente, se detectó c-JUN por inmunocuantificación (sección 3.4.2) de lisados celulares totales y ARNm de *MRP2* por RT-qPCR (sección 3.4.5).

3.4. Técnicas de uso general

3.4.1. Cuantificación de proteínas

3.4.1.1. Método de Sedmak y Grossberg

Se determinó la concentración de proteínas utilizando el método colorimétrico de Sedmak y Grossberg [125]. En todos los casos se usaron 2 µl de muestra, 98 µl de agua

destilada y 100 µl de reactivo. Luego de 5 min de incubación a temperatura ambiente se midió la absorbancia a 620 nm y 465 nm y se calculó la relación Abs620/Abs465. Se realizó además una curva de calibración con albúmina sérica bovina (BSA) en la cual se graficó Abs620/Abs465 en función de la masa en µg de BSA. Los µg de proteínas de cada muestra se estimaron por interpolación del valor de la relación Abs620/Abs465 obtenida para la misma.

3.4.1.2. Método de Lowry

En aquellos casos en los que la concentración de proteínas no se encontraba comprendida en el rango de linealidad del método de Sedmak-Grossberg, se utilizó el método de Lowry [126]. En todos los casos se usaron 2 µl de muestra, 140 µl de agua destilada, 500 µl de reactivo C: 50 ml de Na₂CO₃ (2%) en NaOH 0,1 N; 0,5 ml de CuSO₄ (1%); 0,5 ml de tartrato (2%) y 50 µl de una dilución al tercio del reactivo de Folin-Coltreau. Luego de 45 min de incubación a temperatura ambiente se midió la absorbancia a 660 nm. Se realizó además una curva de calibración con BSA en la cual se graficó Abs660 en función de la masa en µg de BSA. Los µg de proteínas de cada muestra se estimaron por interpolación del valor de Abs660 obtenida para la misma.

3.4.2. Inmunocuantificación de proteínas

Las corridas electroforéticas se llevaron a cabo según la técnica descrita por Laemmli en 1970 [127]. Las separaciones electroforéticas se realizaron en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) en concentraciones del 8% ó 12% (p/v), dependiendo del peso molecular de las proteínas a analizar. Las composiciones de los geles se detallan en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1: Composición de los geles de separación y de concentración utilizados en SDS-PAGE.

	Gel separación 8%	Gel separación 12%	Gel de concentración
Tris/HCl 1,5M, pH=8,80	1,05 ml	1,05 ml	-
Tris/HCl 1,5M, pH=6,80	-	-	0,5 ml
SDS 10%	42 µl	42 µl	40 µl
Acrilamida/Bis 30%	1,1 ml	1,7 ml	0,4 ml
H₂O	1,9 ml	1,3 ml	2,45 ml
TEMED	2,1 µl	2,1 µl	3 µl
Persulfato de amonio 10%	63 µl	63 µl	60 µl

Las muestras a sembrar se prepararon en un *buffer* de siembra conteniendo Tris/HCl 1 M, pH=6,80; SDS 10% (p/v); azul de bromofenol 0,005% (p/v); glicerol 10% (p/v); H₂O y DTT 10% (v/v). Los volúmenes de muestra sembrados correspondieron a 10 µg de proteínas totales a menos que se indique lo contrario.

Los geles se corrieron en un *buffer* Laemmli (glicina 0,2 M; Tris 25 mM; SDS 0,1% (p/v)) y se sometieron a electroforesis utilizando un equipo comercial (Mini-PROTEAN 3 Cell, Bio-Rad, California, EE.UU.) a un voltaje de 110 V durante 15 min, luego de lo cual se aplicaron 150 V hasta completar la corrida. Una vez finalizada la corrida electroforética, se realizó la transferencia a membranas de polivinil difluoruro (Hybond_{TM}-ECL_{TM}, Amersham Biosciences, California, EE.UU.). La transferencia se realizó en un *buffer* de transferencia (Tris 20 mM, glicina 150 mM, SDS 0,03% (p/v), metanol 20% (v/v)), durante 70 min a una corriente constante de 36 mA y a 4 °C. Para tal fin se utilizó un equipo comercial *MiniTrans-Blot Cell* (Bio-Rad, California, EE.UU.)

Una vez finalizada la transferencia, las membranas se bloquearon durante 1 h en: PBS 1X; Tween-20 0,3% (v/v); 10% (p/v) de leche en polvo descremada. Luego se realizaron 4 lavados de 5 min cada uno con *buffer* de lavado (PBS 1X; Tween-20 0,3% (v/v)) y se incubó con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4 °C. Luego, se realizaron 4 lavados de 5 min y se incubaron, durante 1 h a temperatura ambiente, con

el correspondiente anticuerpo secundario. Finalmente se realizaron 4 lavados de 5 min y se realizó el revelado usando un reactivo quimioluminiscente (ECL, Thermo Scientific Pierce Inc. Illinois, EE.UU). La cuantificación de las bandas correspondientes se realizó por densitometría, utilizando el programa *Gel Pro Analyzer* (Media Cybernetics, Silver Spring, EE.UU.). Como control de carga se detectó la proteína β -actina o villina y se controló la transferencia por tinción con el colorante rojo Ponceau S para visualizar las proteínas transferidas.

Los anticuerpos primarios utilizados para la técnica de inmunocuantificación en esta Tesis se detallan en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2: Anticuerpos utilizados en esta Tesis.

Anticuerpo anti-	Marca	Catálogo	Secundario
MRP2 (*)	Alexis <i>Biochemicals</i> , California, USA	ALX-801-016	Ratón
P-gp (*)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	SC-8313	Conejo
β-ACTINA (*)	Sigma Aldrich Co	A-2228	Ratón
VILLINA (*)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	SC-28283	Conejo
c-JUN	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	SC-1694	Conejo
p-cJUN	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	SC-7981	Conejo
ATF-2	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	SC-187	Conejo
p-ATF-2	Sigma Aldrich Co	A-4095	Ratón
cFOS	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	SC-54	Ratón
p-cFOS	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	SC-130181	Conejo
CREB	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	SC-186	Conejo
p-CREB	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	SC-7978	Cabra

Los anticuerpos presentados en esta tabla fueron generados contra proteínas humanas, aquellos señalados con (*) presentan reactividad cruzada con el correspondiente homólogo de rata.

Los anticuerpos secundarios utilizados en esta Tesis fueron:

Anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rabanita (31458; Thermo Scientific).

Anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rabanita (0031430; Thermo Scientific).

Anti-IgG de cabra conjugado con peroxidasa de rabanita (SC-2056; Santa Cruz Biotechnology, Inc.).

3.4.3. Aislamiento de ARN total

La extracción de ARN proveniente de intestino de animales y de células Caco-2 se realizó utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen, California, EE.UU.) con materiales libres de RNasa. Las muestras de intestino (10 mg) inmediatamente después de ser descongeladas se sumergieron en 1 ml de reactivo TRIzol y se homogenizaron con un émbolo y camisa de vidrio. Las células Caco-2 adheridas se lavaron con PBS 1X y se les agregó 1 ml de reactivo TRIzol, se levantaron por raspado y se homogenizaron con pipeta. En ambos casos los homogenados obtenidos se incubaron 5 min a temperatura ambiente y a continuación se agregaron 200 µl de cloroformo y se mezcló vigorosamente por inversión durante 15 s. La mezcla se incubó durante 3 min a temperatura ambiente, y posteriormente se centrifugó a 12.000 g durante 15 min a 4 °C. La fase acuosa superior se transfirió a un tubo de microcentrífuga y se precipitó el ARN mediante el agregado de 500 µl de isopropanol incubando durante 10 min a temperatura ambiente. Para la obtención del *pellet* de ARN se centrifugaron las muestras durante 10 min a 12.000 g a 4 °C. El *pellet* obtenido se lavó con 1 ml de etanol frío 70% (v/v) invirtiendo suavemente el tubo hasta lograr que se desprege del fondo y luego se centrifugaron las muestras a 7.500 g a 4 °C, durante 5 min. Una vez finalizados los lavados, el precipitado de ARN se secó durante unos minutos a temperatura ambiente dejando abierto el tubo y finalmente se resuspendieron los ARN en 20 µl de agua libre de RNasa para las muestras de Caco-2 y 40 µl para las de intestino.

La concentración y pureza de los ARN obtenidos se determinó espectrofotométricamente. Se realizaron diluciones de las muestras y se midió absorbancia a $\lambda = 260$ y 280 nm. Para determinar la concentración del ARN se consideró que a una muestra de 40 µg/ml de ARN le corresponde una unidad de

absorbancia a $\lambda = 260$ nm. Por otro lado, una relación Abs₂₆₀/Abs₂₈₀ entre 1,7 y 2,1 indica que la preparación contiene baja proporción de contaminantes proteicos.

Se evaluó además la calidad del ARN extraído analizando la separación de moléculas de ARN por electroforesis en geles de agarosa mediante el sistema tipo submarino [128]. Se preparó un gel de agarosa 1,5% (p/v) en *buffer* TAE 1X (a partir de una solución 50X de composición: Tris-Acetato 2 M y EDTA 50 mM, pH=8,00) con el agregado de SYBR Safe (Thermo Scientific). El gel se sumergió en *buffer* TAE 1X y se sembraron las muestras mezcladas en una proporción 6:1 con solución de siembra 6X (Azul de bromofenol 0,25% (p/v), *Xilene cyanol* 0,25% (p/v) y glicerol 30% (v/v)). La corrida se llevó a cabo a voltaje constante de 100 V y las bandas de ARN se visualizaron por fluorescencia en un transiluminador de luz ultravioleta para evaluar la integridad de los ARN obtenidos. Todas las soluciones fueron preparadas y el material utilizado lavado con agua destilada libre de RNasa.

3.4.4. Reacción de retrotranscripción

La síntesis del ADNc a partir del ARN total se llevó a cabo utilizando la enzima SuperScript III RT (Invitrogen). Como primera medida se mezcló 1 μ g de ARN total con 5 ng de *Random Primers* (Invitrogen), dNTP 0,5 mM y se llevó a un volumen final de 13,5 μ l con agua libre de RNasa. Esta mezcla se incubó durante 5 min a 65 °C y a continuación en hielo durante al menos 1 min. Luego se adicionaron a cada tubo 4 μ l de *5X First Strand Buffer* (Invitrogen), 1 μ l de 0,1 M de DTT (Invitrogen), 1 μ l de *RNase OUT Recombinant Ribonuclease inhibitor* (Invitrogen) y 100 U de *SuperScript III Reversetranscriptase* (Invitrogen). Se mezcló con micropipeta y se incubó la mezcla 5 min a 25 °C, 50 min a 60 °C y finalmente se inactivó la enzima llevando la mezcla a 70 °C durante 15 min. El ADNc utilizado en las reacciones de amplificación se diluyó 10

veces en agua Milli-Q para las muestras provenientes de Caco-2 y 5 veces para las muestras de intestino.

3.4.5. PCR cuantitativa en tiempo real

Las reacciones se llevaron a cabo en un equipo de qPCR Stratagene Mx3000P (Stratagene, La Jolla, CA) en microtubos apropiados. Para determinar el perfil de amplificación durante la PCR se utilizó el colorante fluorescente *SYBR Green I* (Invitrogen).

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones. Para un volumen final de reacción de 20 µl se adicionó a cada tubo: 2 µl de 10X PCR *Buffer* (Invitrogen); 3 mM de MgCl₂; 0,2 mM de dNTP; 5 µl de la dilución de ADNc; 0,1 µl de *PlatinumTaq DNA Polymerase* (Invitrogen); 10 pmoles de cada oligonucleótido (Tabla 3.3) y 0,8 µl de una dilución 1/100 de *SYBR Green I* (Invitrogen). El volumen se completó con agua Milli-Q estéril. Como control negativo se preparó un tubo de reacción en el cual se agregaron los mismos componentes en las mismas condiciones pero en lugar de utilizar ADNc como molde se agregó agua Milli-Q estéril.

Los ciclos de reacción se llevaron a cabo de acuerdo al gen a analizar (Tabla 3.3).

Tabla 3.3: Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes en estudio y condiciones de la reacción de PCR.

Gen	Oligonucleótido		Programa de amplificación			
	Directo	Reverso	Desnaturalización	Anillado	Elongación	Ciclos
mrp2 (R)	acctccacgtagtgatcct	acctgctaagatggacggtc	95 °C (15s)	57 °C (30 s)	72 °C (40s)	40
mdr1a (R)	gaggcttgcaaccagcatt	ctgttctgcccgtggattt	95 °C (15s)	50 °C (30 s)	72 °C (30s)	40
18S (R)	gtaaccctggaacccatt	ccatccaatcggtagtagcg	95 °C (15s)	55 °C (30s)	72 °C (30s)	40
MRP2 (H)	ccaagacaacagctgaaa	tacttggtggcacataaac	95 °C (15s)	54 °C (30s)	72 °C (30s)	40
18S (H)	cgccgctagaggtgaaattc	ttggcaaatgcttcgctc	95 °C (15s)	54 °C (30s)	72 °C (30s)	40

(R) y (H) indican la especie, rata y humano respectivamente. La lectura se realizó durante la etapa de elongación. En todos los casos se incluyó un ciclo previo de desnaturalización de 95 °C durante 2 min y un ciclo final de determinación de la temperatura de fusión de los productos de amplificación, que permite determinar la especificidad de la reacción.

En cada caso, la primera vez que se utilizó un par de oligonucleótidos, se analizó el producto de la reacción de amplificación en un gel de agarosa 1,5% para confirmar la especificidad de la reacción, observándose en todos los casos los productos del tamaño esperado.

La cuantificación relativa de los niveles de expresión génica de los distintos genes estudiados en los ADNc obtenidos se llevó a cabo mediante la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) según el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [129]. En todas las muestras, la cuantificación de los ADNc blanco se normalizó con ARNr 18S ($Ct_{\text{blanco}} - Ct_{\text{ARNr 18S}} = \Delta Ct$) y los posibles cambios en la expresión de cada ADNc blanco en los grupos tratados fueron normalizados respecto de esa misma relación para cada grupo control ($\Delta Ct_{\text{tratado}} - \Delta Ct_{\text{control}} = \Delta\Delta Ct$). El cambio expresado en número de veces se obtuvo elevando 2 a la potencia $-\Delta\Delta Ct$ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Finalmente, los resultados obtenidos se expresaron como porcentaje referidos al control.

3.4.6. Cuantificación de AMPc

Los niveles de AMPc se determinaron en mucosa de yeyuno proximal, en fracciones T y M de enterocitos aislados y en células Caco-2.

Para determinar los niveles de AMPc en mucosa intestinal, se tomaron alícuotas de 50 mg de mucosa congelada en nitrógeno líquido y se pulverizaron con un homogenizador manual. Luego se agregó 5 ml PBS para obtener una relación de aprox. 10 mg de mucosa/ml.

Para las determinaciones en suspensiones de enterocitos aislados T y M, los preparados obtenidos según se detalla en la sección 3.2.8 se diluyeron hasta aprox. 5000 células/30 μ l.

En estas muestras los valores de AMPc se determinaron usando *Enzyme Immunoassay System kit* (GE Healthcare), como lo indica el fabricante.

Para las determinaciones en células Caco-2, las mismas se cultivaron en placas de 6 pocillos y luego del tratamiento con forskolina 10 μM durante 20 min, se detuvo la reacción con 1,5 ml de etanol frío durante 1 h. Luego se levantaron las células y se evaporó el etanol. Para la cuantificación se resuspendieron las células en etanol como fue descrito por Davio y col. (1995) [130].

3.4.7. Marcación por inmunofluorescencia

Para detectar la localización celular *in situ* de las proteínas en estudio, se trabajó de distintas maneras según el origen de las muestras. En el caso de los segmentos de intestino, los mismos se lavaron, se congelaron en isopentano previamente enfriado en nitrógeno líquido y se mantuvieron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización. Los segmentos de intestino congelado se cortaron en láminas de 5 μm de espesor con un micrótopo criostático (Zeiss Microm HM500), se colocaron en portaobjetos y luego se fijaron manteniéndolos por 10 min en metanol a -20°C . Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS 1X, pH= 7,4 y se permeabilizó el tejido con PBS 1X, pH= 7,4; TritonX-100 0,03% (v/v); BSA 3% (p/v), durante 15 min. Luego fueron incubadas durante toda la noche a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ con el anticuerpo primario para los transportadores: Mrp2 o P-gp (Tabla 3.2) y para las proteínas de uniones estrechas: zonula occludens (ZO-1) u ocludina (61-7300 y 33-1500; Invitrogene). Luego de realizarse 3 lavados, los portaobjetos se incubaron con anti-IgGs de ratón conjugado con Cy3 y de conejo conjugado con Cy2 (*Jackson ImmunoResearch Laboratory, Inc.*, Pensilvania, EE.UU.), durante 2 h. La tinción de los núcleos se realizó incubando los portaobjetos con 1,5 μM

de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Molecular Probes, CA) durante 5 min, justo antes del último lavado.

En el caso de las células en cultivo, después de realizados los tratamientos, las células crecidas en cubreobjetos o en soportes permeables se lavaron 2 veces con PBS 1X, pH= 7,4 y se fijaron a temperatura ambiente con para-formaldehído al 4% durante 15 min. Se lavaron 3 veces y se sometieron a un proceso de bloqueo y permeabilización, para lo cual se incubaron durante 20 min en una solución de BSA 3% (p/v) y Tritón 0,3% (v/v) en PBS 1X, pH= 7,4. Las células bloqueadas se incubaron con los anticuerpos primarios (para MRP2 y ZO-1) durante 90 min. Luego, se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS 1X, pH= 7,4 y posteriormente se incubaron las células durante 60 min en cámara húmeda con los anticuerpos secundarios mencionados anteriormente. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS 1X, pH= 7,4. Se tiñeron los núcleos con DAPI durante 5 min.

3.4.8. Microscopía confocal y de campo claro

Para asegurar una tinción y captura de imágenes comparables entre controles y tratados, los preparados (células en cultivo y cortes de intestino de rata) y las tinciones se realizaron el mismo día y fueron sujetos a un proceso simultáneo de tinción y análisis microscópico.

Los preparados ya inmunomarcados de células y tejido se montaron con ProLong (Invitrogen). En el caso de las células crecidas en soportes permeables, se cortó la membrana con un bisturí, se colocó sobre un portaobjetos y se cubrieron las células con *ProLong* y un cubreobjetos. La observación se llevó a cabo 24 h después, en un microscopio confocal Nikon C1 Plus equipado con un objetivo Plan Apo NA 1.4 60X.

En el estudio de localización de MRP2 en células Caco-2 tratadas con IL-1 β se recolectaron imágenes cada 0,3 μm en el eje z hasta cubrir 12,6 μm de espesor total. Como resultado, se muestran vistas superior y 3D ortogonal (eje z) de las imágenes en la sección 5.2.1. Sobre 20 imágenes por grupo correspondientes al eje z se realizó un estudio densitométrico utilizando el *Software Fiji* [131] con la finalidad de establecer la distribución de MRP2 con respecto a los núcleos celulares. Para ello se separaron los canales correspondientes a la fluorescencia roja de MRP2 y azul de los núcleos celulares y se evaluó la distribución de la intensidad de fluorescencia a lo largo del eje z. Las áreas totales se relativizaron a un 100% y se calculó la distancia entre el pico máximo de la intensidad de fluorescencia de MRP2 y el del núcleo correspondiente. Se comparó además el valor de intensidad máxima de MRP2 entre ambos grupos. Los resultados se presentan en forma gráfica (sección 5.2.1) alineando la distribución de intensidad de fluorescencia de los núcleos entre los dos grupos estudiados, de forma de evidenciar posibles desplazamientos de la posición de MRP2 en respuesta al tratamiento con IL-1 β .

Adicionalmente, se realizaron cortes de yeyuno proximal (fracción 1, Figuras 3.1 y 3.3) que fueron teñidos con hematoxilina y eosina de manera de observar el estado de las vellosidades. Estos cortes se observaron en un microscopio de campo claro (Axiovert 25, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania).

3.4.9. Estudios estadísticos

En todos los casos, los resultados se analizaron estadísticamente mediante ANOVA seguida de Bonferroni, para comparar más de dos grupos experimentales, o test *t* de *Student*, para comparar sólo dos grupos experimentales. Los resultados fueron

considerados significativamente diferentes en aquellos casos en que el valor de p fue menor a 0,05.

4. RESULTADOS I: GLP-2 previene la alteración de Mrp2 y P-gp intestinales en la endotoxemia experimental

4.1. Protocolo de prevención

4.1.1. Efecto del LPS y GLP-2 sobre la expresión y actividad de Mrp2 y P-gp intestinales

En primer lugar se evaluó la expresión de la proteína Mrp2 intestinal luego del tratamiento con una dosis única de LPS 5 mg/kg p.c. Se observó que el LPS disminuye (-74%) los niveles proteicos de Mrp2 en BBM de rata (Figura 4.1A). Este resultado concuerda con estudios anteriores sobre la alteración de los niveles de ARNm y la actividad de transporte de esta proteína en ratas endotoxémicas [109]. Se confirmó de esta manera el establecimiento de una alteración en la expresión de Mrp2 en el modelo propuesto para el presente trabajo de Tesis.

Por el contrario, se observó que GLP-2 en 7 dosis de 125 µg/kg p.c. produjo un aumento (+60%) de los niveles de Mrp2 en la membrana apical de los enterocitos de rata (Figura 4.1A), lo cual era esperable de acuerdo a lo reportado anteriormente [96].

Es importante destacar que los niveles proteicos de Mrp2 en el grupo tratado con ambos compuestos no difirieron respecto del grupo Control. Esto indica que este protocolo de prevención con GLP-2 logra impedir completamente la disminución de la expresión de Mrp2 en BBM ejercida por LPS (Figura 4.1A).

Se determinaron además los niveles de ARNm de *Mrp2* en estos mismos grupos experimentales. La Figura 4.1B muestra que el ARNm presenta patrones de variación en respuesta a LPS o GLP-2 similares a los observados para la proteína. Dichos resultados sugieren que ambos agentes regulan la expresión de Mrp2, al menos en parte, de manera transcripcional.

En concordancia con los cambios observados en la expresión de Mrp2, el transporte de DNP-SG en sacos intestinales evertidos disminuyó significativamente en los animales tratados con LPS (-48% a los 20 min) y aumentó luego del tratamiento con GLP-2 (+40% a los 20 min), mientras que el tratamiento conjunto con estos 2 compuestos mostró resultados similares al grupo Control (Figuras 4.1C y D). Se utilizó además un inhibidor de proteínas Mrp (MK571) que permitió confirmar la participación de Mrp2 en el transporte de DNP-SG hacia el compartimiento mucoso, excepto para el grupo LPS (Figura 4.1D). Esto indicaría que el transporte remanente de dicho sustrato observado en este grupo es independiente de Mrp2.

Con respecto a la expresión de P-gp y como era de esperar según estudios anteriores [110], el tratamiento con LPS disminuyó los niveles proteicos en un 78% en comparación con las ratas del grupo Control (Figura 4.2A). En contraste con los resultados observados para Mrp2, el tratamiento con GLP-2 no tuvo efecto sobre la expresión de P-gp cuando fue administrado solo. Sin embargo, GLP-2 también fue capaz de prevenir la disminución de la expresión de este transportador inducida por LPS.

En la Figura 4.2B se muestran los niveles de ARNm de *Mdr1a* en los distintos grupos experimentales. En este caso se observaron resultados similares a los obtenidos por inmunocuantificación, a excepción del grupo tratado con ambos compuestos. Este grupo presentó valores que no difirieron significativamente del grupo Control o del grupo LPS, sugiriendo que el mecanismo de protección podría ser, al menos en parte, postranscripcional.

Los estudios de actividad de P-gp en sacos intestinales evertidos se correlacionan bien con los estudios de expresión de la proteína. Como se muestra en las Figuras 4.2C y D, el LPS indujo una disminución en el transporte de R123 desde el compartimiento

seroso al mucoso (-41% a los 30 min), mientras que no se observaron diferencias en el grupo GLP-2 o LPS+GLP-2 comparado con el grupo Control. La Figura 4.2D muestra una disminución en la actividad de transporte después de la adición del inhibidor específico de P-gp, PSC833, lo cual confirma la participación de esta proteína en el transporte de R123, inclusive en el grupo endotoxémico, sugiriendo una actividad residual de P-gp aún después del tratamiento con LPS.

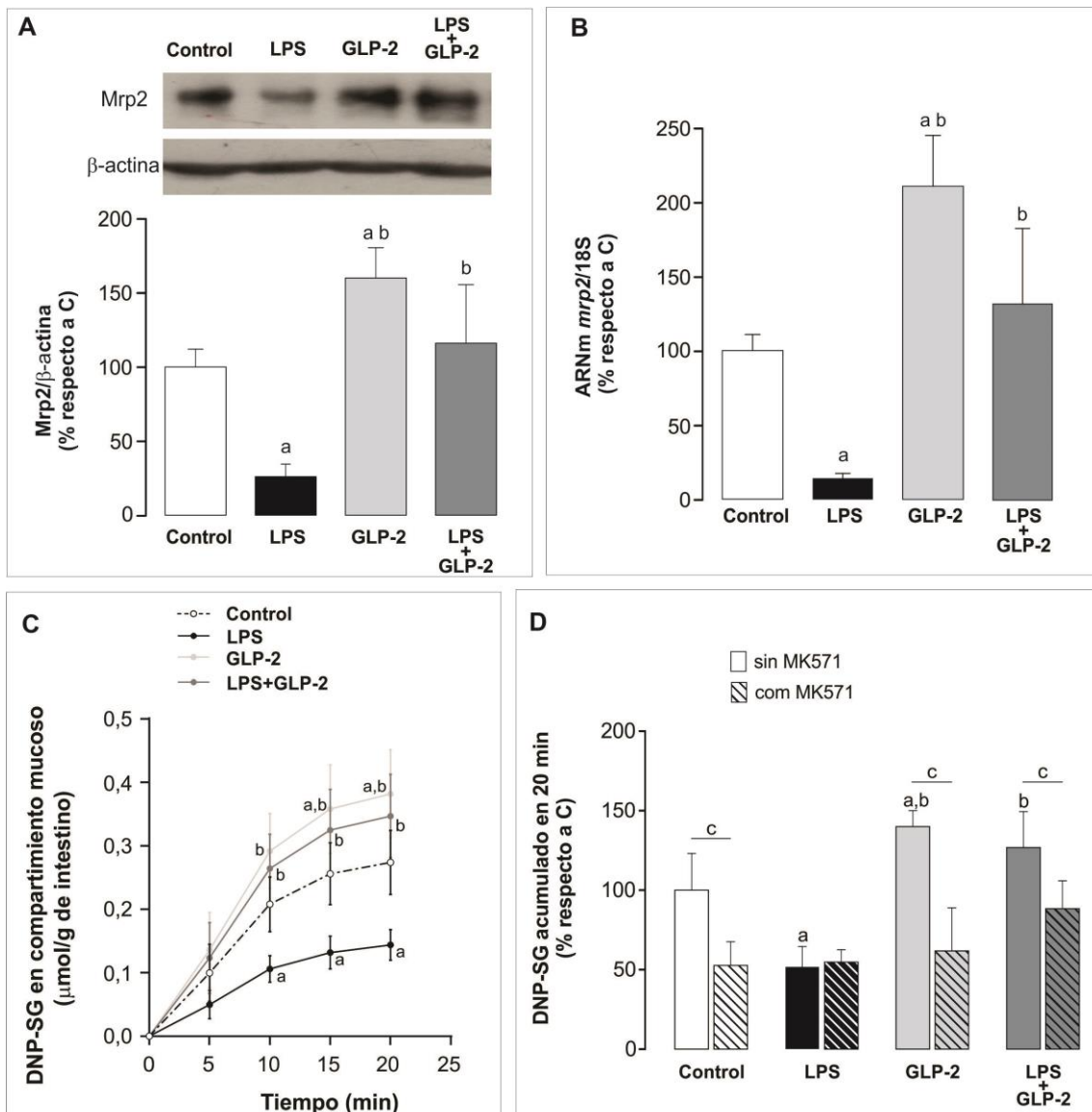


Figura 4.1: Expresión y actividad de Mrp2 intestinal. **A.** Análisis por inmunocuantificación de la expresión de Mrp2 en BBM de yeyuno proximal de rata. Se muestra una imagen representativa de cada grupo experimental (N= 4). El gráfico de barras representa el análisis densitométrico relativizado a β-actina y expresado como porcentaje del grupo Control. **B.** Análisis de la expresión de ARNm de *Mrp2* en yeyuno proximal por RT-qPCR. Los resultados se refirieron al ARNr 18S y se expresaron como porcentaje del grupo Control (N = 4). **C.** Acumulación en función del tiempo de DNP-SG en el compartimiento mucoso de sacos intestinales de yeyuno proximal (N = 6). **D.** DNP-SG acumulado en el

compartimiento mucoso después de 20 minutos con o sin la adición del inhibidor de Mrp, MK571, (N = 6). Los resultados se expresan como porcentaje del grupo Control sin inhibidor. Los datos se presentan como media \pm D.E.

a: significativamente diferente del grupo Control ($p < 0,05$); b: significativamente diferente del grupo LPS ($p < 0,05$); c: diferencia significativa respecto de incubaciones sin inhibidor de Mrp ($p < 0,05$).

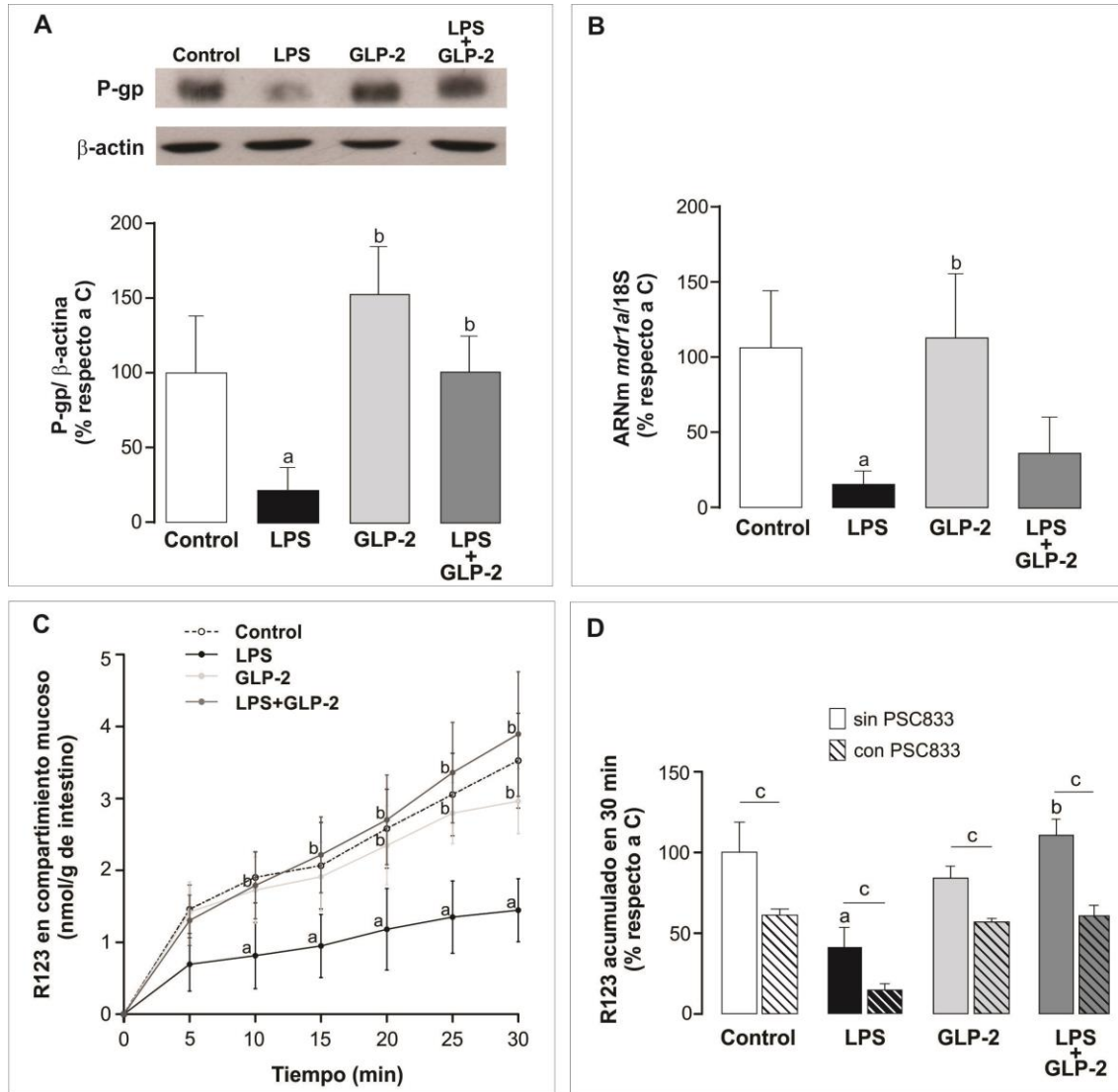


Figura 4.2: Expresión y actividad de P-gp intestinal. **A.** Análisis por inmunocuantificación de la expresión de P-gp en BBM de íleon de rata. Se muestra una imagen representativa de cada grupo experimental (N = 4). El gráfico de barras representa el análisis densitométrico relativizado a β -actina y expresado como porcentaje del grupo Control. **B.** Análisis de la expresión de ARNm de *mdr1a* en íleon por RT-qPCR. Los resultados se refirieron al ARNr 18S y se expresaron como porcentaje del grupo Control (N = 4). **C.** Acumulación en función del tiempo de R123 en el compartimiento mucoso de sacos intestinales de íleon (N = 6). **D.** R123 acumulado en el compartimiento mucoso después de 30 minutos con o sin la adición del inhibidor de P-gp, PSC833, (N = 6). Los resultados se expresan como porcentaje del grupo control sin inhibidor. Los datos se presentan como media \pm D.E.

a: significativamente diferente del grupo Control ($p < 0,05$); b: significativamente diferente del grupo LPS ($p < 0,05$); c: diferencia significativa respecto de incubaciones sin inhibidor de P-gp ($p < 0,05$).

4.1.2. Efecto del LPS y GLP-2 sobre la localización de Mrp2 y P-gp intestinales

En la Figura 4.3 se muestran imágenes representativas de Mrp2 (rojo) y de la proteína de las uniones estrechas ZO-1 (verde) así como de P-gp (verde) y de otra proteína de uniones estrechas, ocludina (rojo), obtenidas por microscopia confocal. En azul se muestran los núcleos de los enterocitos. En el grupo Control la detección de Mrp2 y P-gp se limita a la superficie luminal de los enterocitos. Para el grupo tratado con GLP-2 se observan resultados similares, lo cual indica que GLP-2 no parece afectar la localización de estos transportadores. En el caso particular de Mrp2 la señal se muestra más intensa, consistente con el aumento de expresión a nivel de BBM. En contraste, el grupo LPS muestra una disminución general en la detección de Mrp2 y P-gp, consistente con la disminución de los niveles proteicos observados por inmunocuantificación. Se observa además una distribución irregular de la señal remanente, especialmente para Mrp2. En la Figura 4.3 las flechas amarillas señalan regiones de la superficie luminal en las que ambos transportadores están ausentes, mientras que la señal correspondiente está preservada en otras regiones (flechas rojas). Las flechas blancas señalan regiones donde Mrp2 y P-gp se detectan en la proximidad del núcleo de la célula, sugiriendo la internalización del transportador. Las imágenes correspondientes al grupo LPS+GLP-2 muestran patrones de distribución de ambos transportadores similares a los del grupo Control consistente con el efecto preventivo que ejerce GLP-2 sobre la expresión y actividad de Mrp2 y P-gp.

4.1.3. Efecto del LPS y GLP-2 sobre la estructura y morfología intestinal

En la Figura 4.4A se muestran imágenes representativas de cortes de yeyuno proximal teñidos con hematoxilina-eosina de los diferentes grupos experimentales, obtenidas por microscopía de campo claro. Ambos grupos tratados con GLP-2

presentan una morfología intestinal conservada en comparación con los animales controles. Además presentan vellosidades aparentemente más largas, consistentes con las propiedades tróficas conocidas de GLP-2 [96]. Por el contrario, las secciones intestinales de ratas tratadas con LPS muestran signos de edema producido por la inflamación. A pesar de esta alteración, se observan vellosidades estructuralmente completas y la membrana apical conservada. Por otro lado, para confirmar la preservación de la membrana apical de los enterocitos, se realizó la detección por inmunocuantificación de villina, una proteína estructural asociada con la formación de las microvellosidades. Los resultados demuestran que el contenido de villina en la BBM fue similar para los cuatro grupos experimentales (Figura 4.4B).

4.1.4. Efecto del LPS y GLP-2 sobre los niveles de citoquinas pro-inflamatorias

Los niveles de IL-1 β e IL-6 en tejido intestinal se evaluaron en la región del yeyuno distal. La Figura 4.5A muestra que los niveles de IL-1 β aumentaron significativamente en un 94% en respuesta al tratamiento con LPS sobre el valor obtenido para el grupo Control. Aunque GLP-2 no tuvo ningún efecto sobre el nivel basal de esta citoquina, fue capaz de suprimir el aumento producido por LPS, ya que en el grupo LPS+GLP-2 no se observaron diferencias respecto del Control o del grupo GLP-2. Los niveles de IL-6 no fueron afectados por LPS o GLP-2, ya sea administrados individualmente o en combinación (Figura 4.5B).

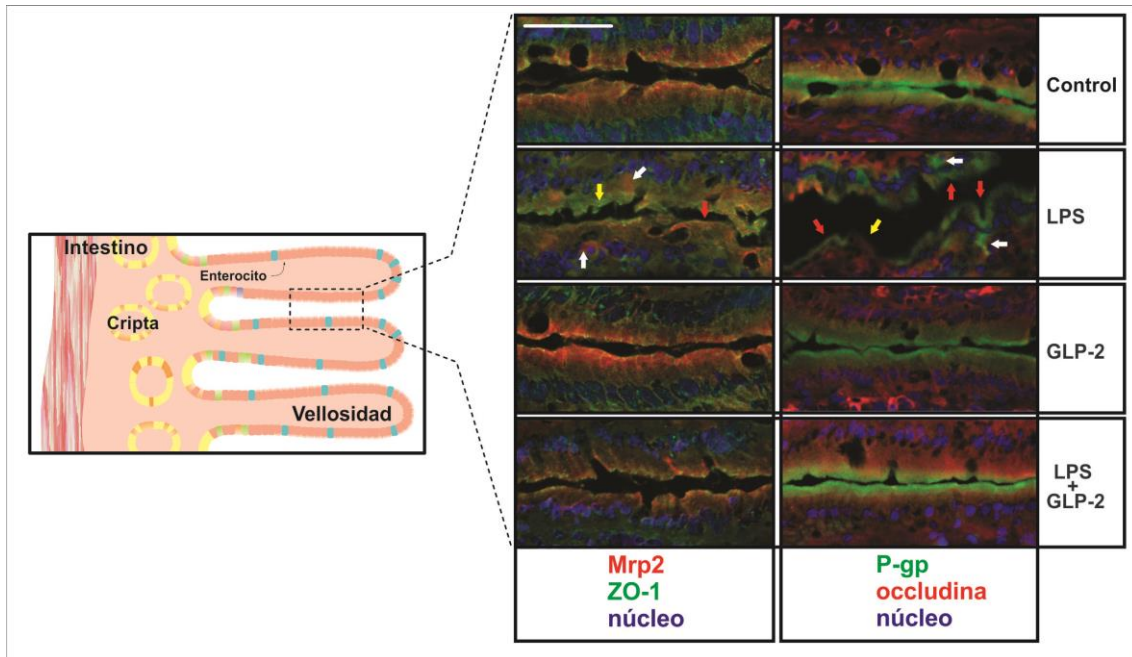


Figura 4.3: Localización de Mrp2 y P-gp intestinales. Imágenes de microscopía confocal de Mrp2 (rojo) y la proteína de uniones estrechas ZO-1 (verde) y de P-gp (verde) y la proteína de uniones estrechas occludina (rojo). Los núcleos fueron teñidos con DAPI y se muestran en azul. Se obtuvieron muestras de yeyuno para Mrp2 y de íleon para P-gp. Las flechas blancas indican las regiones donde el transportador fue internalizado. Las flechas amarillas indican las regiones de la membrana apical donde el transportador está ausente. Las flechas rojas indican las regiones en las que el transportador sigue estando presente en la membrana apical. Las imágenes son representativas de 4 preparados diferentes por grupo. La barra blanca corresponde a 50 µm.

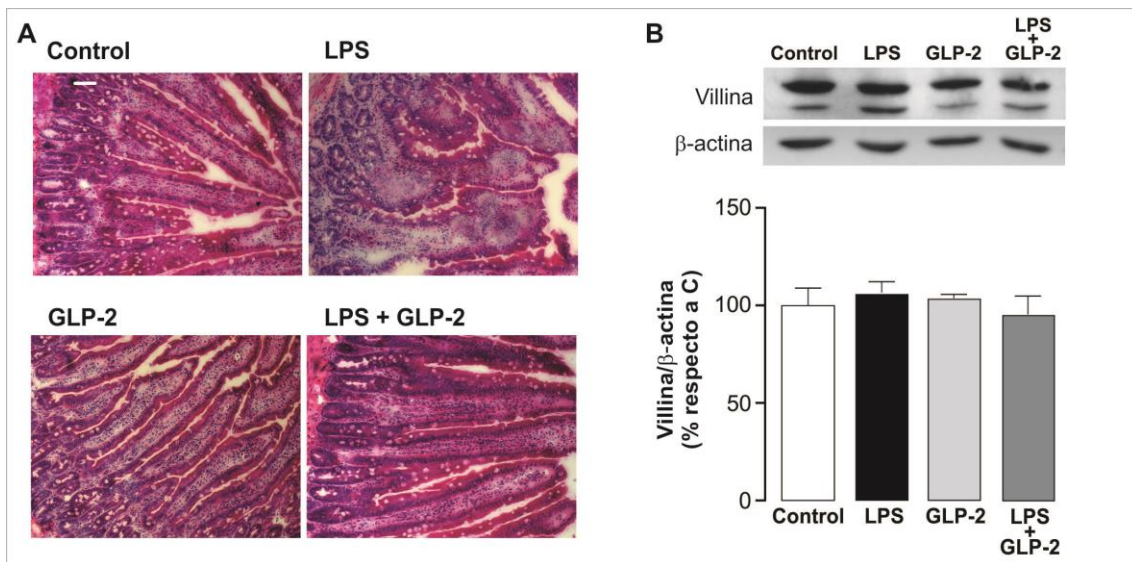


Figura 4.4: Integridad del tejido intestinal. A. Imágenes de microscopía de campo claro de cortes de yeyuno proximal teñidos con hematoxilina-eosina. Todas las imágenes son representativas de 4 preparados diferentes por grupo. La barra blanca corresponde a 50 µm. B. Inmunocuantificación de villina en BBM de yeyuno proximal. Se muestra una imagen representativa de cada grupo experimental (N= 4). El gráfico de barras representa el análisis densitométrico relativizado a β-actina y expresado como porcentaje del grupo Control. Los resultados se expresan como porcentaje del grupo Control. Los datos se presentan como media ± D.E.

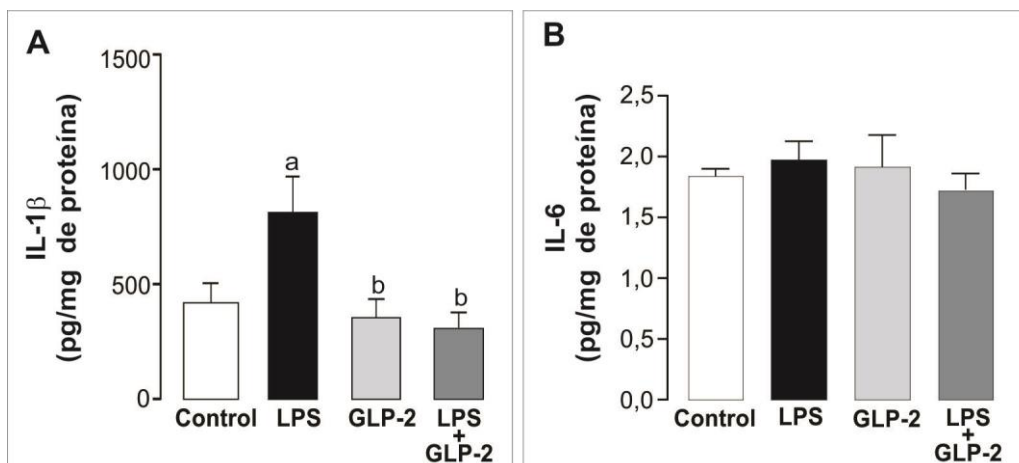


Figura 4.5: Marcadores de inflamación. **A.** Contenido intestinal de IL-1 β detectados en yeyuno distal de rata. **B.** Contenido intestinal de IL-6 detectados en yeyuno distal de rata. Los datos se presentan como media \pm D.E. (N = 4). a: significativamente diferente del grupo Control ($p < 0,05$); b: significativamente diferente del grupo LPS ($p < 0,05$).

4.1.5. Efecto del LPS y GLP-2 sobre el equilibrio redox y defensas antioxidantes

Se estudió el estado redox celular en la región media del intestino (fracción 2) mediante el análisis de marcadores de estrés oxidativo y la cuantificación de la actividad de enzimas antioxidantes.

4.1.5.1. Marcadores de estrés oxidativo

Los niveles de lipoperoxidación se midieron mediante la determinación de TBARS. Esta medida del estado oxidativo de la célula no mostró cambios en los diferentes grupos (Figura 4.6A).

Por otro lado, la Figura 4.6B muestra que el cociente GSSG/GSH aumentó en las ratas tratadas con LPS en 141% respecto a los animales controles, mientras que se mantuvo sin cambio, respecto del grupo Control en los animales que recibieron GLP-2 solo o junto con LPS. Dichos resultados señalan que GLP-2 es capaz de prevenir la alteración en el balance de las especies de glutatión provocada por LPS. La alteración de este equilibrio se evidencia por la acumulación de la especie oxidada, la cual

aumentó un 450% en el grupo LPS respecto al grupo Control cuando se expresa por mg de proteína (Figura 4.6B). En concordancia con la prevención ejercida por GLP-2, los niveles de GSSG celular en el grupo LPS+GLP-2 no mostraron diferencias significativas con los del grupo Control.

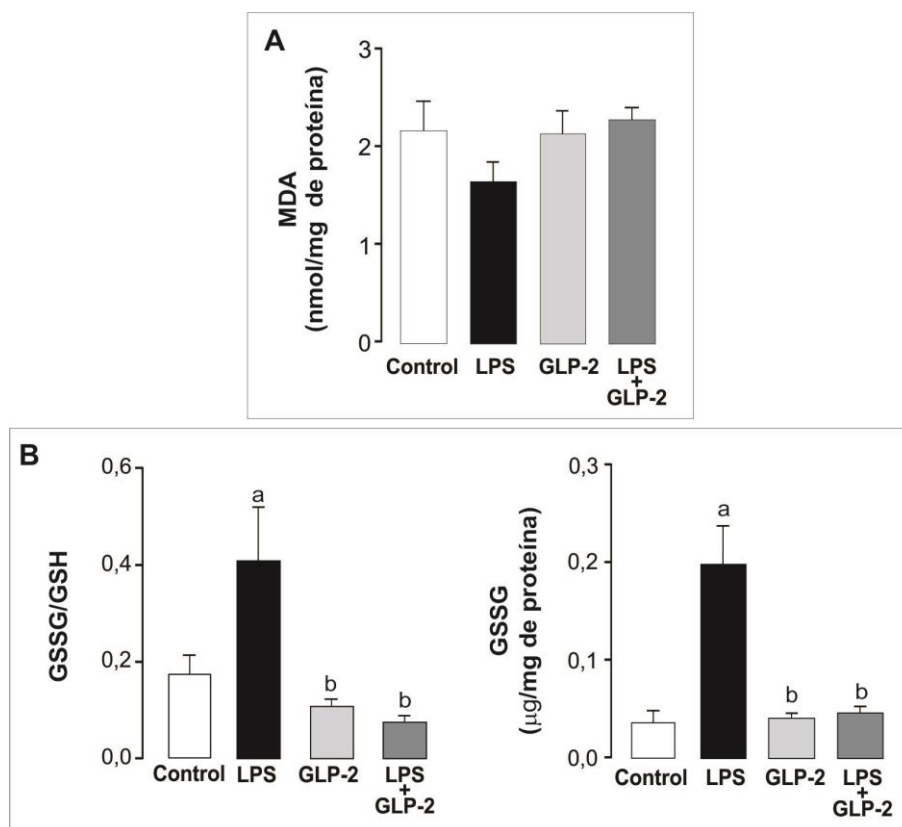


Figura 4.6: Marcadores de estrés oxidativo. A. Contenido intestinal de TBARS. B. Relación glutatión oxidado/ glutatión reducido (GSSG/GSH) y contenido intestinal de GSSG por mg de proteína. Los datos se presentan como media \pm D.E. (N = 4). a: significativamente diferente del grupo Control ($p < 0,05$); b: significativamente diferentes del grupo LPS ($p < 0,05$).

4.1.5.2. Actividad de enzimas antioxidantes

En la Figura 4.7A se observa que la actividad catalasa se redujo en los grupos LPS y LPS+GLP-2 en un 51% y 62% respectivamente en comparación con ratas controles. Esto indica que LPS afecta significativamente la actividad de la enzima y que la co-administración de GLP-2 fue incapaz de restablecerla. Además, GLP-2 administrado solo no tuvo efecto sobre la actividad de la catalasa.

Por otro lado, la actividad de la SOD no fue afectada por LPS o por GLP-2, tanto utilizados individualmente como en combinación (Figura 4.7B).

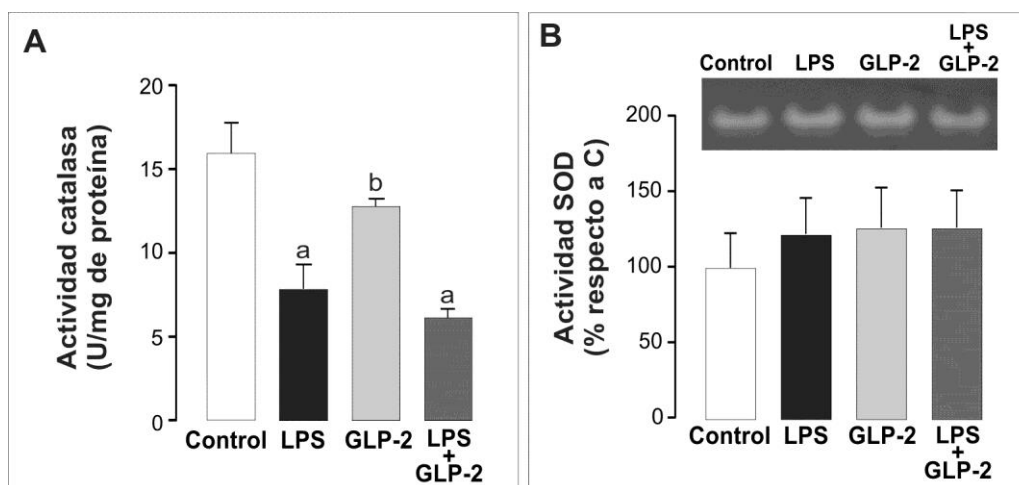


Figura 4.7: Actividad de enzimas antioxidantes. A. Actividad catalasa en yeyuno distal de rata. B. Actividad SOD en yeyuno distal de rata. Se muestra una imagen representativa de cada grupo experimental. Los datos se presentan como media \pm D.E. (N = 4). a: significativamente diferente del grupo Control ($p < 0,05$); b: significativamente diferente del grupo LPS ($p < 0,05$).

4.2. Protocolo de reversión

4.2.1. Efecto de LPS y GLP-2 sobre la expresión de Mrp2 y P-gp intestinales

La administración de dos dosis de GLP-2, luego del establecimiento de la endotoxemia por LPS, fue incapaz de producir la reversión de las alteraciones en la expresión proteica de Mrp2 o P-gp (Figura 4.8A y B). De manera similar, el análisis de los niveles de ARNm de *Mrp2* y *Mdr1a* tampoco muestra diferencias entre los grupos LPS y LPS+GLP-2 (Figura 4.8C y D), consistente con los resultados observados para las respectivas proteínas. Mas aún, en este protocolo (Figura 3.1A) GLP-2 administrado solo fue insuficiente para inducir cambios en la expresión de los transportadores en relación con el grupo Control, en contraposición a lo observado previamente para Mrp2 bajo el protocolo de prevención (Figura 4.1A).

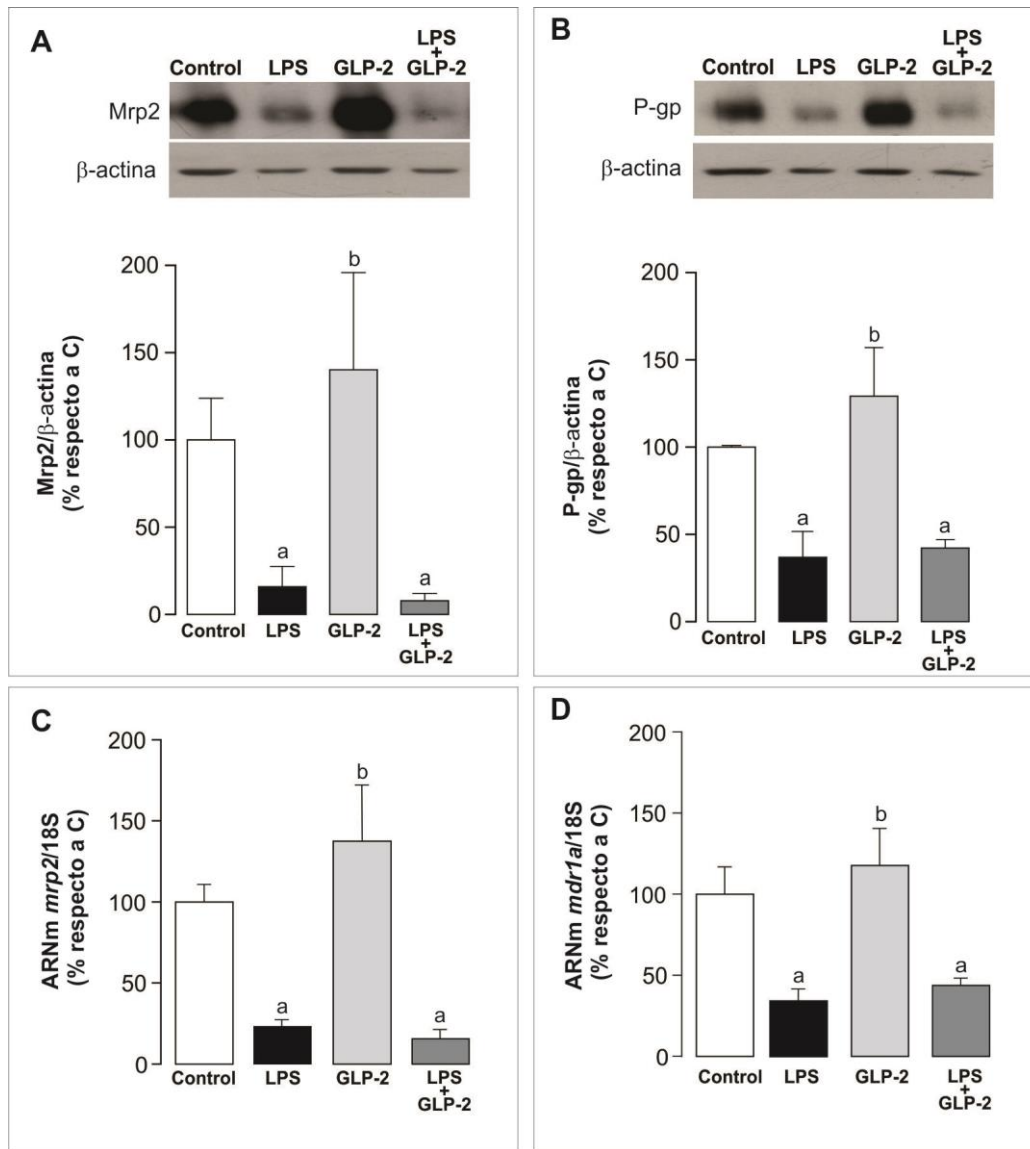


Figura 4.8: Expresión de MRP2 y P-gp intestinales. **A.** Análisis por inmunocuantificación de la expresión de MRP2 en BBM de yeyuno de rata. Se muestra una imagen representativa de cada grupo experimental (N= 4). El gráfico de barras representa el análisis densitométrico relativizado a β-actina y expresado como porcentaje del grupo Control. **B.** Análisis por inmunocuantificación de la expresión de P-gp en BBM de íleon de rata. Se muestra una imagen representativa de cada grupo experimental (N= 4). El gráfico de barras representa el análisis densitométrico expresado como porcentaje del grupo Control. **C.** Análisis de la expresión de ARNm de *Mrp2* en yeyuno de rata por RT-qPCR. Los resultados se refirieron al ARNr 18S y se expresaron como porcentaje del grupo control (N = 4). **D.** Análisis de la expresión de ARNm de *mdr1a* en íleon de rata por RT-qPCR. Los resultados se refirieron al ARNr 18S y se expresaron como porcentaje del grupo Control (N = 4). Los datos se presentan como media ± D.E. a: significativamente diferente del grupo Control (p<0,05); b: significativamente diferente del grupo LPS (p<0,05); c: diferencia significativa respecto de incubaciones sin inhibidor de P-gp (p<0,05).

4.3. CONCLUSIÓN PARCIAL I

Los resultados hasta aquí presentados demuestran que GLP-2 es capaz de prevenir la disminución de la expresión y la actividad de Mrp2 y P-gp intestinales en condiciones de endotoxemia experimental. En cambio, el protocolo de reversión mostró ser inefectivo en restaurar la expresión de estos mismos transportadores. En vista de estos resultados, en este trabajo de Tesis no fueron realizados otros experimentos para caracterizar el efecto del protocolo de reversión sobre la localización de los transportadores o su actividad.

Es posible que los efectos de GLP-2 observados en el protocolo de prevención se encuentren mediados por la capacidad de esta hormona de impedir el incremento en los niveles intestinales de IL-1 β o del estrés oxidativo, ambos generados por LPS. Resulta interesante destacar que GSSG es sustrato de Mrp2, por lo tanto es posible que el incremento de sus niveles en el grupo LPS sea consecuencia de la disminución en la actividad de Mrp2 y no causa de dicha disminución. En este trabajo de Tesis no se realizaron estudios adicionales para confirmar la participación del estrés oxidativo en la regulación de Mrp2 y P-gp intestinales en ratas endotoxémicas. En cuanto al efecto de IL-1 β , su participación ha sido previamente demostrada en otros modelos experimentales como ligadura de colédoco [132] y síndrome metabólico inducido por una dieta rica en fructosa [133]. Sin embargo su participación como mediador de los efectos observados luego de la administración de LPS no han sido estudiados aún. Por ello, en la etapa siguiente de este trabajo de Tesis decidimos evaluar el papel de IL-1 β como mediador de la pérdida de expresión y actividad de Mrp2 y P-gp intestinales.

5. RESULTADOS II: IL-1 β media la alteración de Mrp2 intestinal en la endotoxemia experimental. Posible regulación postraduccional

5.1. Estudios en animales

5.1.1. Efecto de LPS y a-IL1- β sobre la expresión y actividad de Mrp2 y P-gp intestinales

Al igual que en los experimentos de prevención y reversión, se observó que la expresión de las proteínas Mrp2 y P-gp intestinales disminuyó luego del tratamiento con una dosis única de LPS (-75 y -70% respectivamente) (Figura 5.1A y B). En cambio, el efecto que produjo la administración del anticuerpo a-IL-1 β (4 dosis de 25 μ g/kg p.c.) dependió del transportador estudiado. En el caso de Mrp2 observamos que a-IL-1 β fue capaz de prevenir parcialmente la disminución en la expresión inducida por LPS, alcanzando un 50% de la expresión mostrada en ratas controles (Figura 5.1A). En cambio, la expresión de P-gp no varió en el grupo LPS+a-IL-1 β respecto de LPS solo, mostrando ambos un valor aproximado al 35% del valor en el grupo C (Figura 5.1B).

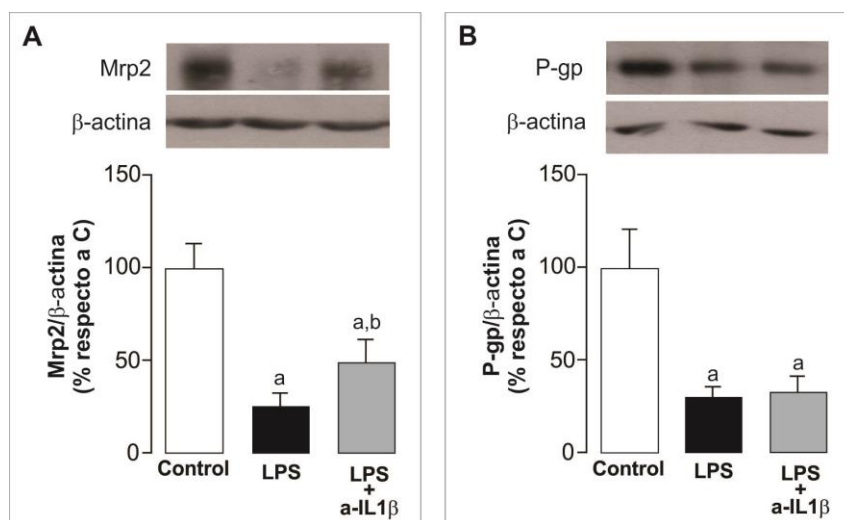


Figura 5.1: Expresión de Mrp2 y P-gp intestinales. A. Análisis por inmunocuantificación de la expresión de Mrp2 en BBM de yeyuno proximal de rata. B. Análisis por inmunocuantificación de la expresión de P-gp en BBM de íleon de rata. Se muestra una imagen representativa de cada grupo experimental (N= 3). El gráfico de barras representa el análisis densitométrico relativizado a β -actina y expresado como porcentaje del grupo Control. Los datos se presentan como media \pm D.E. a: significativamente diferente del grupo Control ($p < 0,05$); b: significativamente diferente del grupo LPS ($p < 0,05$).

Los niveles proteicos de Mrp2 y de P-gp en la BBM de enterocitos de rata se correlacionaron con la capacidad de transporte de sus respectivos sustratos modelos. En efecto, la Figura 5.2A muestra que el transporte de DNP-SG en sacos de yeyuno evertidos disminuyó significativamente en los animales tratados con LPS. En el caso de los animales co-tratados con α -IL-1 β se observa mayor actividad de Mrp2 que en los animales endotoxémicos, aunque sin alcanzar los valores obtenidos para el grupo Control. La Figura 5.2B muestra que el transporte de R123 en sacos de íleon evertidos presenta valores similares para los grupos LPS y LPS+ α -IL-1 β , a su vez significativamente menores que el Control.

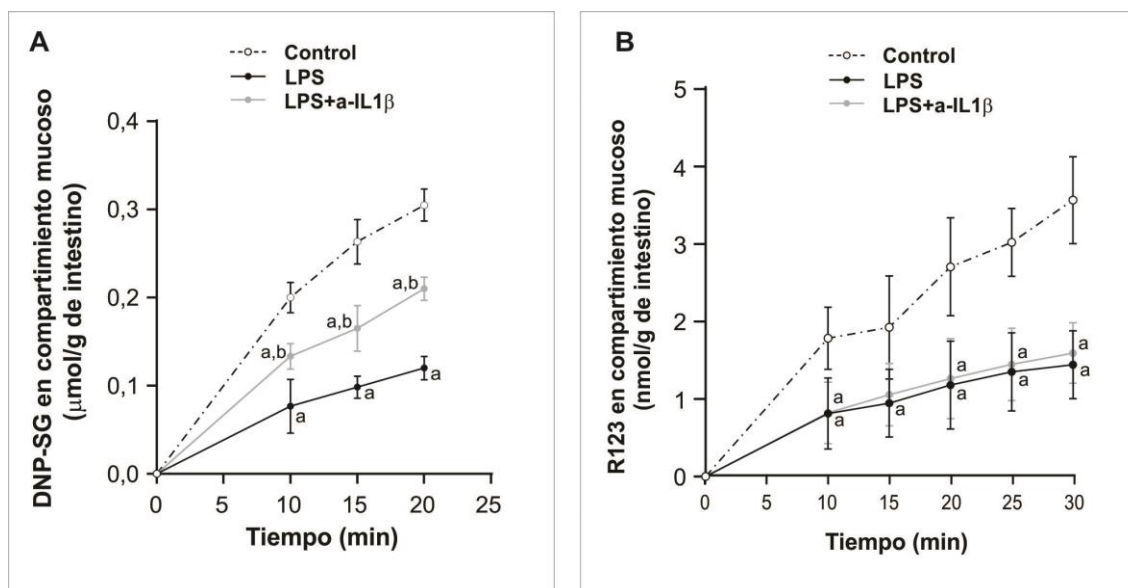


Figura 5.2: Actividad de Mrp2 y P-gp intestinales. **A.** Acumulación en función del tiempo de DNP-SG en el compartimiento mucoso de sacos intestinales de yeyuno proximal (N = 6). **B.** Acumulación en función del tiempo de R123 en el compartimiento mucoso de sacos intestinales de íleon (N = 6). Los datos se presentan como media \pm D.E. a: significativamente diferente del grupo Control ($p < 0,05$); b: significativamente diferente del grupo LPS ($p < 0,05$).

En función de estos resultados sólo se analizaron los niveles de ARNm de *Mrp2* en yeyuno. Podría esperarse que IL-1 β regule en forma transcripcional la expresión de *Mrp2* explicando al menos parcialmente los efectos observados en la sección 4.1.1. Sin embargo, se observó que los niveles de ARNm de *Mrp2* en el grupo LPS+ α -IL-1 β

resultaron similares a los del grupo LPS y significativamente menores que los del grupo Control (Figura 5.3). Estos resultados indicarían que la regulación transcripcional de Mrp2 por LPS no se encuentra mediada por IL-1 β y que dependería de otro intermediario, por el momento no identificado. Resta explicar entonces la prevención parcial observada en la expresión de Mrp2 en BBM y su correspondiente actividad en el grupo LPS+a-IL-1 β . Dicho efecto parcial podría relacionarse con un fenómeno postranscripcional. Un factor posible a considerar consiste en la pérdida de localización de Mrp2 en BBM inducida por LPS, resultando en internalización a compartimientos intracelulares y su prevención parcial por a-IL-1 β . Este aspecto fue evaluado a continuación por microscopía confocal.

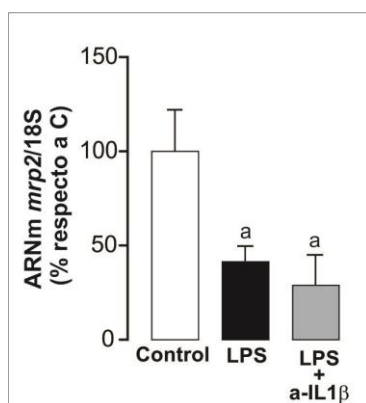


Figura 5.3: Expresión Mrp2 intestinal. A. Análisis de la expresión de ARNm de *Mrp2* en yeyuno proximal por RT-qPCR. Los resultados se refirieron al ARNr 18S y se expresaron como porcentaje del grupo Control (N = 3). Los datos se presentan como media \pm D.E. a: significativamente diferente del grupo Control ($p < 0,05$).

5.1.2. Efecto de LPS y a-IL1- β sobre la morfología intestinal y la localización de Mrp2

En la Figura 5.4A se muestran imágenes representativas de cortes de yeyuno proximal de los diferentes grupos experimentales teñidos con hematoxilina-eosina, obtenidas por microscopía de campo claro. Las secciones intestinales de ratas tratadas con LPS muestran signos de edema producido por la inflamación como ya fue observado (Figura 4.4). En cambio, las secciones intestinales de ratas tratadas con

LPS+a-IL-1 β muestran una morfología similar a la del grupo Control. Si bien no se realizaron estudios cuantitativos para establecer la magnitud de estas diferencias, los resultados sugieren un papel significativo de IL-1 β en la instalación del proceso inflamatorio.

En la Figura 5.4B se muestran imágenes representativas de Mrp2 (rojo) y de la proteína de las uniones estrechas ZO-1 (verde) obtenidas por microscopía confocal. En azul se muestran los núcleos de los enterocitos. Al igual que en la Figura 4.4, en el grupo Control la detección de Mrp2 se observa principalmente en la superficie apical de los enterocitos. En el grupo LPS se observa que la señal remanente para Mrp2 se encuentra principalmente en el interior celular, próximo al núcleo, lo cual indica una internalización del transportador. Sin embargo hay regiones de la superficie en la que aún se puede detectar la fluorescencia correspondiente a Mrp2 (señalado con flechas amarillas). Las imágenes del grupo LPS+a-IL-1 β muestran una localización similar a la del grupo Control. Sin embargo, no se observa la misma intensidad de señal que en dicho grupo. Estos resultados son consistentes con el hecho de que a-IL-1 β previene, al menos parcialmente, la pérdida de Mrp2 en BBM. Así, IL-1 β no sólo participaría en la producción del fenómeno inflamatorio sino que a su vez induciría internalización de Mrp2 y consecuente pérdida de su actividad de transporte.

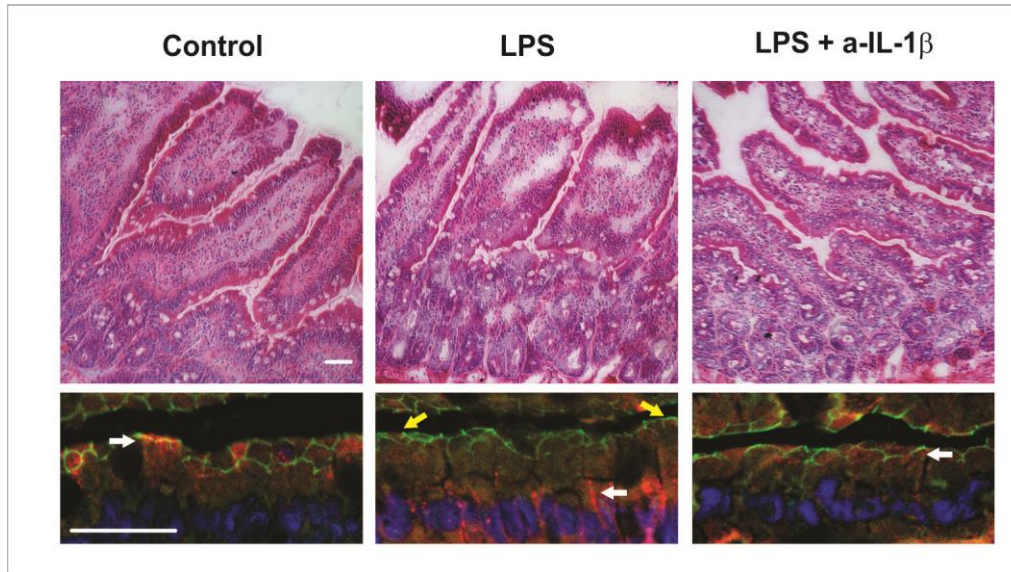


Figura 5.4: Integridad del tejido intestinal y localización de Mrp2. **Panel superior:** Imágenes de microscopía de campo claro de cortes de yeyuno proximal teñidos con hematoxilina-eosina. **Panel Inferior:** Imágenes de microscopía confocal de Mrp2 (rojo) y ZO-1 (verde) en secciones de yeyuno proximal. Los núcleos se muestran en azul. Las flechas blancas indican la región donde se observa principalmente el transportador. Las flechas amarillas indican las regiones de la membrana apical donde el transportador está ausente. Todas las imágenes son representativas de 3 preparados diferentes por grupo. Las barras blancas corresponden a 50 μm .

5.2. Estudios en células Caco-2

5.2.1. Efecto de IL-1 β sobre la expresión y localización de MRP2

Con la finalidad de confirmar en forma más directa la participación de IL-1 β en la pérdida de expresión y actividad de Mrp2 se utilizó un modelo de epitelio intestinal. Este modelo consiste en el cultivo a confluencia, y en estado de diferenciación, de las células Caco-2, con origen en adenocarcinoma de colon humano. Se observó que el tratamiento con IL-1 β durante 24 h disminuye la expresión de MRP2 en fracciones de MCT de manera dosis dependiente, siendo 10 ng/ml la menor dosis para la cual la diferencia fue significativa respecto del grupo Control (Figura 5.5).

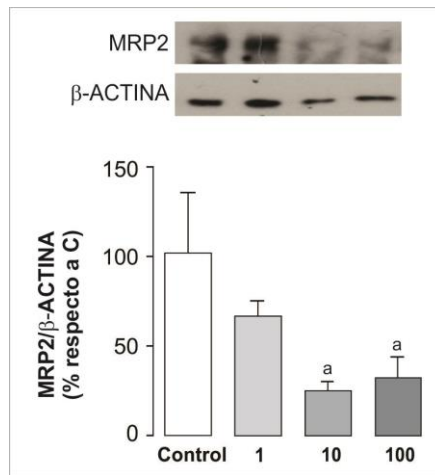


Figura 5.5: Expresión de MRP2 en MCT de células Caco-2. Análisis por inmunocuantificación de la expresión de MRP2 en MCT de células Caco-2 tratadas con IL-1 β 1; 10 y 100 ng/ml durante 24 h. Se muestra una imagen representativa de cada grupo experimental (N=3). El gráfico de barras representa el análisis densitométrico relativizado a β -actina y expresado como porcentaje del grupo Control. Los datos se presentan como media \pm D.E. a: significativamente diferente del grupo Control ($p < 0,05$).

El fenómeno de translocación de transportadores ABC apicales a compartimientos intracelulares ha sido bien caracterizado en el hepatocito y ocurre en períodos tan cortos como 20-30 min [134], [135]. Sostenido en el tiempo puede explicar la pérdida de expresión global al disminuir la vida media de MRP2 [135]. Para confirmar que IL-1 β puede en efecto ser responsable de la translocación de MRP2 a compartimientos intracelulares, se caracterizó su efecto bajo tratamiento agudo (30 min), en el mismo modelo celular. En la Figura 5.6 se muestran vistas superior y 3D ortogonal (eje z) para los grupos experimentales IL-1 β y Control. El análisis densitométrico a lo largo del eje z (3D ortogonal) se traduce en la gráfica de intensidad de fluorescencia de MRP2 (rojo) en función de la distancia media al núcleo (azul) que se muestra en la parte inferior de la misma figura. La distancia media entre el pico de intensidad máxima de MRP2 y el de su respectivo núcleo en el grupo Control es $2,30 \pm 0,56 \mu\text{m}$. Este resultado indica que la posición de MRP2 difiere de la de los núcleos y es consistente con localización en la BBM. En el grupo tratado con IL-1 β dicha separación es significativamente menor ($0,58 \pm 0,37 \mu\text{m}$) lo que se corresponde con una

posición similar entre MRP2 y el núcleo en el eje z. Esto por su parte sugiere fuertemente que MRP2 fue internalizada en respuesta al tratamiento con la citoquina. Considerando que las áreas bajo las curvas de intensidad de fluorescencia de MRP2 fueron normalizadas al 100%, la menor altura de la curva de intensidad en el grupo IL-1 β y por ende el ensanchamiento de la misma a lo largo del eje z, sugiere una mayor dispersión del transportador a lo largo del eje longitudinal de la célula. Esta distribución dispersa se ha asociado previamente al fenómeno de internalización en el mismo modelo celular [136].

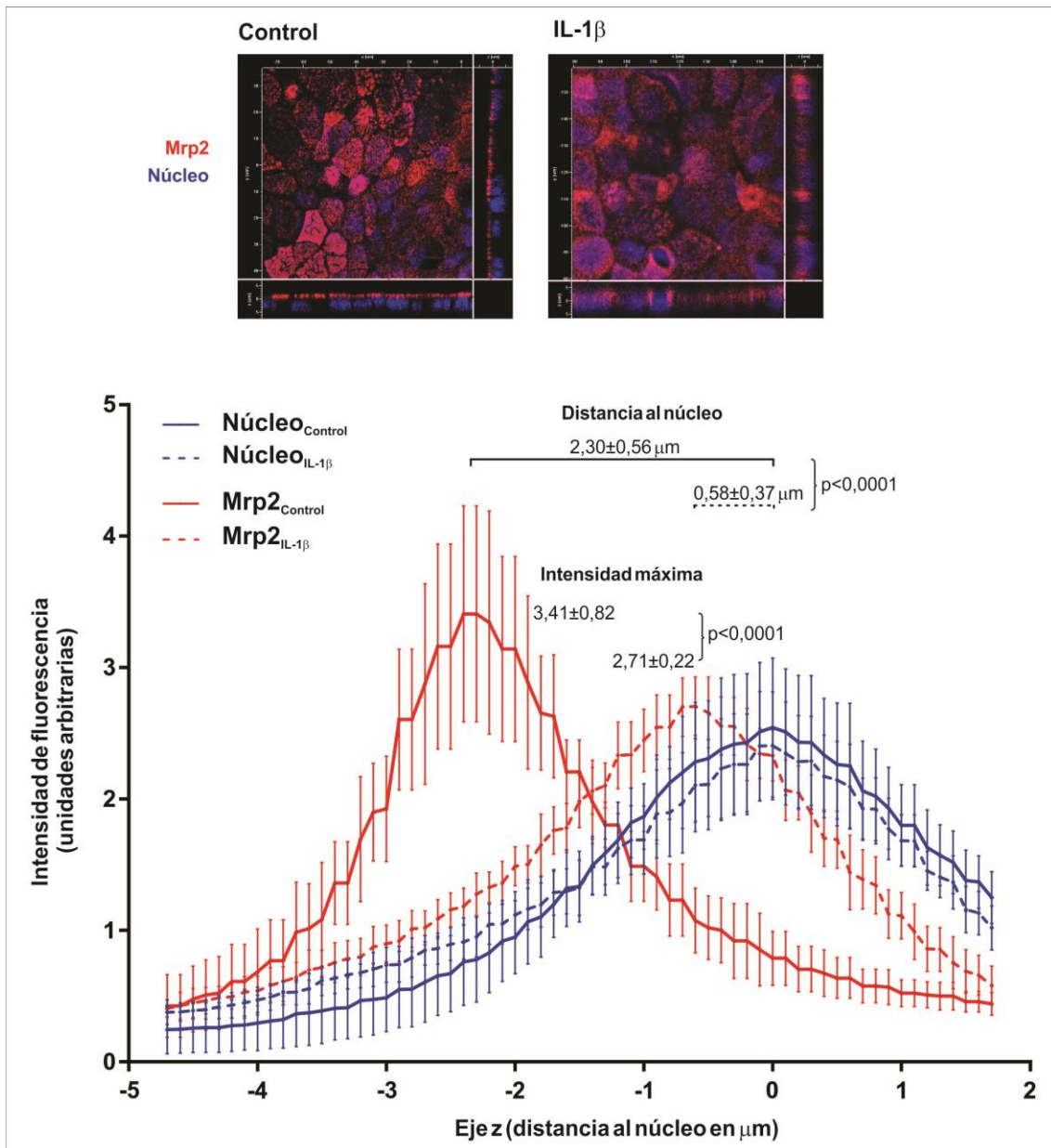


Figura 5.6: Localización de MRP2. Panel superior: Imágenes superior y 3D ortogonales de microscopía confocal de MRP2 (rojo) en células Caco-2 tratadas con IL-1 β 10 ng/ml durante 30 min. Los núcleos fueron teñidos con DAPI y se muestran en azul. Todas las imágenes son representativas 3 preparados diferentes por grupo. **Panel inferior:** Gráfico de la intensidad de fluorescencia en función de la distancia al núcleo (eje z). Los datos se expresan como media \pm D.E. de 20 imágenes diferentes de cada grupo (N=3).

5.3. CONCLUSIÓN PARCIAL II

Los resultados obtenidos en esta sección demuestran que IL-1 β mediaría al menos en parte la pérdida de expresión y actividad de Mrp2 en la endotoxemia experimental, no teniendo participación en cambio en los efectos observados para P-gp.

En cuanto al mecanismo de acción de IL-1 β , los resultados sugieren una regulación postraducciona, consistente en deslocalización de MRP2 de la BBM y derivación a compartimientos intracelulares. Además, la internalización del transportador sostenida en el tiempo podría resultar en derivación a compartimientos degradativos (ej. lisosomas) y a consecuente pérdida de la expresión total del transportador, tal como se observó a las 24 h de tratamiento con LPS en ratas o con IL-1 β en células Caco-2.

En base a los resultados obtenidos a partir del tratamiento con a-IL-1 β , se desprende que la participación de IL-1 β explicaría, al menos en parte, la alteración de la expresión y actividad de Mrp2 en la endotoxemia experimental. En una última etapa de este trabajo de Tesis y a partir de los resultados observados en la Figura 4.1, decidimos caracterizar el mecanismo molecular subyacente en la regulación a nivel transcripcional de GLP-2 sobre la expresión de Mrp2, como un componente adicional de su efecto preventivo.

6. RESULTADOS III: AMPc media la inducción de Mrp2 intestinal por GLP-2. Regulación transcripcional por la vía PKA

6.1. Estudios en animales

6.1.1. Efecto de GLP-2 sobre los niveles de AMPc intestinal

Como fue mencionado en la sección 1.6, GLP-2R, receptor de GLP-2, pertenece a la superfamilia de PGCR y su activación estimula la síntesis de AMPc. Para caracterizar la posible mediación de AMPc en los efectos de GLP-2 observados en la sección 4.1.1 se midieron sus niveles 2 h después de la última dosis de GLP-2 en homogenados de mucosa intestinal. Se observó que el tratamiento con GLP-2 incrementó los niveles de AMPc intestinal en un 161% (Figura 6.1A) sobre el grupo Control. El agregado de DDA, inhibidor de adenilato ciclasa, bloqueó dicho incremento.

6.1.2. Efecto de GLP-2 sobre la expresión de Mrp2 intestinal

Por otro lado se analizaron por inmunocuantificación los niveles de Mrp2 en BBM de mucosa de yeyuno. Como era de esperar, se observó que GLP-2 incrementa en un 72% los niveles de Mrp2 en BBM sobre el grupo Control (Figura 6.1B). Más importante aún, pudo relacionarse este incremento con el aumento de AMPc, ya que el tratamiento con DDA bloqueó el efecto de GLP-2 sobre los niveles de Mrp2 en la BBM.

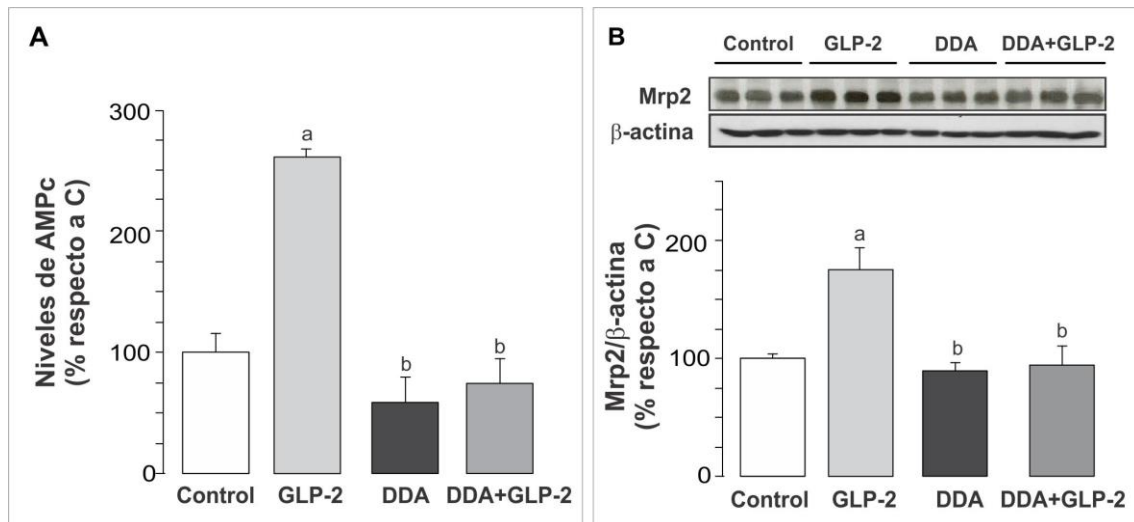


Figura 6.1: Niveles de AMPc y expresión de Mrp2 en mucosa intestinal. **A.** Cuantificación de los niveles de AMPc en homogenados de mucosa de yeyuno proximal 2 h después de la última dosis de GLP-2. El gráfico de barras expresa los niveles de AMPc como porcentaje del grupo Control (N= 4). **B.** Análisis por inmunocuantificación de la expresión de Mrp2 en BBM de homogenado de mucosa de yeyuno proximal de rata 2 h después de la última dosis de GLP-2. Se trataron animales con un inhibidor de adenilato ciclasa (DDA) de manera de inhibir la producción de AMPc. Se muestra una imagen representativa de cada grupo experimental (N= 4). El gráfico de barras representa el análisis densitométrico relativizado a β-actina y expresado como porcentaje del grupo Control. Los datos se presentan como media ± D.E. a: significativamente diferente del grupo Control ($p < 0,05$); b: significativamente diferente del grupo LPS ($p < 0,05$).

6.1.3. Efecto de GLP-2 sobre los niveles de AMPc en fracciones de enterocitos aislados

Con la finalidad de establecer si el aumento de los niveles de AMPc observada en homogenado de mucosa intestinal refleja un aumento dentro de los enterocitos, se procedió a extraer las células de dos fracciones distintas de las vellosidades intestinales. De esta forma, se obtuvieron 2 subpoblaciones y se denominó fracción T a las células de la punta de la vellosidad y fracción M a las células de la zona media. En primer lugar se caracterizaron cada una de las fracciones mediante el análisis de actividad de enzimas asociadas a enterocitos diferenciados. Los resultados se presentan en la Tabla 6.1 y confirman que la fracción T presenta mayor actividad fosfatasa alcalina y sacarasa-isomaltasa que la fracción M, señalando un enriquecimiento de enterocitos maduros en la posición más extrema en la vellosidad. Por otro lado, los resultados

muestran que el tratamiento con GLP-2 no produjo diferencias en los marcadores evaluados con respecto a los animales controles.

Tabla 6.1

	Fracción	Control	GLP-2
Actividad fosfatasa alcalina	T	72,5 ± 6,9 ^a	75,1 ± 5,1 ^a
	M	58,2 ± 5,4	63,2 ± 3,4
Actividad sacarasa-isomaltasa	T	101,3 ± 5,5 ^a	112,3 ± 6,5 ^a
	M	81,2 ± 4,2	89,2 ± 3,9

Los resultados se expresan en nmol/mg/min y representan media ± D.E. (N=4).
a: significativamente diferente de la fracción M (p<0,05).

Como fue mencionado en la sección 1.6, GLP-2R, se expresa en miofibroblastos, células enteroendocrinas y neuronas entéricas, pero no fue detectado en los enterocitos [94]. Por lo tanto, para evaluar la presencia de otros tipos celulares en estas fracciones potencialmente productores de AMPc, se analizó por RT-PCR el contenido de cromogranina A, un marcador de células enteroendócrinas. El ARNm de cromogranina A no fue detectable en la fracción T, mientras que sí se evidenció en la fracción M (Figura 6.2). Indicando la ausencia de células enteroendocrinas en el extremo de la vellosidad.

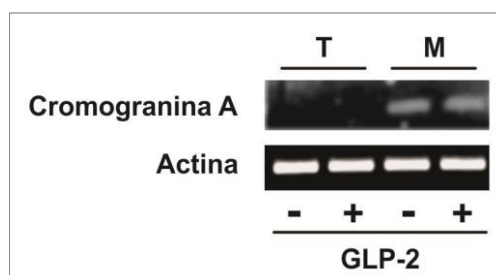


Figura 6.2: Detección de cromogranina A en subpoblaciones de células de la mucosa intestinal. Imagen representativa de la detección por RT-PCR de cromogranina A y actina.

Paralelamente, en ambas fracciones se evaluaron los niveles de AMPc 2 h después de la última dosis de GLP-2, observándose un aumento en ambas fracciones celulares con respecto al grupo Control (+182 % en la fracción T y +121% en la fracción M) (Figura 6.3A). En concordancia, la expresión de Mrp2 se incrementó en

ambas fracciones con respecto al grupo Control. Cabe destacar que el aumento de Mrp2 en la fracción T (136%) fue significativamente mayor al aumento en la fracción M (68%) ($p < 0,05$) (Figura 6.3B), al igual que lo observado para el AMPc (182% vs. 121%) . En cambio la expresión de villina en ambas fracciones no se mostró afectada por el tratamiento con GLP-2 (Figura 6.3B).

Globalmente, los hallazgos demuestran que el aumento de Mrp2 en respuesta al tratamiento con GLP-2 se produce principalmente en el extremo terminal de la vellosidad, fracción que contiene mayor proporción de enterocitos respecto a otros tipos celulares (ej. células enteroendócrinas). Coincidentemente, es la zona de mayor aumento en el contenido de AMPc, por lo que es posible especular que este mensajero puede efectivamente mediar el efecto de GLP-2 en el enterocito. Avalando este postulado, en la zona media de la vellosidad se produjo un incremento de menor intensidad tanto de Mrp2 como de AMPc, en concordancia con una menor prevalencia de enterocitos respecto a otros tipos celulares. En síntesis, si bien estos resultados no son suficientes para identificar el tipo celular sobre el que actúa inicialmente GLP-2, demuestran que la inducción de Mrp2 se vincula al aumento de AMPc en el enterocito.

Para confirmar la partición de AMPc como mediador en la inducción de MRP2 y caracterizar el mecanismo molecular correspondiente, se utilizó el modelo celular Caco-2.

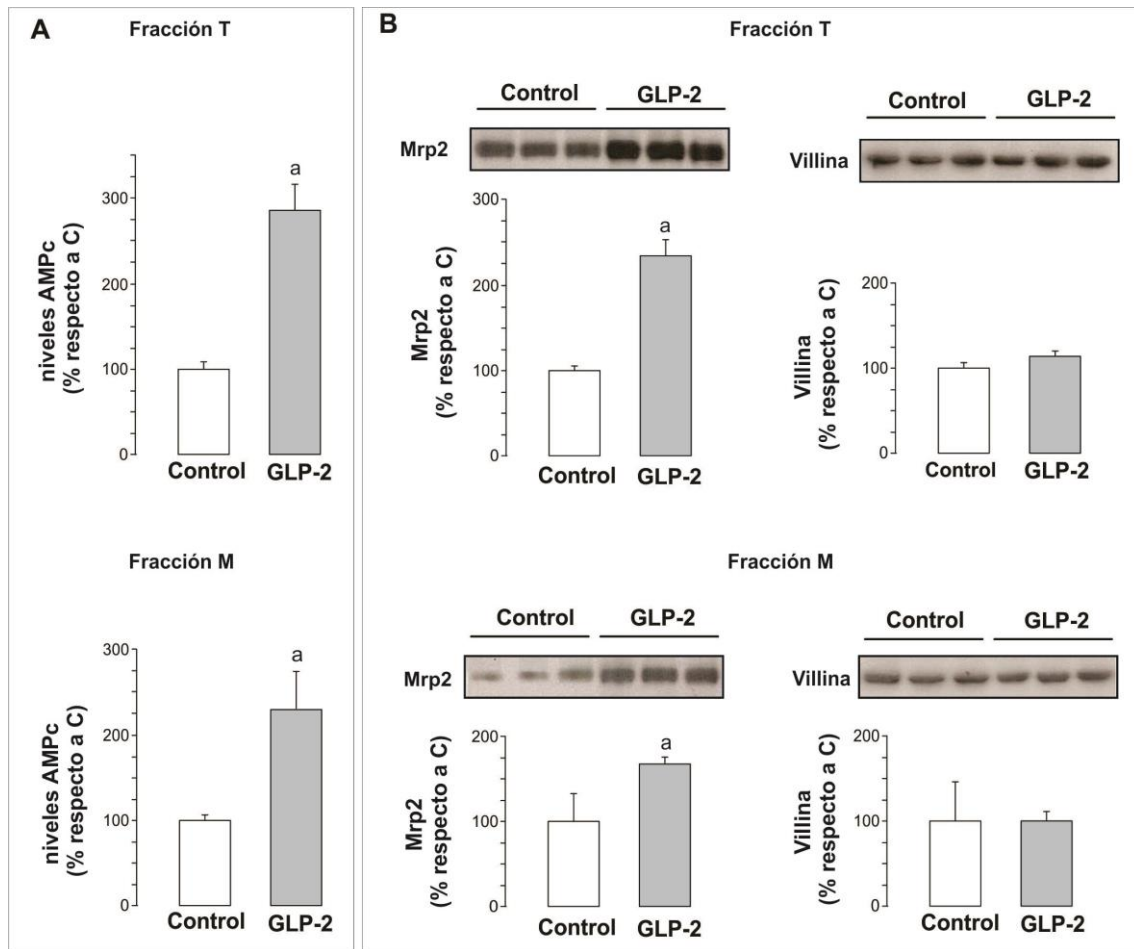


Figura 6.3: Niveles de AMPc y expresión de Mrp2 y villina en fracciones de mucosa intestinal. A. Cuantificación de los niveles de AMPc en las fracciones de la punta (T) y de la zona media (M) de la vellosidad intestinal 2 h después de la última dosis de GLP-2. El gráfico de barras expresa los niveles de AMPc como porcentaje del grupo Control. **B.** Análisis por inmunocuantificación de la expresión de Mrp2 y villina en BBM de las fracciones T y M 2 h después de la última dosis de GLP-2. Se muestra una imagen representativa de cada grupo experimental (N=4). El gráfico de barras representa el análisis densitométrico relativizado a villina y expresado como porcentaje del grupo Control. Los datos se presentan como media \pm D.E. a: significativamente diferente del grupo Control ($p < 0,05$).

6.2. Estudios en células Caco-2

6.2.1. Efecto de db-AMPc sobre la expresión de MRP2

En primer lugar se examinó el efecto dosis-respuesta de db-AMPc (un análogo permeable del AMPc) sobre la expresión de MRP2. Se incubaron las células Caco-2 con db-AMPc 1; 10 ó 100 μ M durante 48 h y se evaluaron los niveles de MRP2 por inmunocuantificación en MCT. El db-AMPc produjo un aumento en la expresión de MRP2 en todas las concentraciones estudiadas (Figura 6.4A), observándose un efecto

máximo a la concentración de 10 μM . Por lo tanto, la dosis de 10 μM se eligió para llevar a cabo los experimentos posteriores. Por el contrario, la expresión de villina no se vio afectada en ninguna de las concentraciones estudiadas (Figura 6.4A), reafirmando el efecto selectivo de AMPc sobre el transportador en estudio. En concordancia con los resultados de inmunocuantificación, la detección por microscopía confocal de MRP2 (rojo) mostró una señal más fuerte en las células tratadas con db-AMPc en comparación con el grupo Control, mientras que la detección de ZO-1 (verde) fue similar en intensidad de señal y localización entre ambos grupos (Figura 6.4B). La señal azul corresponde a los núcleos. Para establecer si el aumento de los niveles de la proteína MRP2 está asociado con la modulación de los niveles de ARNm de MRP2, realizamos estudios por RT-qPCR. En la Figura 6.4C se muestra que el tratamiento con db-AMPc aumentó la expresión del ARNm de MRP2 en 124% en relación con las células controles. Este aumento fue prevenido por el inhibidor de la ARN polimerasa II, ActD, lo cual sugiere la presencia de una regulación a nivel transcripcional de MRP2 por db-AMPc.

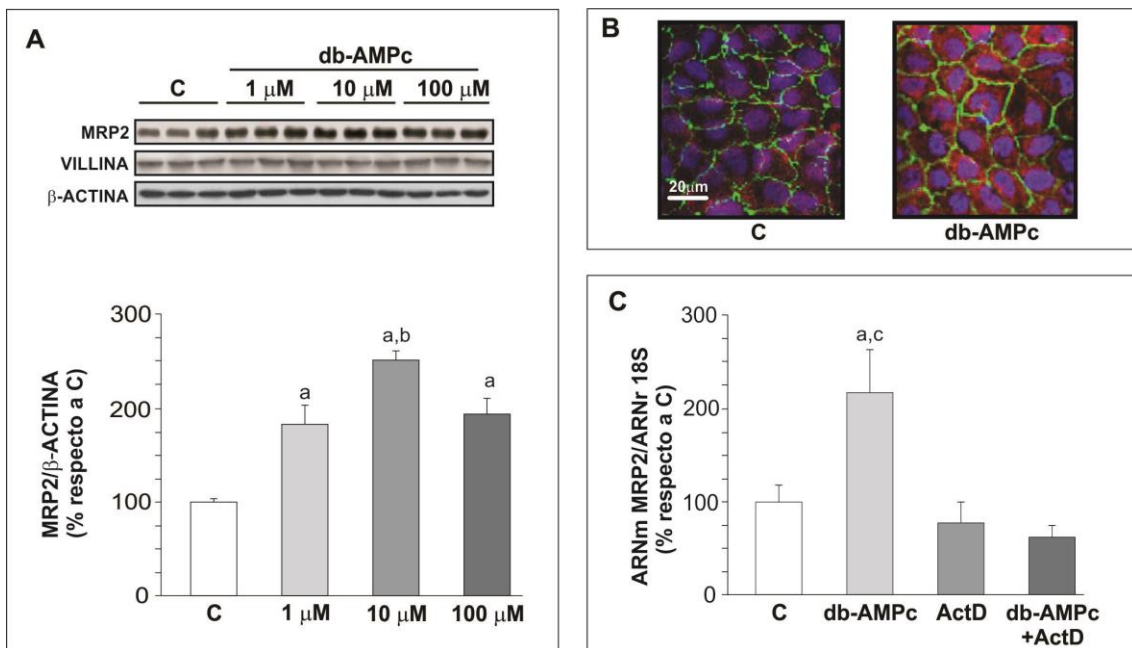


Figura 6.4: Expresión de MRP2 y villina en células Caco-2. **A.** Análisis por inmunocuantificación de la expresión de MRP2 y villina en MCT de células Caco-2 tratadas con db-AMPc 1; 10 y 100 μM . Se muestra una imagen representativa de cada grupo experimental. El gráfico de barras representa el análisis densitométrico relativizado con β -actina y expresado como porcentaje del grupo Control (C). **B.** Detección de MRP2 por microscopia confocal. Vista superior del cultivo en monocapa de Caco-2. Los límites celulares son demarcados por ZO-1 (verde) y MRP2 se observa en la superficie (rojo). Los núcleos fueron detectados con DAPI (azul). Las imágenes son representativas 3 preparados diferentes por grupo. **C.** Análisis por RT-qPCR de los niveles de ARNm de MRP2 en células Caco-2 tratados con db-AMPc (10 μM) y actinomicina D (ActD) (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), un inhibidor de la transcripción. Los resultados fueron referidos a ARNr 18S y expresados como porcentaje de las células controles. Los datos se expresan como media \pm D.E. de 6 experimentos individuales por grupo. a: significativamente diferente de C ($p < 0,05$); b: significativamente diferente de db-AMPc 1 y 100 μM ($p < 0,05$); c: significativamente diferente de ActD y de db-AMPc + ActD ($p < 0,05$).

6.2.2. Efecto de forskolina sobre la expresión de MRP2 y los niveles de AMPc

Se estudió además la capacidad del AMPc, generado endógenamente por activación de la adenilato ciclasa, de regular la expresión de MRP2. La Figura 6.5 muestra que forskolina, un activador de la enzima adenilato ciclasa, induce un aumento dosis-dependiente en los niveles intracelulares de AMPc (Figura 6.5A) y un aumento concomitante en los niveles de la proteína MRP2 (Figura 6.5B), con significancia estadística en las dosis de 1 y 10 μM .

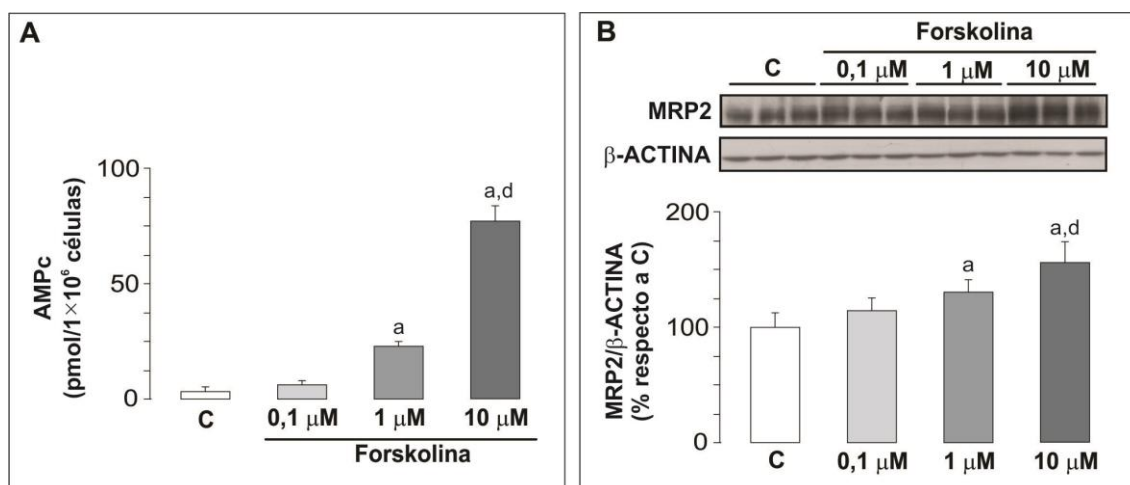


Figura 6.5: Niveles de AMPc y expresión de MRP2 en células Caco-2. **A.** Efecto dosis-dependiente de forskolina (activador de la adenilato ciclasa) sobre los niveles intracelulares de AMPc. **B.** Inmunocuantificación de los niveles de MRP2 en MCT de células Caco-2 tratadas con forskolina 0,1; 1 y 10 μM . Los datos densitométricos fueron relativizados con β -actina y expresados como porcentaje de las células controles (C). Se muestra una imagen representativa de cada grupo experimental. Los datos se expresan como media \pm D.E. de seis experimentos individuales por grupo. a: significativamente diferente de C ($p < 0,05$); d: significativamente diferentes de 0,1 y 1 μM ($p < 0,05$).

6.2.3. Efecto de db-AMPc sobre la actividad de MRP2

Con la finalidad de determinar si el aumento en los niveles de MRP2 detectado en los experimentos anteriores se traduce en una mayor actividad de transporte, se evaluó la capacidad de las células Caco-2 para exportar DNP-SG al medio de incubación luego de su tratamiento con db-AMPc. La Figura 6.6 muestra que el transporte de DNP-SG al medio fue significativamente mayor (+51.6%) en el grupo db-AMPc que en las células controles. El agregado de Probenecid, inhibidor de MRP, disminuyó el transporte de DNP-SG en ambos grupos, eliminando las diferencias observadas entre ambos y confirmando la participación de MRP2 en dicho transporte. Se compararon las cantidades intracelulares iniciales de DNP-SG entre los grupos db-AMPc y Control (datos no mostrados) de manera de descartar que una tasa diferencial de síntesis del sustrato esté condicionando la excreción.

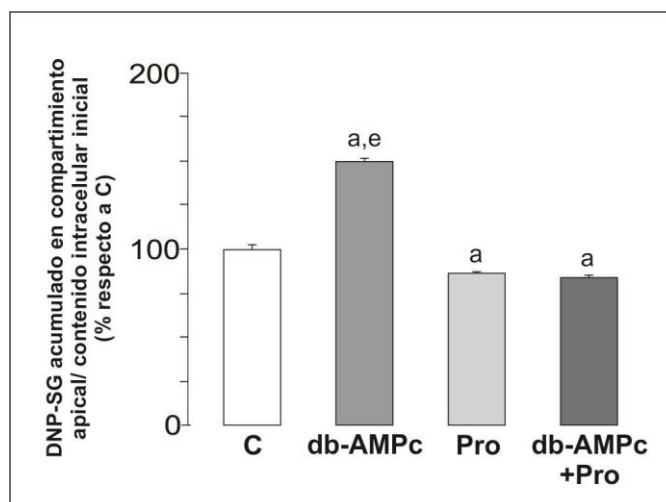


Figura 6.6: Actividad de MRP2 en células Caco-2. Las células Caco-2 fueron tratadas con db-AMPc 10 μ M durante 48 h antes de la evaluación de la acumulación de DNP-SG en el medio celular después de 60 min de incubación con su precursor CDNB (0,5 mM), en relación con el contenido intracelular inicial del DNP-SG. Los resultados se presentan como porcentaje de las células controles (C). Los ensayos fueron realizados con o sin la adición del inhibidor de MRPs, Probenecid (Pro). Los datos se expresan como media \pm D.E. de seis experimentos individuales por grupo. a: significativamente diferente del Control ($p < 0,05$); e: significativamente diferente de Pro y db-AMPc+Pro ($p < 0,05$).

6.2.4. Participación de la vía de PKA en la inducción de MRP2 por db-AMPc

Nos propusimos a continuación identificar los mediadores en la vía de respuesta a db-AMPc, responsables de la inducción de MRP2. Como AMPc es un potente activador de PKA, se evaluó la posible participación de PKA tratando las células Caco-2 con inhibidores específicos de esta quinasa (KT 5720 y H89) y db-AMPc durante 48 h. El análisis por inmunocuantificación reveló que tanto KT 5720 como H89, fueron capaces de neutralizar la inducción de MRP2 por db-AMPc (Figura 6.7A y B, respectivamente). Por otro lado se evaluó la mediación de PKA por RT-qPCR. La Figura 6.7C muestra que el tratamiento con KT 5720 también suprime el aumento en los niveles de ARNm de *MRP2* inducido por db-AMPc. Tomados en conjunto, estos resultados indican que PKA está implicada en la vía de regulación transcripcional de MRP2 por AMPc.

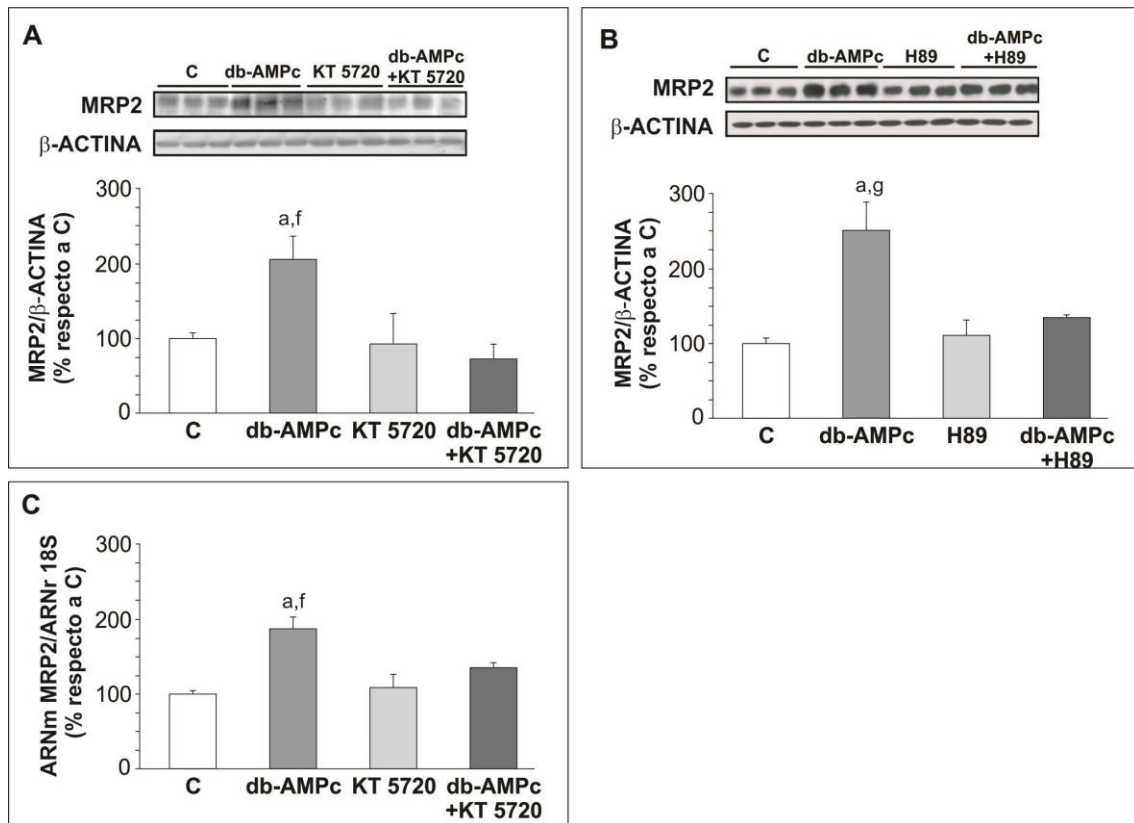


Figura 6.7: Expresión de MRP2 en células Caco-2. A y B. Inmunocuantificación de MRP2 en MCT de células Caco-2 tratadas con db-AMPC (10 μ M), en presencia o ausencia de los inhibidores de PKA, KT 5270 o H89, respectivamente. Se muestra una imagen representativa de cada grupo experimental. Los datos densitométricos fueron relativizados con β -actina y expresados como porcentaje de las células control (C). C. Niveles de ARNm de *MRP2* por RT-qPCR en células Caco-2 tratadas con db-AMPC (10 μ M), con y sin el agregado de KT 5270. Los resultados fueron remitidos al ARNr 18S. Los datos son presentados como porcentaje de las células control (C) y expresadas como la media \pm D.E. de seis experimentos individuales por grupo.

a: significativamente diferente del control ($p < 0,05$), f: significativamente diferente de KT 5270 y db-AMPC+KT5270 ($p < 0,05$), g: significativamente diferente de H89 y db-AMPC+H89 ($p < 0,05$).

6.2.5. Participación de los factores de transcripción CREB y AP-1 en la inducción de MRP2 por db-AMPC

Luego de la activación de PKA por db-AMPC, existen varios factores de transcripción que pueden ser fosforilados por esta quinasa. CREB, c-JUN, c-FOS y ATF2 son posibles candidatos. Para identificar la existencia del elemento de respuesta a AMPc (CRE) y sitios de unión de factores de transcripción AP-1 en la región promotora del gen *MRP2* humano realizamos un análisis *in silico* utilizando la base de datos TFSearch (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>). El software reveló una secuencia consenso para AP-1 con un 90% de homología y un sitio de unión CRE con un 85% de homología. La Figura 6.8A muestra la región del promotor *MRP2* analizada y los sitios AP-1 y CRE encontrados en la misma.

Para determinar si estos sitios de unión CRE y AP-1 son funcionalmente importantes en la transcripción de *MRP2* en las condiciones experimentales evaluadas en este trabajo de Tesis, se fusionó el segmento (-789/-603) del promotor de *MRP2* que contiene los sitios de unión CRE y AP-1 identificados previamente a un gen reportero. La construcción se transfectó en células Caco-2, las cuales se trataron con db-AMPC durante 24 h y luego se midió la actividad luciferasa (reportero). La actividad luciferasa aumentó un 47% en las células tratadas con db-AMPC en comparación con las células no tratadas (Figura 6.8B). Este resultado confirma que la región entre -789 y -603 contiene elementos que pueden regular la transcripción de *MRP2* en respuesta al

tratamiento con db-AMPC. Por otra parte, el pretratamiento con KT 5720 previno el aumento en la actividad luciferasa, confirmando la participación de PKA en la vía de señalización.

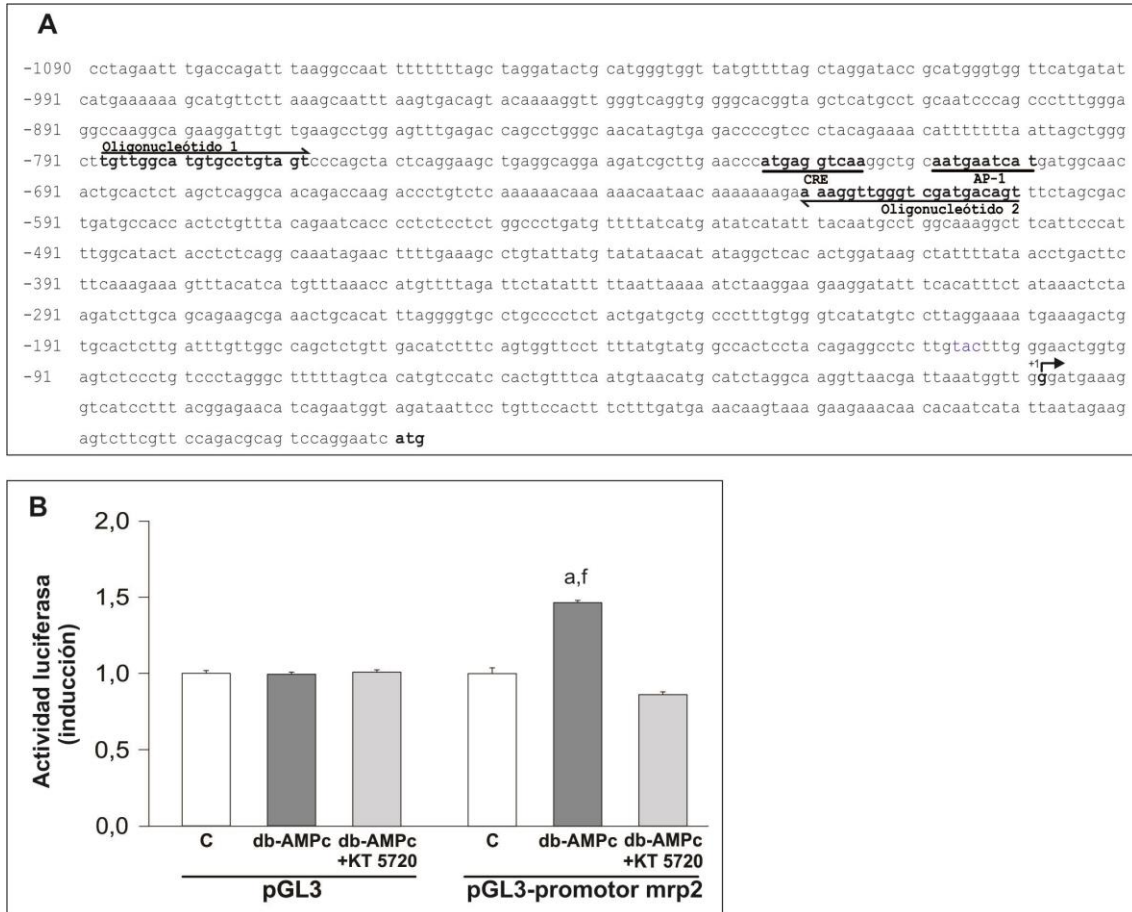


Figura 6.8: Análisis de la región promotora proximal de *MRP2*. **A.** Se señalan las secuencias consenso para los factores nucleares AP-1 y CREB. El análisis fue realizado con la base de datos TFSearch (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>). Los números representan las posiciones de los nucleótidos en relación con el sitio de inicio de la transcripción + 1 indicado con una flecha. Las secuencias de los oligonucleótidos 1 y 2, indicadas con flechas, son las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para clonar la región promotora proximal en el plásmido pGL3 y para la reacción de PCR del ensayo de ChIP. **B.** Las células Caco-2 se transfectaron con un plásmido conteniendo el promotor de *MRP2* y el gen reportero o solamente el gen reportero. La actividad luciferasa se midió 24 h después del tratamiento con db-AMPC (10 μ M) y se relativizó a la cantidad de proteína. Los resultados se presentan como la media de inducción \pm D.E. de 4 experimentos independientes. a: significativamente diferente del control ($p < 0,05$) y f: significativamente diferente de db-AMPC + KT 5720 ($p < 0,05$).

La actividad de los factores de transcripción mencionados anteriormente puede regularse a través de cambios en su expresión o modificaciones postraduccionales como la fosforilación de residuos de aminoácidos específicos. Se evaluó el efecto del

db-AMPC sobre la expresión y en el estado de fosforilación de CREB, c-JUN, c-FOS y ATF2. Se observó que c-JUN presenta un aumento en la expresión luego del tratamiento con db-AMPC 10 μ M durante 60 minutos (Figura 6.9A). El análisis por inmunocuantificación utilizando anticuerpos dirigidos contra las formas fosforiladas revelaron aumento en los niveles de p-c-JUN y p-ATF2 en respuesta a db-AMPC (+38% y 113%, respectivamente, Figura 6.9B). Como resultado de estas regulaciones, la relación p-ATF2/ATF2 aumentó significativamente en células tratadas, mientras que la relación p-c-JUN/c-JUN no varió con respecto a las células sin tratar (Figura 6.9C). Con respecto a c-FOS y CREB, ni su expresión ni su estado de fosforilación fueron afectados por el tratamiento. Con el fin de establecer una relación causal entre las modificaciones observadas en los factores nucleares y PKA, se evaluó el efecto del tratamiento con KT 5720 en estos mismos procesos. Los datos de la Figura 6.10 confirman que la activación de PKA es necesaria para que se produzcan las alteraciones (observadas en la Figura 6.9) inducidas por db-AMPC sobre c-JUN y ATF2.

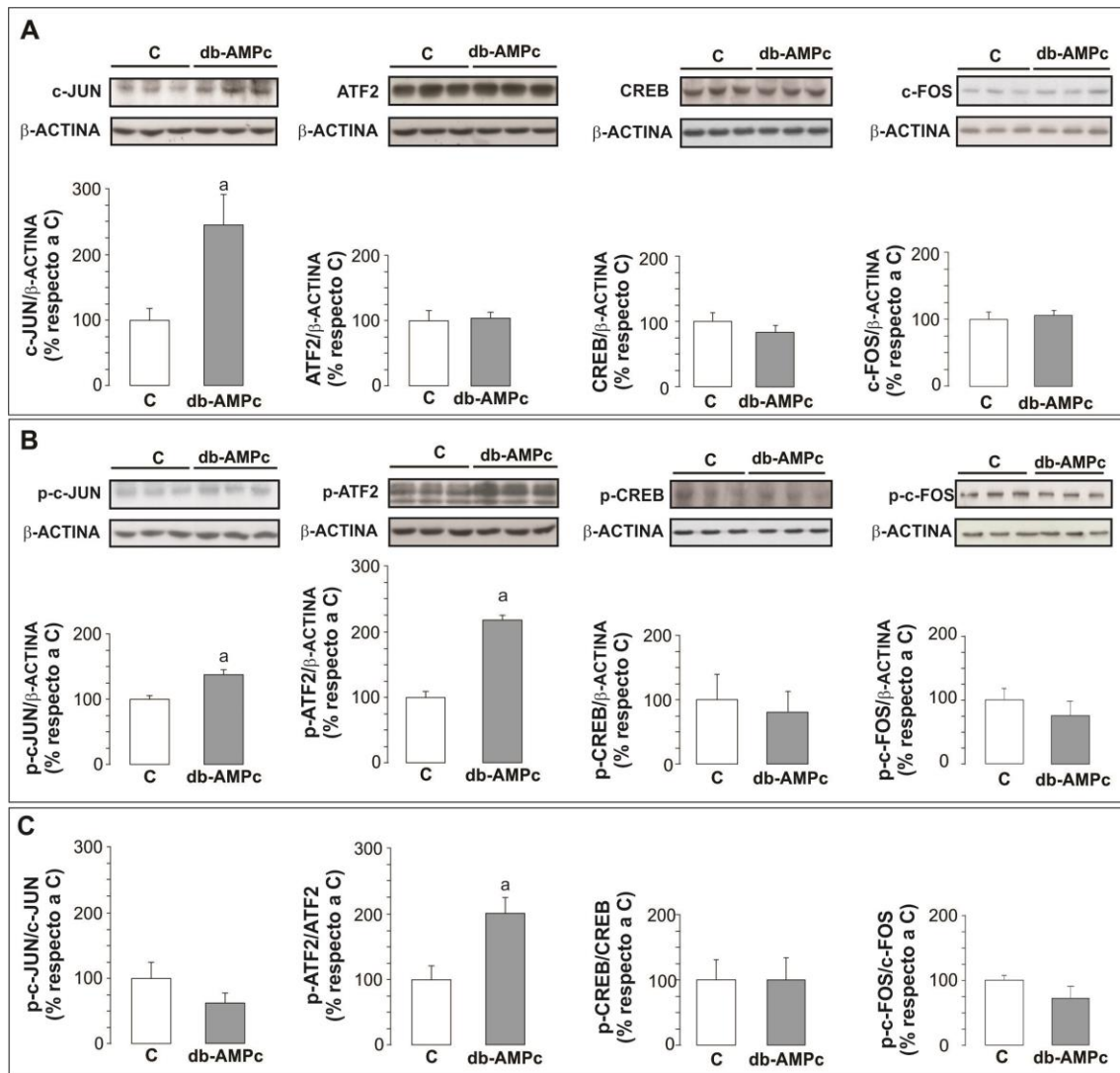


Figura 6.9: Niveles de expresión y fosforilación de factores nucleares en células Caco-2. Las células Caco-2 fueron tratadas con db-AMPc (10 μ M) y se analizaron lisados celulares totales por inmunocuantificación. **A.** Niveles totales de expresión de los factores de transcripción c-JUN, ATF2, CREB y c-FOS. **B.** Niveles de expresión de p-c-JUN, p-ATF2, p-CREB y p-c-FOS. **C.** Relación fosforilada/ total de c-JUN, ATF2, CREB y c-FOS. Se muestra una imagen representativa de cada grupo experimental. Los datos densitométricos fueron relacionados a β -actina y son presentados como porcentaje de las células controles. Los resultados se expresan como la media \pm D.E. de seis experimentos individuales por grupo.

a: significativamente diferente del control ($p < 0,05$).

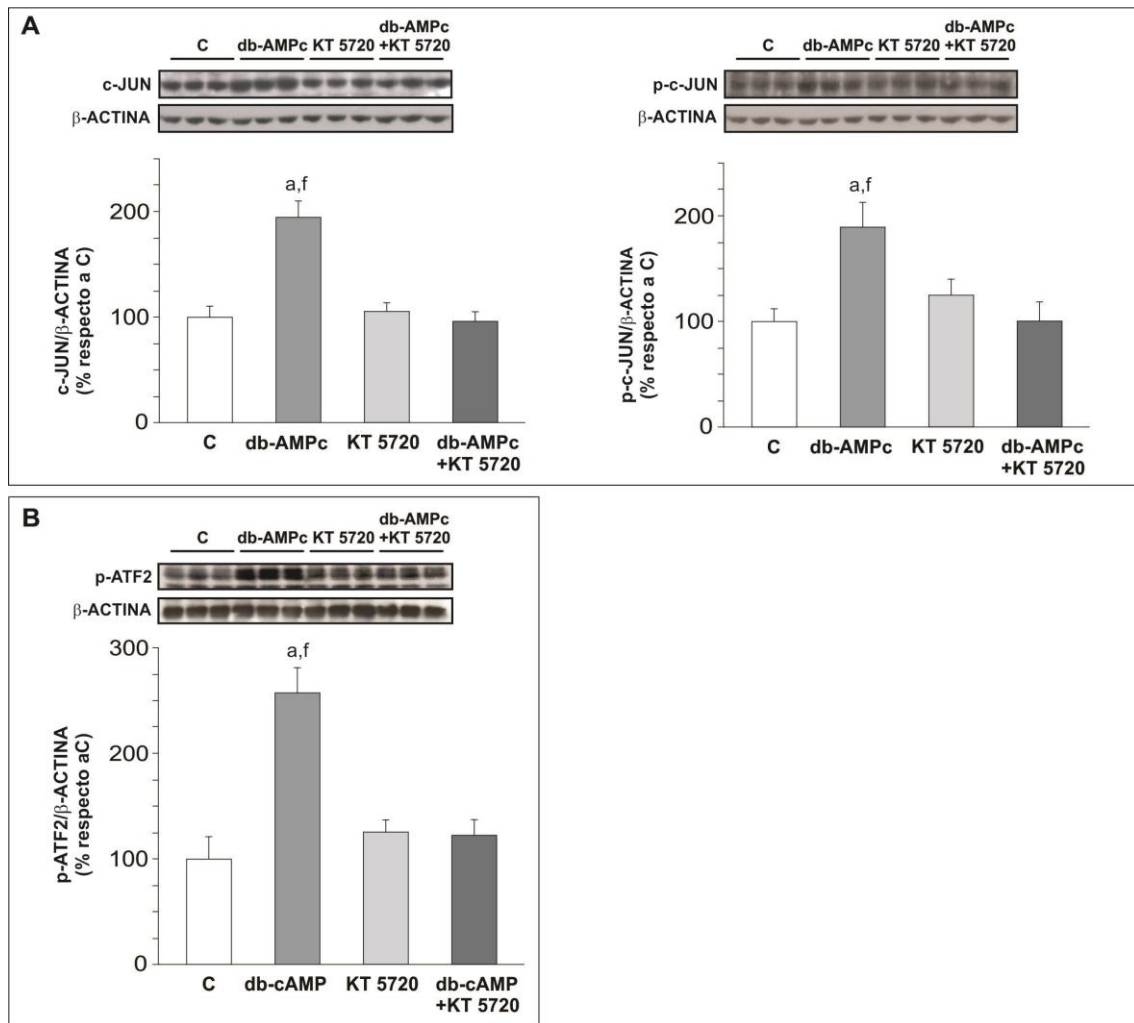


Figura 6.10: Niveles de expresión y fosforilación de factores nucleares en células Caco-2. Se trataron las células Caco-2 con db-AMPc (10 μ M), en presencia y ausencia de KT 5720. Se prepararon lisados totales y se analizaron por inmunocuantificación para la detección de c-JUN o p-c-JUN (panel A) o p-ATF2 (panel B). Se muestra una imagen representativa de cada grupo experimental. Los datos densitométricos fueron relacionados a β -actina y se presentan como porcentaje de las células controles. Los resultados se expresan como media \pm D.E. de 6 experimentos individuales por grupo. a: significativamente diferente del control ($p < 0,05$) y f: significativamente diferente de KT 5720 y db-AMPc + KT5720 ($p < 0,05$).

6.2.6. Efecto de db-AMPc sobre la interacción c-JUN/ATF2 y su unión al promotor de *MRP2*

Los aumentos en la fosforilación de ATF2 y en la expresión y fosforilación de c-JUN sugieren que estos factores son más activos en las células tratadas con db-AMPc que en las células controles. Esto a su vez podría resultar en una mayor interacción mutua, ya que la formación de heterodímeros de estos factores de transcripción es un

factor importante en la activación del promotor de genes blanco [137]–[139]. A continuación, se realizaron estudios de co-immunoprecipitación y se confirmó una mayor fracción de c-JUN co-precipitado con ATF2 en el grupo db-AMPC que en los controles. A su vez confirmamos una mayor fracción de ATF2 co-precipitado con c-JUN en la co-immunoprecipitación inversa (Figura 6.11A). Las inmunoprecipitaciones realizadas con IgG normal de conejo (controles negativos) no mostraron ninguna señal de c-JUN o ATF2 (datos no mostrados). Para evaluar si el heterodímero de c-JUN/ATF2 es reclutado a la región promotora de *MRP2* después del tratamiento con db-AMPC, se realizaron ensayos de ChIP utilizando un par de oligonucleótidos que incluyen la región del promotor de *MRP2* que contiene los sitios de unión putativos CRE y AP-1 previamente identificados (Figura 6.8A). Los datos muestran que los anticuerpos específicos anti c-JUN y anti ATF2 inmunoprecipitaron con éxito a c-JUN o ATF2 con la región (–789/–603) del promotor de *MRP2* en las células tratadas con db-AMPC, mientras que no se observaron bandas para las células control (Figura 6.11B). Las inmunoprecipitaciones realizadas con IgG normal de conejo no lograron precipitar la región promotora de *MRP2*, en células controles o tratadas db-AMPC.

Teniendo en cuenta que ATF2 se expresa constitutivamente [140] y que db-AMPC no afectó su expresión y en cambio afectó la expresión de c-JUN en nuestras condiciones experimentales, se propuso explorar si la sobreexpresión de c-JUN podría imitar por sí misma la inducción de *MRP2* como fue observado en células tratadas db-AMPC. Los resultados demuestran que la sobreexpresión de c-JUN produjo la inducción del ARNm de *MRP2* en una medida similar a la obtenida bajo condiciones de tratamiento con db-AMPC (Figura 6.11C y Figura 6.4C).

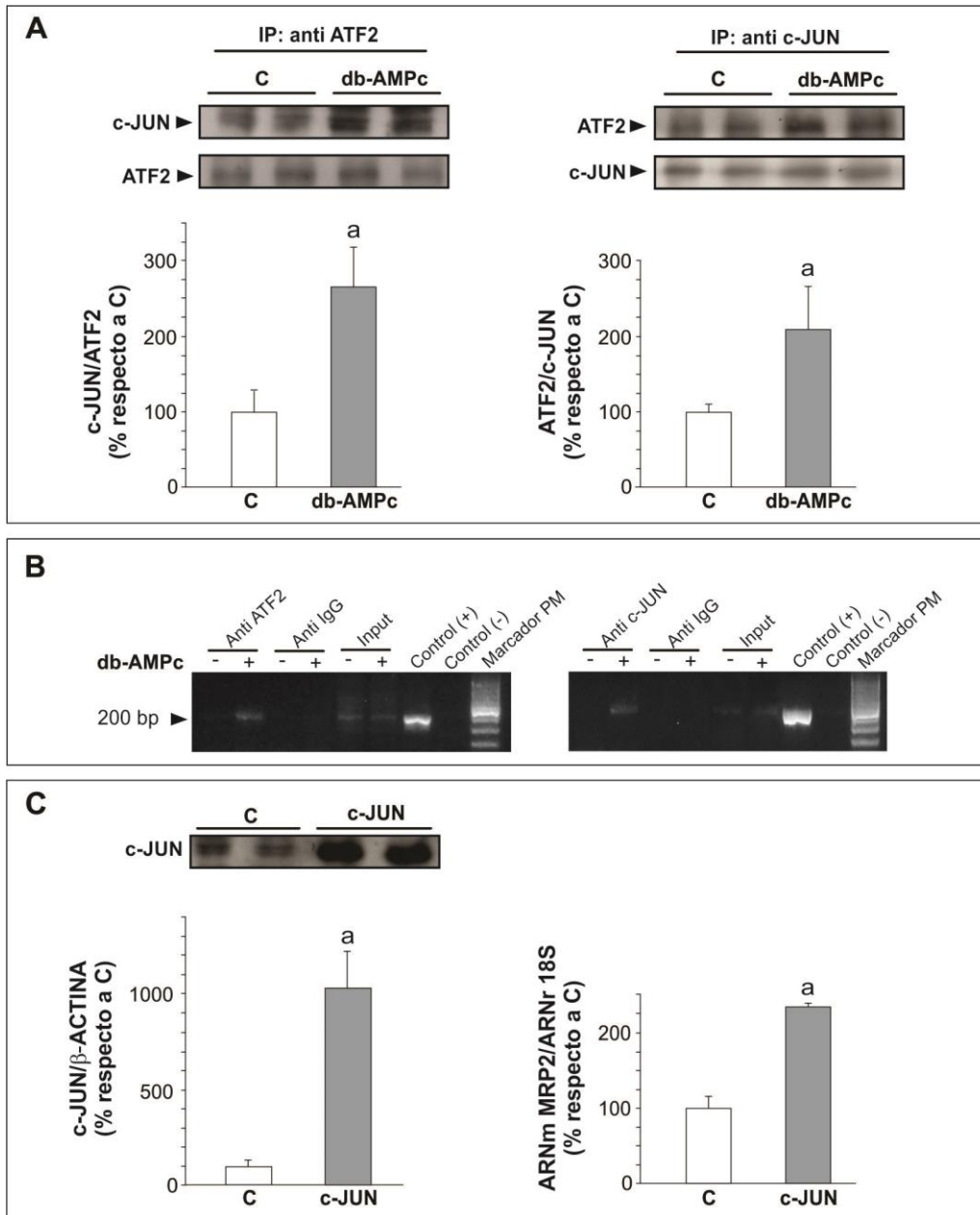


Figura 6.11: Formación de heterodímeros c-JUN/ATF2 y unión al promotor de *MRP2*. Sobreexpresión de c-JUN y expresión de *MRP2*. **A.** Co-immunoprecipitación de factores de transcripción c-JUN y ATF2. Lisados totales de células Caco-2 control y tratados con db-AMPc (10 μ M) fueron incubados con anticuerpos anti c-JUN o anti ATF2 (como se indica en la parte superior de las imágenes), luego se detectó por inmunocuantificación con el anticuerpo opuesto (banda superior) y se realizó una densitometría, o con el mismo anticuerpo, para controlar la eficiencia de la IP (banda inferior). Se muestra una imagen representativa de cada grupo experimental. Los datos densitométricos fueron relacionados a la proteína utilizada para controlar la eficiencia de la IP y se presentan como porcentaje de las células controles. Los resultados se expresan como media \pm D.E. de 6 experimentos individuales por grupo. **B.** Ensayo de ChIP con los anticuerpos anti c-JUN o anti ATF2 seguidos por PCR utilizando los oligonucleótidos 1 y 2. Control (+) y Control (-) representan los controles positivo y negativo respectivamente e *Input* representa la muestra de partida. **C.** Las células Caco-2 fueron transfectadas con un plásmido de sobreexpresión de c-JUN (o vector vacío) y se detectó por inmunocuantificación de c-JUN para confirmar la sobreexpresión y por RT-qPCR para detectar niveles de ARNm de *MRP2*. Los datos de ARNm de *MRP2* se refirieron al ARNr 18S. Los datos se presentan como porcentaje del control y se expresan como la media \pm D.E. de seis experimentos individuales por grupo.

a: significativamente diferentes del control ($p < 0,05$).

6.3. CONCLUSIÓN PARCIAL III

Los resultados obtenidos en esta sección indican que GLP-2 produce un incremento de AMPc intestinal en la rata *in vivo*. Por otro lado fue posible evidenciar un aumento de los niveles de AMPc en el extremo de la vellosidad, en ausencia de células enteroendócrinas, sugiriendo fuertemente la asociación entre inducción de Mrp2 y aumento de AMPc en el enterocito.

A continuación se confirmó que el AMPc es capaz de mediar el aumento de MRP2 en células Caco-2. En dicha respuesta es necesaria la activación de PKA y la participación de los factores nucleares c-JUN y ATF-2. Estos últimos dimerizan y se unen a la región promotora proximal de *MRP2*, induciendo la transcripción.

7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

7.1. Discusión I

Las acciones de la hormona enterotrófica GLP-2 en el intestino y otros tejidos, incluyendo la interacción con su receptor y posterior vía de señalización, han sido ampliamente estudiadas [88], [94]. Estas acciones están asociadas con procesos fisiológicos relevantes tales como desarrollo, lactancia, regeneración de tejidos, etc. Recientemente, a GLP-2 le fue asignado un papel clínico como potencial agente terapéutico basado en resultados que demuestran su capacidad para proteger al intestino en varios modelos de daño intestinal [88]. Estos efectos beneficiosos fueron asociados con la reducción de la inflamación y el estrés oxidativo, y con la inducción de la proliferación de la cripta y de la mucosa intestinal. Varios estudios han demostrado el efecto beneficioso de GLP-2 en la preservación/reconstitución de la permeabilidad intestinal, demostrando en estos casos la importancia de la conservación de la integridad de las uniones intercelulares [141]–[143]. Sin embargo, no hemos encontrado trabajos que consideren el papel de GLP-2 en la regulación de la barrera transcelular asociada a los transportadores de drogas tales como las proteínas ABC. Esto constituye un tema de relevancia toxicológica y farmacológica ya que los transportadores ABC localizados apicalmente restringen la absorción oral de medicamentos y de contaminantes presentes en los alimentos [6].

La función de los transportadores ABC se ve afectada en varias enfermedades intestinales en los seres humanos, en particular las que cursan con inflamación local o sistémica, como la colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn [144], [145]. Alteraciones similares se encontraron en modelos experimentales en ratas que presentan inflamación y estrés oxidativo como los generados por LPS, la administración de indometacina o nefrectomía parcial [109], [146], [147]. Hasta ahora no se ha estudiado la posibilidad

de un efecto beneficioso de GLP-2 sobre las alteraciones en la función de los transportadores ABC intestinales. Para explorar tal posibilidad, hemos elegido un modelo de inflamación inducido por la administración intraperitoneal de una dosis única de LPS en ratas. Se ha demostrado que en este modelo se encuentra disminuída la expresión y actividad de Mrp2 y P-gp intestinales [109], [110]. En este trabajo de Tesis, se encontró que GLP-2, bajo condiciones de protocolo de prevención, es capaz de neutralizar dicha disminución inducida por LPS tanto en la expresión proteica como en la actividad de Mrp2 y P-gp intestinales. El ARNm de ambos transportadores se encontró disminuido en la endotoxemia. Sin embargo, GLP-2 previno la disminución de los niveles de ARNm de *Mrp2* en ratas endotoxémicas, no así los de *Mdr1a*, la principal variante del gen que codifica para P-gp intestinal. En segundo lugar, el tratamiento con GLP-2 solo indujo los niveles de Mrp2 intestinal tanto a nivel de proteína como de ARNm, mientras que no ocurre lo mismo para P-gp. Por ende, el mecanismo por el cual GLP-2 previene la alteración en la expresión de cada transportador es probablemente diferente. La falta de efecto de GLP-2 en la expresión de P-gp puede deberse al hecho de que GLP-2 ejerce sus acciones principalmente en las regiones proximales del intestino delgado, mientras que los estudios de P-gp se realizaron en íleon distal. La posibilidad de que GLP-2 pueda inducir la expresión de P-gp en yeyuno proximal no fue explorada durante el transcurso de esta Tesis.

Un aspecto importante consiste en el/los mecanismos por los cuales se regula la expresión de estos transportadores intestinales en la endotoxemia y en la prevención evidenciada por GLP-2. Mrp2 y P-gp se expresan en la superficie del enterocito, principalmente en el extremo de la vellosidad. Los procesos inflamatorios pueden resultar en la pérdida del epitelio intestinal, siendo la región superior de las vellosidades la más susceptible. Evaluamos entonces, si el tratamiento con LPS afecta

la integridad del epitelio y si GLP-2 es capaz de proteger de tales alteraciones. Esto es de especial interés teniendo en cuenta que el GLP-2 tiene la propiedad de regular la proliferación y regeneración del epitelio intestinal en diferentes condiciones fisiológicas y fisiopatológicas [88], [92], [93]. El análisis de la estructura y morfología intestinal y del contenido de villina en los 4 grupos experimentales sugiere la preservación de la integridad de la superficie de la vellosidad. Estos resultados indican que la pérdida de función de Mrp2 y P-gp en el grupo LPS no es producida por alteraciones erosivas del epitelio, sino más bien se debe a una regulación específica que estaría actuando sobre ambos transportadores. Por otra parte, la ausencia de alteraciones edematosas en la estructura de las vellosidades en el grupo LPS+GLP-2, tal como se evidencia en el grupo LPS, es consistente con el efecto protector de GLP-2 sobre el fenómeno inflamatorio, como fuera previamente reportado [148], [149].

En cuanto al mecanismo regulatorio, se encontró una correlación general entre el contenido de proteína y los niveles de ARNm, señalando la participación de mecanismos transcripcionales en la acción de LPS y/o GLP-2. Sin embargo, esto no es determinante y es posible que mecanismos postranscripcionales también estén implicados. En particular, un mecanismo de regulación postraduccional que conduce a disminución de la actividad de transporte podría resultar de la internalización endocítica del transportador [150], [151]. Varios estudios demostraron que los transportadores ABC son sujetos a este tipo de regulación asociado a cambios en la localización subcelular del transportador [135]. Por dicho motivo, hemos analizado la localización de Mrp2 y P-gp por microscopía confocal. Observamos una significativa alteración en el patrón de localización de ambos transportadores en el grupo LPS, que no se observa en los otros grupos. Dichas alteraciones consistieron en la detección irregular de los transportadores en la superficie de la vellosidad, con pérdida parcial de

la señal de fluorescencia. Además, la detección de la fluorescencia de Mrp2 y P-gp en la proximidad de los núcleos sugiere la internalización endocítica de los transportadores. Estos resultados podrían explicar la pérdida de actividad de transporte además de la disminución en la expresión detectada por inmunocuantificación. Mrp2 parece ser más afectada por este proceso ya que su fluorescencia fue casi imperceptible en la superficie de la vellosidad. Esto podría explicar por qué la presencia de un inhibidor de proteínas Mrp en los ensayos de actividad no logró disminuir el transporte de DNP-SG remanente en el grupo de LPS. A pesar de la severidad de estas alteraciones, la localización de Mrp2 se normalizó completamente por GLP-2 bajo el protocolo preventivo. Lo más importante a destacar es que la función de ambos transportadores se normalizó completamente por este mismo protocolo.

La inflamación y estrés oxidativo resultante de diferentes situaciones fisiopatológicas pueden regular los transportadores ABC intestinales, incluyendo Mrp2 y P-gp [144], [152]. Aunque las vías de señalización de esta regulación se han descrito parcialmente, generalmente resultan en la regulación a nivel transcripcional de los transportadores ABC. LPS causa inflamación y estrés oxidativo, con la participación de mediadores como citoquinas proinflamatorias, NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) e iNOS (óxido nítrico sintasa inducible) [153]. Así, es posible que uno o más de estos mediadores estén implicados en la regulación de Mrp2 y P-gp actualmente observada para el grupo LPS. El hecho de que el GLP-2 proteja el intestino de las alteraciones asociadas con la inflamación y estrés oxidativo [88] apoya la posibilidad de que los efectos preventivos de la hormona provengan de inhibir estas mismas vías de señalización. Observamos que GLP-2 fue capaz de prevenir el aumento inducido por LPS de IL-1 β y del cociente GSSG/GSH intestinales. Consideramos que GSSG es sustrato de Mrp2 y que el incremento de sus

niveles en el grupo LPS podría ser consecuencia de la disminución en la actividad de Mrp2, más que una causa de dicha disminución. La observación de valores normales de lipoperoxidación en el grupo LPS sugiere la posibilidad de que el estrés oxidativo producido por el tratamiento con LPS sea moderado. En este trabajo de Tesis no se continuó con el estudio de la participación del estrés oxidativo en la regulación de Mrp2 y P-gp intestinales en la endotoxemia experimental.

En contraste con el protocolo de prevención, el protocolo de reversión, que consta de la administración de dos dosis de GLP-2, después de la inyección de LPS, no logró recuperar la expresión de Mrp2 y P-gp. Se eligió comenzar con el tratamiento 3 h después de suministrar el LPS ya que en dicho momento la inflamación sistémica y el daño intestinal se encuentran ya establecidos. Por ejemplo, los niveles de citoquinas pro-inflamatorias se han encontrado aumentadas tan pronto como 3 h después de la administración de LPS [154], [155]. Es posible, entonces, que altos niveles de GLP-2 deban preceder a las alteraciones generadas por LPS para ejercer una acción protectora, una condición compatible con el protocolo de prevención. En el caso particular de Mrp2, GLP-2 administrado sólo no pudo producir cambios en la expresión de la proteína o ARNm, en contraste con la inducción observada para el protocolo de prevención. Claramente, más de dos dosis de GLP-2 son necesarias para modular la expresión de Mrp2. Además, esto podría explicar por qué el protocolo de reversión no restaura las alteraciones observadas en Mrp2 en la endotoxemia.

7.2. Discusión II

En la etapa siguiente nos enfocamos en dilucidar el rol de IL-1 β como mediador de la pérdida de expresión y actividad de Mrp2 y P-gp producidos por LPS. Cabe destacar que Dietrich y col. (2004) [132] propusieron la participación de IL-1 β en la

regulación transcripcional y postranscripcional de Mrp2 intestinal en el modelo de colestasis por ligadura de colédoco. Demostraron además que IL-1 β no estaría involucrado en la regulación de P-gp en las mismas condiciones. En concordancia con estos antecedentes, en este trabajo de Tesis el empleo de un anticuerpo anti-IL-1 β permitió relacionar a IL-1 β con la regulación de Mrp2 intestinal en la endotoxemia, mientras que no estaría involucrado en la regulación de P-gp. A pesar de las similitudes con el trabajo de Dietrich y col. (2004) [132], que utiliza el modelo de ligadura de colédoco, cabe resaltar una diferencia fundamental. Ellos observan que la inactivación de IL-1 β permite recuperar completamente la expresión de Mrp2 a nivel de ARNm y proteína, en cambio nosotros observamos una recuperación sólo parcial de los niveles proteicos de Mrp2 y su actividad asociada, sin cambio en los niveles de ARNm de *Mrp2*. Proponemos dos explicaciones posibles para estas diferencias. La primera es que la recuperación observada sea parcial debido a que la neutralización con el anticuerpo anti IL-1 β no fue completa, dejando en evidencia un efecto remanente de IL-1 β sobre la expresión y actividad de Mrp2. La segunda posibilidad consiste en que el mecanismo de regulación de Mrp2 en ambos modelos difiera, aunque ambos incluyan una componente inflamatoria. Esta segunda opción parece ser más atractiva, ya que explica la falta de recuperación en los niveles de ARNm ante el tratamiento con el anticuerpo a-IL-1 β . En este caso, probablemente haya otro intermediario responsable de la regulación a nivel transcripcional de Mrp2 y posiblemente también responsable de la regulación de P-gp. Todo indicaría que Mrp2 es regulado, al menos en parte, a nivel postranscripcional por IL-1 β . En efecto, el estudio de la localización del transportador mostró que a-IL-1 β es capaz de restablecer la localización de Mrp2 en la región apical del enterocito, a diferencia de la región perinuclear como se observó para el grupo LPS.

El pasaje a un modelo *in vitro* nos confiere dos ventajas: una, independizar al enterocito de otros tipos celulares y aislar el efecto sobre MRP2 y dos, examinar la regulación de MRP2 en un modelo humano. Respecto a esto, Dietrich y col. (2004) [132] observaron que MRP2 era regulada sólo a nivel postranscripcional en pacientes con colestasis obstructiva. En nuestro estudio observamos que ante el tratamiento con IL-1 β la expresión de MRP2 en MCT disminuye luego de 24 h. Existen dos posibilidades, que IL-1 β en Caco-2 regule a nivel transcripcional la expresión de MRP2 o que una internalización sostenida en el tiempo, derive el transportador a compartimientos endosomales tardíos y a la degradación acelerada del mismo, disminuyendo su vida media. Considerando que en ratas IL-1 β no parece estar involucrado en una regulación transcripcional en respuesta a LPS y tampoco en humanos durante la colestasis obstructiva [132], surgió el interés de evaluar el efecto de la citoquina sobre la localización de MRP2 en la línea celular Caco-2 en forma más directa. Como resultado observamos que efectivamente IL-1 β produce internalización del transportador durante el tratamiento agudo. Resta evaluar si existe adicionalmente una regulación a nivel transcripcional en células Caco-2, por ejemplo determinando los niveles de ARNm en respuesta al tratamiento con IL-1 β en periodos más prolongados (ej. 24 h).

7.3. Discusión III

La observación de que GLP-2 induce Mrp2 a nivel de proteína y ARNm [96] sugiere la posibilidad de una regulación transcripcional, la cual además podría explicar en parte el efecto preventivo de GLP-2 sobre la pérdida de expresión y actividad de Mrp2 en la endotoxemia. GLP-2 actuaría presuntamente mediante su receptor asociado a proteína G, el cual activa adenilato ciclasa. La inhibición de adenilato ciclasa,

mediante el uso de DDA, y la pérdida del efecto inductor sobre la expresión de Mrp2 confirman la mediación de AMPc. GLP-2 indujo un incremento de AMPc intestinal *in vivo*. Lo más importante a destacar es que este incremento se produjo principalmente en el extremo de la vellosidad aún en ausencia de células enteroendócrinas, sugiriendo fuertemente la asociación entre la inducción de Mrp2 y el aumento de AMPc en el enterocito. La presencia de GLP-2R en el enterocito no ha sido confirmada y el mecanismo por el cual GLP-2 induce la expresión de AMPc en el extremo de la vellosidad, particularmente en el enterocito, no queda claro. Con la finalidad de independizarnos de este problema y estudiar la posible vía de señalización por la cual GLP-2 induce transcripcionalmente a MRP2, realizamos estudios en células Caco-2 tratadas con db-AMPc, un análogo permeable del AMPc.

El tratamiento con db-AMPc (48 h) indujo la expresión (proteína y ARNm) de MRP2. Más aún, la producción endógena de AMPc utilizando un activador de adenilato ciclasa, forskolina, produjo efectos similares sobre la expresión de MRP2. Estos resultados confirman que en células epiteliales intestinales la activación de adenilato ciclasa y consecuente aumento de AMPc pueden inducir la expresión de MRP2.

PKA es considerado un mediador esencial de una amplia gama de efectos fisiológicos iniciados por el aumento de los niveles intracelulares de AMPc. Para investigar la participación de PKA en la inducción de MRP2, utilizamos inhibidores específicos de PKA, H89 y KT 5720, y encontramos que suprimen los efectos de db-AMPc sobre la expresión de MRP2. Por otro lado, utilizamos actinomicina D, un inhibidor de la ARN polimerasa II, confirmando la regulación a nivel transcripcional de MRP2. Estas observaciones indican colectivamente que db-AMPc estimula la transcripción del gen *MRP2* en células Caco-2 en una forma PKA-dependiente.

Cuando PKA es activada puede fosforilar proteínas blanco en residuos de aminoácidos específicos [156]. La familia de factores de transcripción de CREB se ha implicado clásicamente en la regulación génica por AMPc [157]. Sin embargo, en este trabajo de Tesis encontramos que ni la expresión total de CREB ni su estado de fosforilación se modificaron por el tratamiento con db-AMPc. La familia AP-1 pertenece a un grupo de factores de transcripción con dominio de cremallera de leucina que forman homo o heterodímeros, compuestos por subunidades de JUN, FOS o ATF. Los complejos AP-1 resultantes pueden asociarse a secuencias consenso AP-1 o CRE [140], [158] y participan en diversos procesos biológicos que incluyen la proliferación celular, supervivencia y diferenciación [140]. Como resultado de la evaluación de la expresión de las subunidades de AP-1, observamos que sólo la expresión c-JUN aumenta luego del tratamiento con db-AMPc. Puesto que la fosforilación se correlaciona con mayor actividad transcripcional de las subunidades AP-1 [140], [158], también se evaluó su nivel de fosforilación. Los datos indican que los niveles de fosforilación de c-JUN y ATF2, pero no de c-FOS aumentan por el tratamiento con db-AMPc. ATF2 se expresa constitutivamente y requiere la activación por fosforilación para regular la transcripción [159]. En cambio, la actividad de c-JUN, además de ser regulada por cambios en su estado de fosforilación, suele ser regulada por cambios en su expresión [140]. Los miembros de la familia AP-1 son frecuentemente mediadores de las vías de señalización dependientes de AMPc/PKA [137]–[139], [160]. Experimentos realizados en presencia de un inhibidor de PKA confirman la participación de PKA en la activación de c-JUN y ATF2. Aunque la fosforilación directa de c-JUN o ATF2 por PKA no ha sido demostrada aún, se han identificado quinasas adicionales como mediadores entre los factores de transcripción y PKA; por ejemplo JNK1, p38 y PI3K [161], [162].

En vista de estos resultados, consideramos la posibilidad de que la activación de factores de transcripción mediada por PKA, en última instancia conduce a mayor interacción con el promotor de *MRP2*. Inicialmente realizamos un análisis *in silico* de 1090 bp de la región promotora proximal de *MRP2*. Esto nos permitió identificar sitios de unión a factores de transcripción, CRE y AP-1, que podrían estar implicados en la regulación transcripcional de *MRP2* por AMPc. Ensayos en células transfectadas con una construcción de un gen reportero conteniendo el fragmento del promotor de *MRP2*, confirmaron la participación de este fragmento en nuestras condiciones experimentales. Además, el agregado de KT 5720 confirmó una vez más la mediación de PKA.

Las subunidades de AP-1 como c-JUN y ATF-2 suelen frecuentemente formar heterodímeros para adquirir una actividad transcripcional eficiente [163]. Confirmamos el aumento en la formación de heterodímeros c-JUN/ATF2 en respuesta al tratamiento con db-AMPc por ensayos de co-inmunoprecipitación. Más importante aún, el análisis de ChIP muestra que, después del tratamiento con db-AMPc, el complejo c-JUN/ATF2 se asocia al fragmento promotor de *MRP2* que contiene sitios de unión CRE y AP-1. Los complejos AP-1 además de regular la expresión de varios genes, también autorregulan la expresión de subunidades AP-1, lo que aumenta su abundancia para amplificar las señales a los estímulos externos. La autorregulación constituye una estrategia adicional para modular la composición y función biológica de los dímeros de AP-1 [164]. En este sentido, se observó que el heterodímero de c-JUN/ATF2 induce la expresión de c-JUN a través de la activación transcripcional del promotor de c-JUN [165]. Mediante la sobreexpresión de c-JUN en células Caco-2 establecimos la relación entre el aumento de expresión de c-JUN y el aumento de la expresión de *MRP2*, sugiriendo que la inducción de c-JUN puede ser un participante clave en la respuesta a db-AMPc. En conjunto los datos apoyan nuestro postulado de que c-JUN y ATF2,

miembros de la familia AP-1, son participantes necesarios en la regulación transcripcional de MRP2 por AMPc/PKA.

7.4. CONCLUSIÓN GENERAL

En el transcurso de esta Tesis confirmamos que el LPS en una dosis i.p. de 5 mg/kg de peso corporal induce una disminución en la expresión de los transportadores Mrp2 y P-gp en membrana apical de intestino delgado de rata. Además se confirmó que la expresión reducida se refleja también en una disminución de la actividad de transporte seroso-mucoso de un sustrato modelo de cada uno de los transportadores evaluados, DNP-SG para Mrp2 y R123 para P-gp. Por un lado, observamos que LPS disminuye los niveles de ARNm de ambos transportadores. Por otro lado, pudimos observar por microscopia confocal que LPS tiene efectos no sólo sobre la expresión de ambos transportadores sino también sobre la localización subcelular de los mismos. LPS produjo la internalización de los transportadores en vesículas endocíticas, contribuyendo así a la disminución de la actividad. Estas observaciones señalan que los cambios a nivel proteico de los transportadores resultan complejos y dependen de una regulación tanto a nivel transcripcional como postranscripcional. Determinamos además que IL-1 β media la regulación postraduccional observada para Mrp2, contribuyendo a la pérdida de expresión del transportador, probablemente debido al pasaje del transportador de la membrana a compartimientos endosomales. Determinamos también que IL-1 β no media la regulación de P-gp, ni la regulación a nivel transcripcional de Mrp2.

Probamos que los efectos del LPS sobre la expresión de ambos transportadores pueden ser prevenidos mediante un tratamiento con GLP-2, consistente en 7 dosis de 125 μ g/kg de peso corporal por vía s.c. separadas cada 12 h y durante 72 h.

Determinamos además que el efecto preventivo sobre los cambios de expresión se traduce también en un mantenimiento de la capacidad de transporte.

Se probó también un modelo de tratamiento de reversión con GLP-2 que comenzó 3 h después de la inyección con LPS y consistió en 2 dosis de 125 µg/kg de peso corporal por vía s.c. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que este tratamiento no recupera los niveles de Mrp2 ni P-gp a nivel de proteína ni ARNm. Es posible que dos dosis de GLP-2 no sean suficientes para inducir la expresión de los transportadores.

Por otro lado, GLP-2 por sí mismo y bajo condiciones de tratamiento equivalentes al protocolo de prevención tiene la capacidad de inducir la expresión del ARNm de *Mrp2*, no así la de P-gp. Considerando que AMPc emerge como un posible mediador de la respuesta a GLP-2 en el enterocito, estudiamos el mecanismo molecular de la regulación transcripcional de MRP2 por db-AMPc en células Caco-2. Proponemos entonces la posible vía de regulación transcripcional de MRP2: Luego de producirse un aumento de AMPc intracelular, se activa PKA que a continuación activa, de forma directa o indirecta, los factores de transcripción c-JUN y ATF2. Estos factores forman homo o heterodímeros que pueden unirse a sitios regulatorios AP-1 y CRE. Encontramos sitios de este tipo en la región (-789/-603) del promotor de *MRP2*, los cuales unieron c-JUN y ATF2 en nuestras condiciones experimentales. Estos factores nucleares median entonces el aumento de la transcripción y posterior expresión y actividad de MRP2. Esta vía se ilustra en la Figura 7.1.

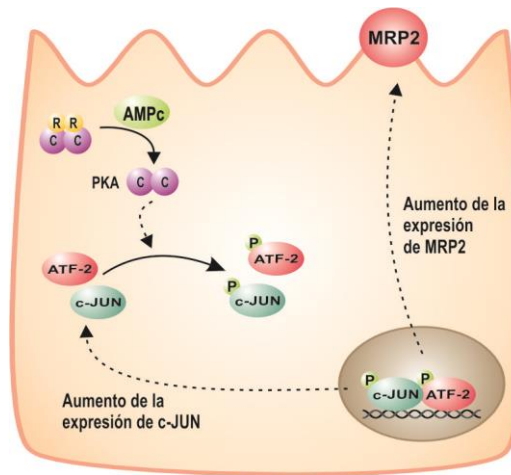


Figura 7.1: Regulación de MRP2 por AMPc. El aumento de AMPc en el enterocito desencadena la activación de PKA. La forma activa de esta quinasa fosforila sus proteínas blanco en residuos de Ser o Thr. Así PKA activa por fosforilación a ATF-2 y c-JUN de forma directa o indirecta por medio de otras quinasas (como p38 o PI3K). En su forma fosforilada estos factores forman heterodímeros y se unen a regiones regulatorias de genes blanco. En particular, se asocian a sitios AP-1 y CRE de la región (-789/-603) del promotor de *MRP2* y posiblemente también al promotor de *c-JUN*. Finalmente, el aumento de la transcripción de *MRP2* resulta en un aumento de la expresión del transportador en la membrana apical y de su actividad.

Esta vía puede mediar además la acción de un amplio espectro de moléculas como hormonas, citoquinas y drogas terapéuticas que conlleven a aumento de AMPc, pudiendo resultar en una regulación de la barrera bioquímica intestinal en una gran variedad de situaciones fisiológicas, patológicas y farmacológicas.

Teduglutide, un análogo de acción prolongada de GLP-2, ha sido aprobado para el tratamiento del síndrome de intestino corto en EE.UU. y Europa (Gattex y Revestive, respectivamente; NPS Pharmaceuticals, grupo norteamericano de Shire), y desde entonces se han realizado diversos estudios clínicos [166]–[168]. Este medicamento resultó eficaz para mejorar la adaptación al daño intestinal, mejorar deficiencias de absorción de nutrientes y al mismo tiempo para restablecer la función de barrera epitelial. Este trabajo de Tesis sugiere que la modulación de estos importantes transportadores de eflujo apicales puede representar un efecto beneficioso adicional de GLP-2 bajo condiciones de inflamación, que contribuyan a restaurar la barrera transcelular, limitando así la absorción de compuestos potencialmente tóxicos.

BIBLIOGRAFIA

- [1] M. Hayashi, M. Tomita, and S. Awzu, "Transcellular and paracellular contribution to transport processes in the colorectal route.," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 28, pp. 191–204, 1997.
- [2] J. Hunter and B. Hirst, "Intestinal secretion of drugs. The role of P-glycoprotein and related drug efflux systems in limiting oral drug absorption.," *Adv. Drug Del. Rev.*, vol. 25, pp. 129–157, 1997.
- [3] R. Evers *et al.*, "Drug export activity of the human canalicular multispecific organic anion transporter in polarized kidney MDCK cells expressing cMOAT (MRP2) cDNA.," *J Clin Invest.*, vol. 101, pp. 1310–1319, 1998.
- [4] M. F. Fromm *et al.*, "The Effect of Rifampin Treatment on Intestinal Expression of Human MRP Transporters," vol. 157, no. 5, pp. 1575–1580, 2000.
- [5] L. He, K. Vasiliou, and D. Nebert, "Analysis and update of the human solute carrier (SLC) gene superfamily.," *Hum Genomics.*, vol. 3, pp. 195–206, 2009.
- [6] C. G. Dietrich, "ABC of oral bioavailability: transporters as gatekeepers in the gut," *Gut*, vol. 52, no. 12, pp. 1788–1795, 2003.
- [7] Z. Chen, T. Shi, L. Zhang, P. Zhu, and M. Deng, "Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance : A review of the past decade," *Cancer Lett.*, vol. 370, no. 1, pp. 153–164, 2016.
- [8] R. L. Juliano and V. Ling, "A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants.," *Biochim Biophys Acta*, vol. 455, pp. 152–162, 1976.
- [9] A. Schinkel and P. Borst, "Multidrug resistance mediated by P-glycoproteins.," *Semin Cancer Biol.*, vol. 2, pp. 213–226, 1991.
- [10] C. Cordon-cardo *et al.*, "Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites.," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 86, pp. 695–698, 1989.
- [11] D. Merkel, S. Fuqua, and W. McGuire, "P-glycoprotein in breast cancer.," *Cancer Treat Res.*, vol. 48, pp. 97–105, 1989.
- [12] A. Fojo, D. Shen, L. Mickley, I. Pastan, and M. Gottesman, "Intrinsic drug resistance in human kidney cancer is associated with expression of a human multidrug-resistance gene.," *J Clin Oncol.*, vol. 5, pp. 1922–1927, 1987.
- [13] Z. Gatmaitan and I. Arias, "Structure and function of P-glycoprotein in normal liver and small intestine.," *Adv Pharmacol.*, vol. 24, pp. 77–97, 1993.
- [14] D. Begley *et al.*, "Functional expression of P-glycoprotein in an immortalised cell line of rat brain endothelial cells, RBE4.," *J Neurochem.*, vol. 67, pp. 988–995, 1996.
- [15] C. Lee, "Induction of P-glycoprotein mRNA transcripts by cycloheximide in animal tissues: evidence that class I Pgp is transcriptionally regulated whereas class II Pgp is post-transcriptionally regulated.," *Mol Cell Biochem.*, vol. 216, p. 103–110., 2001.
- [16] A. Tsuji *et al.*, "P-glycoprotein as the drug efflux pump in primary cultured bovine brain capillary endothelial cells.," *Life Sci.*, vol. 51, pp. 1427–1437, 1992.
- [17] V. Rao *et al.*, "Choroid plexus epithelial expression of MDR1 P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein contribute to the blood-cerebrospinal- fluid drug-permeability barrier.," *Proc Natl Acad Sci USA.*, vol. 96, pp. 3900–3905, 1999.
- [18] F. Ushigome *et al.*, "Human placental transport of vinblastine, vincristine, digoxin and progesterone: contribution of P-glycoprotein.," *Eur J Pharmacol.*, vol. 408, pp. 1–10, 2000.

- [19] T. Terao, E. Hisanaga, Y. Sai, I. Tamai, and Tsuji A., "Active secretion of drugs from the small intestinal epithelium in rats by P-glycoprotein functioning as an absorption barrier.," *J Pharm Pharmacol.*, vol. 48, pp. 1083–1089, 1996.
- [20] F. Thiebaut, T. Tsuruo, H. Hamada, M. Gottesman, I. Pastan, and M. Willingham, "Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues.," *Proc Natl Acad Sci USA.*, vol. 84, pp. 7735–7738, 1987.
- [21] A. Tsuji and I. Tamai, "Carrier-mediated intestinal transport of drugs.," *Pharm Res.*, vol. 13, pp. 963–977, 1996.
- [22] M. Ceckova-novotna, P. Pavek, and F. Staud, "P-glycoprotein in the placenta: Expression, localization, regulation and function," vol. 22, pp. 400–410, 2006.
- [23] A. Schinkel, "The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins.," *Semin Cancer Biol.*, vol. 8, p. 161–170., 1997.
- [24] A. Schinkel, E. Wagenaar, C. Mol, and L. van Deemter, "P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs.," *J Clin Invest.*, vol. 97, p. 2517–2524., 1996.
- [25] J. Hunter, M. Jepson, T. Tsuruog, N. Simmons, and B. Hirst, "Functional Expression of P-glycoprotein in Apical Membranes of Human Intestinal Caco-2 Cells," vol. 268, no. 20, pp. 14991–14997, 1993.
- [26] J. Hunter, B. Hirst, and N. Simmons, "Drug absorption limited by P-glycoprotein-mediated secretory drug transport in human intestinal epithelial Caco-2 cell layers.," *Pharm Res.*, vol. 10, p. 743–749., 1993.
- [27] J. Karlsson, S. Kuo, J. Ziemniak, and P. Artursson, "Transport of celiprolol across human intestinal epithelial (Caco-2) cells: mediation of secretion by multiple transporters including P-glycoprotein.," *Br J Pharmacol.*, vol. 110, p. 1009–1016., 1993.
- [28] M. Cavet, M. West, and N. Simmons, "Transport and epithelial secretion of the cardiac glycoside, digoxin, by human intestinal epithelial (Caco-2) cells.," *Br J Pharmacol.*, vol. 118, pp. 1389–1396, 1996.
- [29] M. Takano, R. Hasegawa, T. Fukuda, R. Yumoto, J. Nagai, and T. Murakami, "Interaction with P-glycoprotein and transport of erythromycin, midazolam and ketoconazole in Caco-2 cells.," *Eur J Pharmacol.*, vol. 358, pp. 289–294, 1993.
- [30] I. Cascorbi, "P-glycoprotein: Tissue Distribution, Substrates, and Functional Consequences of Genetic Variations," *Drug Transporters, Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 261–283, 2011.
- [31] Y. Tanigawara, "Role of P-glycoprotein in drug disposition.," *Ther Drug Monit.*, vol. 22, pp. 137–140, 2000.
- [32] J. J. Eloranta and G. A. Kullak-ublick, "Coordinate transcriptional regulation of bile acid homeostasis and drug metabolism," vol. 433, pp. 397–412, 2005.
- [33] T. Kawamoto, T. Sueyoshi, I. Zelko, R. Moore, K. Washburn, and M. Negishi, "Phenobarbital-Responsive nuclear translocation of the receptor CAR in induction of the CYP2B gene," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 19, no. 9, pp. 6318–6322, 1999.
- [34] L. Cerveny *et al.*, "Valproic acid induces CYP3A4 and MDR1 gene expression by activation of constitutive androstane receptor and pregnane X receptor pathways.," *Drug Metab. Dispos.*, vol. 35, no. 7, p. 1032–1041., 2007.
- [35] H. R. Kast *et al.*, "Regulation of Multidrug Resistance-associated Protein 2 (ABCC2) by the Nuclear Receptors Pregnane X Receptor, Farnesoid X-activated Receptor, and Constitutive Androstane Receptor," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 4, pp. 2908–2915, 2002.

- [36] C. Traversari, S. Sozzani, K. R. Steffensen, and V. Russo, "LXR Dependent and Independent effects of oxysterols on immunity and tumor growth.," *Eur. J.Immunol.*, vol. 44, no. 7, pp. 1896–1903, 2014.
- [37] V. Vollrath, A. M. Wielandt, M. Iruretagoyena, and J. Chianale, "Role of Nrf2 in the regulation of the Mrp2 (ABCC2) gene," *Biochem. J.*, vol. 395, no. 3, pp. 599–609, 2006.
- [38] P. Borst and R. Elferink, "Mammalian ABC transporters in health and disease.," *Annu Rev Biochem.*, vol. 71, p. 537–592., 2002.
- [39] S. Jin and K. Scotto, "Transcriptional Regulation of the MDR1 Gene by Histone Acetyltransferase and Deacetylase Is Mediated by NF-Y," *Mol.Cell.Biol.*, vol. 18, no. 7, pp. 4377–4384, 1998.
- [40] K. Chin, S. Tanaka, G. Darlington, I. Pastan, and M. Gottesman, "Heat Shock and Arsenite Increase Expression of the Multidrug Resistance (LMDR1) Gene in Human Renal Carcinoma Cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 265, no. 1, pp. 221–226, 1990.
- [41] F. Zhou, "Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition," *Xenobiotica*, vol. 38, no. 7–8, pp. 802–832, 2008.
- [42] A. Geick, M. Eichelbaum, and O. Burk, "Nuclear Receptor Response Elements Mediate Induction of Intestinal MDR1 by Rifampin," *J Biol Chem.*, vol. 276, no. 18, pp. 14581–14587, 2001.
- [43] I. Haslam, K. Jones, T. Coleman, and N. Simmons, "Rifampin and digoxin induction of MDR1 expression and function in human intestinal (T84) epithelial cells.," *Br J Pharmacol.*, vol. 154, pp. 246–255, 2008.
- [44] R. Watkins *et al.*, "The human nuclear xenobiotic receptor PXR: structural determinants of directed promiscuity.," *Science*, vol. 292, pp. 2329–2333, 2001.
- [45] J. P. Rigalli *et al.*, "Pregnane X receptor mediates the induction of P-glycoprotein by spironolactone in HepG2 cells," *Toxicology*, vol. 285, no. 1–2, pp. 18–24, 2011.
- [46] E. Baker, R. Johnstone, J. Zalcborg, and A. El-Osta, "Epigenetic changes to the MDR1 locus in response to chemotherapeutic drugs.," *Oncogene*, vol. 24, pp. 8061–8075, 2005.
- [47] L. Becquemont *et al.*, "Effect of grapefruit juice on digoxin pharmacokinetics in humans.," *Clin Pharmacol Ther.*, vol. 70, pp. 311–316, 2001.
- [48] A. Soldner, U. Christians, M. Susanto, V. Wachter, J. Silverman, and L. Benet, "Grapefruit juice activates P-glycoprotein-mediated drug transport.," *Pharm Res.*, vol. 16, pp. 478–485, 1999.
- [49] E. Wang, C. Casciano, R. Clement, and W. Johnson, "Inhibition of P-glycoprotein transport function by grapefruit juice psoralen.," *Pharm Res.*, vol. 18, pp. 432–438, 2001.
- [50] H. Takanaga *et al.*, "Polymethoxylated flavones in orange juice are inhibitors of P-glycoprotein but not cytochrome P450 3A4.," *J Pharmacol Exp Ther.*, vol. 293, pp. 230–236, 2000.
- [51] P. Jansen, J. van Klinken, M. van Gelder, R. Ottenhoff, and R. Elferink, "Preserved organic anion transport in mutant TR- rats with a hepatobiliary secretion defect.," *Am J Physiol.*, vol. 265, p. G445–452., 1993.
- [52] A. D. Mottino, T. Hoffman, L. Jennes, and M. Vore, "Expression and localization of multidrug resistant protein mrp2 in rat small intestine," *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 293, no. 3, pp. 717–723, 2000.
- [53] P. Schaub *et al.*, "Expression of the Conjugate Export Pump Encoded by the mrp2 Gene in the Apical Membrane of Kidney Proximal Tubules," *J Am Soc Nephrol.*, vol. 8, no. 8,

pp. 1213–1221, 1997.

- [54] M. Buchler *et al.*, “cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats.,” *J Biol Chem.*, vol. 271, pp. 15091–15098, 1996.
- [55] D. Keppler, I. Leier, G. Jedlitschky, and J. Ko, “ATP-dependent transport of glutathione S -conjugates by the multidrug resistance protein MRP1 and its apical isoform MRP2.,” *Chem. Biol. Interact.*, vol. 112, pp. 153–161, 1998.
- [56] C. Paulusma *et al.*, “Congenital Jaundice in Rats with a Mutation in a Multidrug Resistance- Associated Protein Gene.,” *Science.*, vol. 271, pp. 1126–1128, 1996.
- [57] A. T. Nies and D. Keppler, “The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2),” vol. 2, pp. 643–659, 2007.
- [58] X. Cao *et al.*, “Why is it Challenging to Predict Intestinal Drug Absorption and Oral Bioavailability in Human Using Rat Model,” *Pharm Res.*, vol. 23, no. 8, pp. 1675–1686, 2006.
- [59] M. Estudante, J. G. Morais, G. Soveral, and L. Z. Benet, “Intestinal drug transporters : An overview,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 65, pp. 1340–1356, 2013.
- [60] G. E. Sandusky, K. S. Mintze, S. E. Pratt, and A. H. Dantzig, “Expression of multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) in normal human tissues and carcinomas using tissue microarrays,” vol. 2, pp. 65–74, 2002.
- [61] M. Takano, R. Yumoto, and T. Murakami, “Expression and function of efflux drug transporters in the intestine,” *Pharmacol. Ther.*, vol. 109, pp. 137–161, 2006.
- [62] N. Ballatori and J. Rebeor, “Roles of MRP2 and oatp1 in hepatocellular export of reduced glutathione.,” *Semin Liver Dis.*, vol. 18, pp. 377–387, 1998.
- [63] H. Suzuki and Y. Sugiyama, “Excretion of GSSG and glutathione conjugates mediated by MRP1 and cMOAT/MRP2.,” *Semin Liver Dis.*, vol. 18, pp. 359–376, 1998.
- [64] T. Tanaka *et al.*, “The human multidrug resistance protein 2 gene: functional characterization of the 5’-flanking region and expression in hepatic cells.,” *Hepatology*, vol. 30, p. 1507–1512., 1999.
- [65] H. Kauffmann and D. Schrenk, “Sequence analysis and functional characterization of the 5’-flanking region of the rat multidrug resistance protein 2 (mrp2) gene.,” *Biochem Biophys Res Commun.*, vol. 245, pp. 325–331, 1998.
- [66] B. Stockel, J. Konig, A. Nies, Y. Cui, M. Brom, and D. Keppler, “Characterization of the 5’-flanking region of the human multidrug resistance protein 2 (MRP2) gene and its regulation in comparison with the multidrug resistance protein 3 (MRP3) gene.,” *Eur J Biochem.*, vol. 267, pp. 1347–1358, 2000.
- [67] G. Pang, J. Xie, Q. Chen, and Z. Hu, “How functional foods play critical roles in human health.,” *Food Sci. Hum. Wellness*, vol. 1, no. 1, pp. 26–60, 2012.
- [68] G. Tate, M. Li, T. Suzuki, and T. Mitsuya, “A new mutation of the ATP-binding cassette, sub-family C, member 2 (ABCC2) gene in a Japanese patient with Dubin-Johnson syndrome,” *Genes Genet. Syst.*, vol. 77, no. 2, pp. 117–121, 2002.
- [69] R. Mor-Cohen, N. Zivelin a Rosenberg, I. Goldberg, and U. Seligsohn, “A novel ancestral splicing mutation in the multidrug resistance protein 2 gene causes Dubin-Johnson syndrome in Ashkenazi Jewish patients.,” *Hepatol. Res.*, vol. 31, no. 2, pp. 104–111, 2005.
- [70] B. R. Jones, W. Li, J. Cao, T. A. Hoffman, P. M. Gerk, and M. Vore, “The role of protein synthesis and degradation in the post- transcriptional regulation of rat multidrug resistance- associated protein 2 (Mrp2, abcc2),” *Mol. Pharmacol.*, vol. 68, no. 3, pp. 701–710,

2005.

[71] Y. Zhang, W. Li, and M. Vore, "Translational regulation of rat multidrugresistance-associated protein 2 expression is mediated by upstream openreading frames in the 5' untranslated region.," *Mol. Pharmacol.*, vol. 71, no. 1, pp. 377–383, 2007.

[72] Y. Zhang, T. Zhao, W. Li, and M. Vore, "The 5' untranslated region of multidrug resistance associated protein 2 (MRP2; ABCC2) regulates downstream openreading frame expression through translational regulation.," *Mol. Pharmacol.*, vol. 77, no. 2, pp. 237–246, 2010.

[73] F. A. Crocenzi *et al.*, "Localization status of hepatocellular transporters in cholestasis.," *Front. Biosci.*, vol. 1, no. 17, pp. 1201–1218, 2012.

[74] T. Nakano, S. Sekine, K. Ito, and T. Horie, "Correlation between Apical Localization of Abcc2 / Mrp2 and Phosphorylation Status of Ezrin in Rat Intestine.," *Drug Metab. Dispos.*, vol. 37, no. 7, pp. 1521–1527, 2009.

[75] J. A. Jiminez, T. C. Uwiera, G. D. Inglis, and R. R. E. Uwiera, "Animal models to study acute and chronic intestinal inflammation in mammals," *Gut Pathog.*, vol. 7, no. 29, pp. 1–31, 2015.

[76] E. Van de Kerkhof, I. de Graaf, and G. Groothuis, "In vitro methods to study intestinal drug metabolism.," in *Drug metabolism in human and rat intestine*, 2007, pp. 29–66.

[77] E. Le Ferrec *et al.*, "In vitro models of the intestinal barrier," *Atla*, vol. 29, pp. 649–668, 2001.

[78] G. Tocchetti, J. Rigalli, M. Arana, S. Villanueva, and A. Mottino, "Modulation of expression and activity of intestinal multidrug resistance-associated protein 2 by xenobiotics," *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 303, pp. 45–57, 2016.

[79] B. Press and D. Di Grandi, "Permeability for intestinal absorption: Caco-2 assay and related issues.," *Curr Drug Metab.*, vol. 9, pp. 893–900, 2008.

[80] S. Pignata, L. Maggini, R. Zarrilli, A. Rea, and A. Acquaviva, "The enterocyte-like differentiation of the Caco-2 tumor cell line strongly correlates with responsiveness to cAMP and activation of kinase A pathway.," *Cell Growth Differ.*, vol. 5, pp. 967–973, 1994.

[81] I. Chantret, A. Barbat, E. Dussaulx, M. Brattain, and A. Zweibaum, "Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines.," *Cancer Res.*, vol. 48, pp. 1936–1942, 1988.

[82] E. Grasset, M. Pinto, E. Dussaulx, A. Zweibaum, and J. Desjeux, "Epithelial properties of human colonic carcinoma cell line Caco-2: electrical parameters.," *Am J Physiol.*, vol. 247, pp. C260-267, 1984.

[83] H. Hauri, E. Sterchi, D. Bienz, J. Fransen, and A. Marxer, "Expression and intracellular transport of microvillus membrane hydrolases in human intestinal epithelial cells.," *J Cell Biol.*, vol. 101, pp. 838–851, 1985.

[84] G. Englund, A. Jacobson, F. Rorsman, P. Artursson, A. Kindmark, and A. Rönnblom, "Efflux transporters in ulcerative colitis: Decreased expression of BCRP (ABCG2) and Pgp (ABCB1).," *Inflamm. Bowel Dis.*, vol. 13, no. 3, pp. 291–297, 2007.

[85] T. Yokooji, T. Murakami, R. Yumoto, J. Nagai, and M. Takano, "Site-specific bidirectional efflux of 2,4-dinitrophenyl-S-glutathione, a substrate of multidrug resistance-associated proteins, in rat intestine and Caco-2 cells.," *J Pharm Pharmacol.*, vol. 59, pp. 513–520, 2007.

[86] H. Prime-Chapman, R. Fearn, A. Cooper, V. Moore, and B. Hirst, "Differential multidrug resistance-associated protein 1 through 6 isoform expression and function in human

- intestinal epithelial Caco-2 cells.” *J Pharmacol Exp Ther.*, vol. 311, pp. 476–484, 2004.
- [87] J. Taipalensuu *et al.*, “Correlation of gene expression of ten drug efflux proteins of the ATP-binding cassette transporter family in normal human jejunum and in human intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers.” *J Pharmacol Exp Ther.*, vol. 299, pp. 164–170, 2001.
- [88] D. J. Drucker and B. Yusta, “Physiology and pharmacology of the enteroendocrine hormone glucagon-like peptide-2,” *Annu Rev Physiol*, vol. 76, p. 10.1-10.23, 2014.
- [89] J. Lovshin *et al.*, “Ontogeny of the glucagon-like peptide-2 receptor axis in the developing rat intestine.” *Endocrinology*, vol. 141, pp. 4194–4201, 2000.
- [90] D. Drucker, P. Ehrlich, S. Asa, and P. Brubaker, “Induction of intestinal epithelial proliferation by glucagon-like peptide 2. Proc,” *Natl Acad Sci USA*, vol. 93, pp. 7911–7916, 1996.
- [91] K. A. Tappenden, “Pathophysiology of Short Bowel Syndrome,” *J. Parenter. Enter. Nutr.*, vol. 38, no. 1_suppl, p. 14S–22S, 2014.
- [92] E. Cazzo *et al.*, “Glp-2: a Poorly Understood Mediator Enrolled in Various Bariatric/Metabolic Surgery-Related Pathophysiologic Mechanisms,” *Arq Bras Cir Dig*, vol. 29, no. 4, pp. 272–275, 2016.
- [93] H. Kissow, “Glucagon-like peptides 1 and 2: intestinal hormones implicated in the pathophysiology of mucositis.” *Curr Opin Support Palliat Care.*, vol. 9, no. 2, pp. 196–202, 2015.
- [94] E. E. Connor *et al.*, “Glucagon-like peptide 2 and its beneficial effects on gut function and health in production animals,” *Domest. Anim. Endocrinol.*, vol. 56, pp. S56–S65, 2016.
- [95] A. D. Mottino, T. Hoffman, L. Jennes, J. Cao, and M. Vore, “Expression of multidrug resistance-associated protein 2 in small intestine from pregnant and postpartum rats,” *Am.J Physiol Gastrointest.Liver Physiol*, vol. 280, pp. G1261–G1273, 2001.
- [96] S. S. M. Villanueva *et al.*, “Induction of intestinal multidrug resistance-associated protein 2 by Glucagon-like peptide 2 in the rat.” *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 335, no. 2, pp. 332–341, 2010.
- [97] S. Rhee, “Lipopolysaccharide: Basic Biochemistry , Intracellular Signaling , and Physiological Impacts in the Gut,” *Intest. Res.*, vol. 12, no. 2, pp. 90–95, 2014.
- [98] C. Raetz, R. Ulevitch, S. Wright, C. Sibley, A. Ding, and C. Nathan, “Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction.” *FASEB J.*, vol. 5, no. 12, pp. 2652–2660, 1991.
- [99] C. Raetz, “Biochemistry of endotoxins.” *Annu Rev Biochem.*, vol. 59, pp. 129–170, 1990.
- [100] A. Baltodano, “Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica: Clasificación, fisiopatología y estrategias para el tratamiento.” *An Esp Pediatr*, vol. 44, pp. 414–421, 1996.
- [101] A. P. Beigneux, A. H. Moser, J. K. Shigenaga, C. Grunfeld, and K. R. Feingold, “Reduction in cytochrome P-450 enzyme expression is associated with repression of CAR (constitutive androstane receptor) and PXR (pregnane X receptor) in mouse liver during the acute phase response. Biochem.” *Biophys. Res. Commun.*, vol. 293, pp. 145–149.
- [102] R. Stienstra, E. Lichtenauer-Kaligis, and M. Muller, “Stress- (and diet-) related regulation of hepatic nuclear receptors and its relevance for ABC-transporter functions.” *Drug Metab. Rev.*, vol. 36, pp. 391–406, 2004.
- [103] E. Morgan, “Regulation of cytochromes P450 during inflammation and infection.” *Drug Metab Rev.*, vol. 29, no. 4, pp. 1129–1188, 1997.

- [104] K. Renton, "Alteration of drug biotransformation and elimination during infection and inflammation.," *Pharmacol Ther.*, vol. 92, no. 2–3, pp. 147–163, 2001.
- [105] K. Slaviero, S. Clarke, and L. Rivory, "Inflammatory response: an unrecognised source of variability in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of cancer chemotherapy.," *Lancet Oncol.*, vol. 4, no. 4, pp. 224–232, 2003.
- [106] G. Hartmann, H. Kim, and M. Piquette-Miller, "Regulation of the hepatic multidrug resistance gene expression by endotoxin and inflammatory cytokines in mice.," *Int Immunopharmacol.*, vol. 1, no. 2, pp. 189–199, 2001.
- [107] G. Hartmann, A. Cheung, and M. Piquette-Miller, "Inflammatory cytokines, but not bile acids, regulate expression of murine hepatic anion transporters in endotoxemia.," *J Pharmacol Exp Ther.*, vol. 303, no. 1, pp. 273–281, 2002.
- [108] K. B. Goralski, G. Hartmann, M. Piquette-miller, and K. W. Renton, "Downregulation of *mdr1a* expression in the brain and liver during CNS inflammation alters the in vivo disposition of digoxin," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 139, pp. 35–48, 2003.
- [109] J. Kalitsky-Szirtes, A. Shayeganpour, D. R. Brocks, and M. Piquette-Miller, "Suppression of Drug-Metabolizing Enzymes and Efflux Transporters in the Intestine of Endotoxin-Treated Rats," *Drug Metab. Dispos.*, vol. 32, no. 1, pp. 20–27, 2004.
- [110] J. Moriguchi, R. Kato, M. Nakagawa, Y. Hirotani, Y. Ijiri, and K. Tanaka, "Effects of lipopolysaccharide on intestinal P-glycoprotein expression and activity," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 565, pp. 220–224, 2007.
- [111] R. Kubitz, M. Wettstein, U. Warskulat, and D. Ha, "Regulation of the Multidrug Resistance Protein 2 in the Rat Liver by Lipopolysaccharide and Dexamethasone," *Gastroenterology*, vol. 116, pp. 401–410, 1999.
- [112] M. Kessler, O. Acuto, C. Storelli, H. Murer, M. Muller, and G. Semenza, "A modified procedure for the rapid preparation of efficiently transporting vesicles from small intestinal brush border membranes. Their use in investigating some properties of Dglucose and choline transport systems.," *Biochim Biophys Acta.*, vol. 506, pp. 136–154, 1978.
- [113] R. F. J. Beers and I. W. Sizer, "A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase.," *J Biol Chem.*, vol. 195, no. 1, pp. 133–140, 1952.
- [114] C. J. Weydert and J. J. Cullen, "Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue.," *Nat Protoc.*, vol. 5, no. 1, pp. 51–66, 2010.
- [115] H. Ohkawa, N. Ohishi, and K. Yagi, "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction.," *Anal Biochem*, vol. 95., pp. 351–358, 1979.
- [116] F. Tietze, "Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues.," *Anal. Biochem*, vol. 27, p. 502–522., 1969.
- [117] N. Flint, F. L. Cove, and G. S. Evans, "A low-temperature method for the isolation of small-intestinal epithelium along the crypt-villus axis.," *Biochem J*, vol. 280, pp. 331–334, 1991.
- [118] N. A. Walsh, B. Yusta, M. P. Da Cambra, Y. Anini, D. J. Drucker, and P. L. Brubaker, "Glucagon-like peptide-2 receptor activation in the rat intestinal mucosa.," *Endocrinology*, vol. 144, pp. 4385–4392, 2003.
- [119] K. Zhang, M. Chew, E. B. Yang, K. P. Wong, and P. Mack, "Modulation of cisplatin cytotoxicity and cisplatin-induced DNA cross-links in HepG2 cells by regulation of glutathione-related mechanisms.," *Mol. Pharmacol.*, vol. 59, pp. 837–843, 2001.

- [120] A. Arias *et al.*, “Regulation of expression and activity of multidrug resistance proteins MRP2 and MDR1 by estrogenic compounds in Caco-2 cells. Role in prevention of xenobiotic-induced cytotoxicity.,” *Toxicology*, vol. 320, pp. 46–55, 2014.
- [121] A. J. Townsend *et al.*, “Chemoprotective functions of glutathione S-transferases in cell lines induced to express specific isozymes by stable transfection,” vol. 111–112, pp. 389–407, 1998.
- [122] E. Bakos, R. Evers, E. Sinko, A. Varadi, P. Borst, and B. Sarkadi, “Interactions of the human multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2 with organic anions.,” *Mol. Pharmacol.*, vol. 57, pp. 760–768, 2000.
- [123] M. L. Ruiz *et al.*, “Estrogen receptor- α mediates human multidrug resistance associated protein 3 induction by 17 α -ethynylestradiol. Role of activator protein-1.,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 86, pp. 401–409, 2013.
- [124] P. Domizi, C. Aoyama, and C. Banchio, “Choline kinase alpha expression during RA-induced neuronal differentiation: role of C/EBP β .,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1841, pp. 544–551, 2014.
- [125] J. J. Sedmak and S. E. Grossberg, “A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250.,” *Anal. Biochem.*, vol. 79, pp. 544–552, 1977.
- [126] H. O. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, “Protein measurement with the Folin phenol reagent.,” *J Biol Chem*, vol. 193, p. 265–275., 1951.
- [127] U. K. Laemmli, “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.,” *Nature*, vol. 227, pp. 680–685, 1970.
- [128] J. F. Sambrook, E. F. Fritsch, and R. Maniatis, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual.,” Cold Spring Harbor, New York., 1989.
- [129] M. W. Pfaffl, “A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 29, no. 9, p. e45, 2001.
- [130] C. A. Davio, G. P. Cricco, R. M. Bergoc, and E. S. Rivera, “H1 and H2 histamine receptors in N-nitroso-N-methylurea (NMU)-induced carcinomas with atypical coupling to signal transducers.,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 50, pp. 91–96, 1995.
- [131] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, and E. Al., “Fiji: an open-source platform for biological-image analysis.” *Nature methods*, pp. 676–682, 2012.
- [132] C. G. Dietrich *et al.*, “Consequences of Bile Duct Obstruction on Intestinal Expression and Function of Multidrug Resistance-Associated Protein 2,” *Gastroenterology*, vol. 126, pp. 1044–1053, 2004.
- [133] A. S. Londero *et al.*, “Intestinal multidrug resistance-associated protein 2 is down-regulated in fructose-fed rats,” *J. Nutr. Biochem.*, vol. 40, pp. 178–186, 2017.
- [134] A. Mottino, J. Cao, L. Veggi, F. Crocenzi, M. Roma, and V. M., “Altered localization and activity of canalicular Mrp2 in estradiol-17 β -D-glucuronide-induced cholestasis.,” *Hepatology*, vol. 35, no. 6, p. 1409–1419., 2002.
- [135] M. Roma, F. Crocenzi, and A. Mottino, “Dynamic localization of hepatocellular transporters in health and disease.,” *World J Gastroenterol.*, vol. 14, no. 44, pp. 6786–6801, 2008.
- [136] G. N. Tocchetti *et al.*, “Acute regulation of multidrug resistance-associated protein 2 localization and activity by cAMP and estradiol-17 β -D-glucuronide in rat intestine and Caco-2 cells.,” *Arch. Toxicol.*, 2017.
- [137] J. Hayakawa *et al.*, “Identification of promoters bound by c-Jun/ATF2 during rapid

large-scale gene activation following genotoxic stress.," *Mol. Cell*, vol. 16, pp. 521–535, 2004.

[138] Y. Liu, Y. Wang, W. Li, P. Zheng, and Y. Liu, "Activating transcription factor 2 and c-Jun mediated induction of FoxP3 for experimental therapy of mammary tumor in the mouse.," *Cancer Res.*, vol. 69, pp. 5954–5960, 2009.

[139] B. Song, B. Xie, C. Wang, and M. Li, "Caspase-3 is a target gene of c-Jun:ATF2 heterodimers during apoptosis induced by activity deprivation in cerebellar granule neurons.," *Neurosci. Lett.*, vol. 505, pp. 76–81, 2011.

[140] M. Karin, Z. Liu, and E. Zandi, "AP-1 function and regulation.," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 9, pp. 240–246, 1997.

[141] H. L. Cameron, P. C. Yang, and M. H. Perdue, "Glucagon-like peptide-2-enhanced barrier function reduces pathophysiology in a model of food allergy," *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, vol. 284, no. 6, pp. G905–G912, 2003.

[142] H. L. Cameron and M. H. Perdue, "Stress impairs murine intestinal barrier function: improvement by glucagon-like peptide-2.," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 314, no. 1, pp. 214–220, 2005.

[143] C. X. Dong *et al.*, "The intestinal epithelial insulin-like growth factor-1 receptor links glucagon-like peptide-2 action to gut barrier function," *Endocrinology*, vol. 155, no. 2, pp. 370–379, 2014.

[144] M. R. Arana, G. N. Tocchetti, J. P. Rigalli, A. D. Mottino, and S. S. M. Villanueva, "Physiological and pathophysiological factors affecting the expression and activity of the drug transporter MRP2 in intestine. Impact on its function as membrane barrier," *Pharmacol. Res.*, vol. 109, pp. 32–44, 2016.

[145] H. Blokzijl *et al.*, "Decreased P-glycoprotein (P-gp/MDR1) expression in inflamed human intestinal epithelium is independent of PXR protein levels," *Inflamm. Bowel Dis.*, vol. 13, no. 6, pp. 710–720, 2007.

[146] A. Iida *et al.*, "Changes of Absorptive and Secretory Transporting System of (1-3) beta-D-glucan Based on Efflux Transporter in Indomethacin-induced Rat," *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, vol. 40, no. 1, pp. 29–38, 2015.

[147] J. Naud *et al.*, "Down-regulation of intestinal drug transporters in chronic renal failure in rats," *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 320, no. 3, pp. 978–985, 2007.

[148] D. L. Sigalet *et al.*, "Enteric neural pathways mediate the anti-inflammatory actions of glucagon-like peptide 2," *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, vol. 293, no. 1, pp. G211–21, 2007.

[149] W. Zhang, W. Zhu, J. Zhang, N. Li, and J. Li, "Protective effects of glucagon-like peptide 2 on intestinal ischemia-reperfusion rats," *Microsurgery.*, vol. 28, no. 4, pp. 285–290, 2008.

[150] A. D. Mottino, T. Hoffman, F. A. Crocenzi, E. J. Sánchez Pozzi, M. G. Roma, and M. Vore, "Disruption of function and localization of tight junctional structures and Mrp2 in sustained estradiol-17beta-D-glucuronide-induced cholestasis.," *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, vol. 293, no. 1, pp. G391–402, 2007.

[151] S. Sekine, K. Ito, and T. Horie, "Canalicular Mrp2 localization is reversibly regulated by the intracellular redox status," *Am. J. Physiol.*, vol. 295, no. 5, pp. G1035–G1041, 2008.

[152] K. Ikemura, T. Iwamoto, and M. Okuda, "Altered functions and expressions of drug transporters in liver, kidney and intestine in disorders of local and remote organs: possible role of oxidative stress in the pathogenesis.," *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, vol. 5, no. 8, pp. 907–20, 2009.

- [153] J. Bhattacharyya, S. Biswas, and A. Datta, "Mode of action of endotoxin: Role of free radicals and antioxidants," *Curr. Med. Chem.*, vol. 11, no. 3, pp. 359–368, 2004.
- [154] Z. Li, X. Zhang, H. Zhou, W. Liu, and J. Li, "Exogenous S-nitrosoglutathione attenuates inflammatory response and intestinal epithelial barrier injury in endotoxemic rats," *J. Trauma Acute Care Surg.*, vol. 80, no. 6, pp. 977–984, 2016.
- [155] R. Moriez, C. Salvador-Cartier, V. Theodorou, J. Fioramonti, H. Eutamene, and L. Bueno, "Myosin Light Chain Kinase Is Involved in Lipopolysaccharide-Induced Disruption of Colonic Epithelial Barrier and Bacterial Translocation in Rats," *Am. J. Pathol.*, vol. 167, no. 4, pp. 1071–1079, 2005.
- [156] M. Montminy, "Transcriptional regulation by cyclic AMP.," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 66, pp. 807–822, 1997.
- [157] J. L. Meinkoth *et al.*, "Signal transduction through the cAMP-dependent protein kinase.," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 128, pp. 179–186, 1993.
- [158] P. W. Vesely, P. B. Staber, G. Hoefler, and L. Kenner, "Translational regulation mechanisms of AP-1 proteins.," *Mutat. Res.*, vol. 682, pp. 7–12, 2009.
- [159] A. Bhoumik *et al.*, "Suppressor role of activating transcription factor 2 (ATF2) in skin cancer.," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 105, p. 1674–1679., 2008.
- [160] N. Szabo-Fresnais, J. P. Blondeau, and M. Pomérance, "Activation of the cAMP pathway synergistically increases IL-1-induced IL-6 gene expression in FRTL-5 thyroid cells: involvement of AP-1 transcription factors.," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 284, pp. 28–37, 2008.
- [161] D. Chen *et al.*, "Prostaglandin E(2) induces breast cancer related aromatase promoters via activation of p38 and c-Jun NH(2)-terminal kinase in adipose fibroblasts.," *Cancer Res.*, vol. 67, pp. 8914–8922, 2007.
- [162] H. Liao, M. C. Hyman, A. E. Baek, K. Fukase, and D. J. Pinsky, "cAMP/CREB-mediated transcriptional regulation of ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (CD39) expression.," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, pp. 14791–14805, 2010.
- [163] R. J. Carrillo, A. I. Dragan, and P. L. Privalov, "Stability and DNA-binding ability of the bZIP dimers formed by the ATF-2 and c-Jun transcription factors.," *J. Mol. Biol.*, vol. 396, pp. 431–440, 2010.
- [164] E. Shaulian and M. Karin, "AP-1 as a regulator of cell life and death.," *Nat. Cell Biol.*, vol. 4, pp. E131–E136, 2002.
- [165] H. Liu, X. Deng, Y. J. Shyu, J. J. Li, E. J. Taparowsky, and C. D. Hu, "Mutual regulation of c-Jun and ATF2 by transcriptional activation and subcellular localization.," *J. EMBO*, vol. 25, pp. 1058–1069, 2006.
- [166] B. A. Carter *et al.*, "Outcomes from a 12-Week, Open-Label, Multicenter Clinical Trial of Teduglutide in Pediatric Short Bowel Syndrome," *J. Pediatr.*, vol. 181, pp. 102–111, 2017.
- [167] P. B. Jeppesen *et al.*, "Quality of life in patients with short bowel syndrome treated with the new glucagon-like peptide-2 analogue teduglutide - Analyses from a randomised, placebo-controlled study," *Clin Nutr.*, vol. 32, no. 5, pp. 713–721, 2013.
- [168] K. B. Madsen *et al.*, "Acute effects of continuous infusions of glucagon-like peptide (GLP)-1, GLP-2 and the combination (GLP-1+GLP-2) on intestinal absorption in short bowel syndrome (SBS) patients. A placebo-controlled study," *Regul. Pept.*, vol. 184, pp. 30–39, 2013.