



EL SISTEMA DE SEÑALIZACIÓN DE LA REELINA EN LA HOMEOSTASIS Y EN LA INFLAMAMACIÓN DEL COLON

ANA ELOISA CARVAJAL VÁZQUEZ
SEVILLA, 2016



Facultad de Farmacia

**EL SISTEMA DE SEÑALIZACIÓN DE LA
REELINA EN LA HOMEOSTASIS Y EN LA
INFLAMACIÓN DEL COLON**

**Tesis presentada para optar al grado de Doctor por la Universidad de
Sevilla por:**

Ana Eloisa Carvajal Vázquez

DIRECTORAS:

Dra. M^a Luisa Calonge

Dra. M^a José Peral



Departamento de Fisiología
Facultad de Farmacia

Dña. M^aLUISA CALONGE CASTRILLO y Dña. MARÍA JOSÉ PERAL RUBIO, Profesoras Titulares de Universidad del Departamento de Fisiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICAN:

Que Dña. Ana Eloisa Carvajal Vázquez, Licenciado en Biología, ha realizado, bajo su dirección en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, la Tesis que lleva por título “EL SISTEMA DE LA REELINA EN LA HOMEOSTASIS E INFLAMACIÓN DEL COLON” para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Y para que así conste, firman el presente certificado en Sevilla a 10 de mayo de 2016

M^a Luisa Calonge Castrillo

María José Peral Rubio

Este trabajo ha sido financiado por la Junta de Andalucía, “Proyecto de Investigación de Excelencia” (CTS-5884), y con una Beca predoctoral de Formación del Personal Investigador adscrita a este proyecto.

A mis padres
y hermanos

Agradecimientos

Tras estos años de trabajo, me gustaría expresar mi agradecimiento a todas las personas que han estado a mi lado durante la realización de este proyecto:

A mis directoras de Tesis, las Dras. M^a Luisa Calonge y María José Peral, y a la responsable de grupo de investigación la Catedrática Ana Ilundáin, por haberme ofrecido la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación y por la dedicación, paciencia y cariño que me han ofrecido durante mi formación predoctoral.

A mis compañeros del grupo de investigación, José Manuel Serrano, el Dr. Pablo García y, en especial, la Dra. Lola Vázquez, por su compañerismo en el trabajo diario, su apoyo, consejo y amistad. Al resto del profesorado del Departamento y compañeros de laboratorio con los que he tenido la suerte de coincidir por el buen trato y cariño recibido. A Francisco Frieras, técnico de laboratorio, por su buena disposición.

Al catedrático Fermín Sánchez de Medina del Departamento de Farmacología de la Universidad de Granada por su consejo y orientación en la técnica de inducción de colitis en ratones. A la Dra. M^a del Reposo Ramírez del Instituto de Biomedicina de Sevilla por su ayuda en los ensayos de metilación del promotor de la Reelina. A todos aquellos que me han mostrado su conocimiento y asesoramiento en diferentes técnicas, en especial a los compañeros del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia.

Al cariño y orientación de Florencio Rojo.

Y sobre todo a mis padres, Carmen y Nicomedes, a mis hermanos, Érica y Rubén, a todos mis amigos y mis compañeros de yoga y baile por su amor, apoyo y ánimo diarios.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
Morfología del colon.....	3
Epitelio.....	3
Colonocitos.....	4
Células caliciformes o Goblets.....	4
Células enteroendocrinas.....	5
Células brush o caveoladas.....	5
Células M.....	6
Uniones intercelulares.....	6
Uniones estrechas.....	7
Uniones adherentes.....	8
Desmosomas.....	8
Lámina propia.....	8
Principales vías de señalización implicadas en la homeostasis del epitelio del colon.....	10
Vía Wnt.....	11
Vía Notch.....	11
Vía Hedgehog.....	12
Vía TGF β /BMP.....	12
Enfermedades inflamatorias intestinales.....	13
Sistema de señalización de la Reelina.....	14

Regulación de la transcripción de la <i>Reelina</i>	17
Implicación de la Reelina en procesos patológicos y en la regeneración tisular.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
Animales de experimentación.....	23
Aparatos.....	23
Reactivos.....	24
Genotipado de ratones.....	26
Material biológico empleado.....	26
Obtención de la capa mucosa y muscular del colon de ratón.....	26
Aislamiento de fracciones celulares del colon de ratón.....	27
Obtención de los extractos proteicos.....	28
Determinación de la concentración de proteína.....	28
Preparación de las muestras biológicas para su observación al microscopio.....	28
Microscopio óptico.....	28
Microscopio electrónico de transmisión.....	29
Análisis morfométrico.....	29
Inmunohistoquímica.....	29
Inmunohistoquímica en células aisladas.....	30
Inmunohistoquímica en tejido.....	31
Medidas de proliferación y migración celular.....	32
Medidas de apoptosis celular.....	33
Detección de las células calciformes.....	34

Análisis de Western Blot.....	34
Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.....	35
PCR específica de metilación (MSP) y secuenciación genómica.....	37
Inducción de la inflamación.....	39
Evaluación de la inflamación.....	40
Indice de la actividad de la enfermedad.....	40
Análisis macroscópico del intestino.....	41
Análisis histológico del colo.....	41
Medida de la actividad de la mieloperoxidasa.....	41
Niveles de expresión de marcadores de la inflamación.....	42
Presentación de los resultados y análisis estadísticos.....	42
RESULTADOS.....	45
El sistema de señalización de la Reelina en el colon de ratón	45
Expresión de los genes <i>Reelina</i> y <i>Dab1</i> en cerebro e intestino de ratón	45
Expresión de los genes <i>Reelina</i> y <i>Dab1</i> en el colon de ratón en función de la edad.....	46
Expresión de los genes <i>Reelina</i> , <i>Dab1</i> , <i>VldlR</i> y <i>ApoER2</i> en células aisladas del colon.....	47
Inmunolocalización de las proteínas <i>Reelina</i> , <i>Dab1</i> , <i>VldlR</i> y <i>ApoER2</i> en células aisladas del colon.....	49
Efecto de la mutación del gen <i>Reelina</i> sobre el colon de ratón.....	51

Peso corporal y estudio macroscópico del colon de los ratones control y <i>reeler</i>	51
Estudio morfológico del colon de ratones control y <i>reeler</i>	52
Estudio de las microvellosidades y las uniones intercelulares del epitelio del colon de ratones control y <i>reeler</i>	54
Expresión de los genes Reelina, Dab1, VldlR y ApoER2 en el colon de ratones control y <i>reeler</i>	55
Efecto de la mutación del gen Reelina sobre la homeostasis del epitelio del colon.....	56
Efecto de la ausencia de Reelina sobre la proliferación y migración del epitelio del colon.....	57
Efecto de la ausencia de Reelina sobre la diferenciación del epitelio del colon.....	58
Efecto de la ausencia de Reelina sobre la apoptosis en el epitelio del colon.....	60
Expresión de los genes SOX9, Ciclina D1, Cdx-2, Smad5, Hes-1 y Atoh-1 en el colon de ratones control y <i>reeler</i>	62
Efecto de la inflamación sobre el sistema de señalización de la <i>Reelina</i> en el colon de ratón.....	63
Efecto de la inflamación en el colon de ratón.....	63
Expresión de los genes Reelina, Dab1, VldlR, ApoER2 y α -SMA en colon proximal y distal de ratones control y tratados con DSS.....	66
Efecto de la inflamación en el colon distal de ratón a lo largo del tiempo.....	67
Efecto de la inflamación sobre la expresión de Reelina y α -SMA en el colon distal de ratón a lo largo del tiempo.....	70
Efecto de la inflamación en el colon de ratones control y <i>reeler</i>.....	73

Efecto de la inflamación en el colon distal de los ratones control y reeler.....	73
Expresión de los genes SOX9, Ciclina D1, Cdx-2, Smad 5, Hes-1 y Atoh-1 en el colon distal de ratones control y reeler con y sin tratamiento.....	75
Expresión de la proteína SOX9 en el colon distal de ratones control y reeler.....	76
Regulación de la expresión del gen Reelina durante la inflamación del colon de ratón.....	77
Expresión de los genes ApoER2, TGFβ1, Cask, DNMT1, SP1 y Tbr-1 durante la inflamación del colon distal de ratón.....	78
Expresión de la proteína DNMT1 durante la inflamación del colon distal de ratón.....	79
Metilación del promotor del gen Reelina durante la inflamación del colon distal de ratón.....	80
DISCUSIÓN.....	85
CONCLUSIONES.....	101
BIBLIOGRAFÍA.....	105



INTRODUCCIÓN

El tracto intestinal de los mamíferos se divide morfológica y funcionalmente en dos regiones bien diferenciadas: intestino delgado e intestino grueso. El primero de ellos está formado por el duodeno, yeyuno e íleon y el segundo por el ciego, colon y recto.

El intestino delgado está especializado en la absorción de los nutrientes gracias a sus abundantes células absortivas y a la presencia de numerosas vellosidades que incrementan la superficie de absorción. Alrededor de la base de estas vellosidades se encuentran unas invaginaciones llamadas criptas de Lieberkühn. El intestino grueso, por el contrario, carece de vellosidades y en su lugar presenta profundas criptas de Lieberkühn que penetran hasta la submucosa y una superficie epitelial. Su epitelio está especializado principalmente en absorber agua y sales inorgánicas (Figura 1).

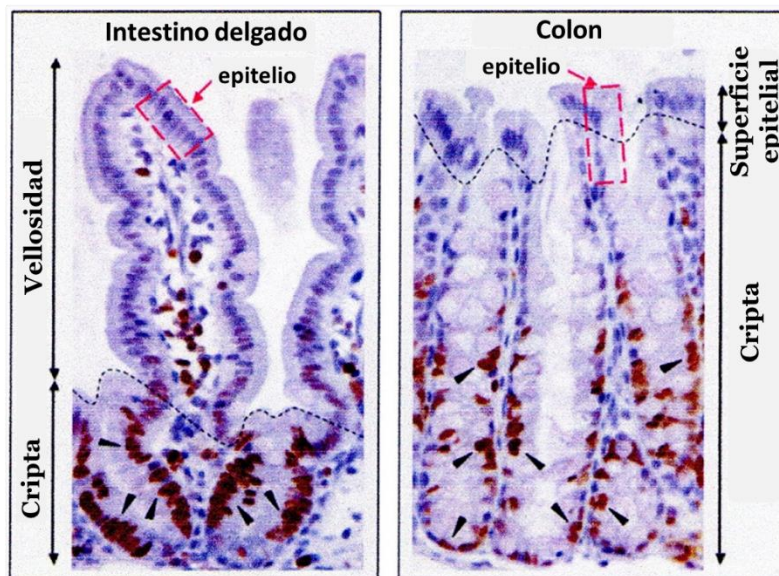


Figura 1. Morfología de la mucosa del intestino delgado y del colon en un ratón adulto (esquema adaptado de Pinto y Clevers, 2005). Fotografía representativa de un ensayo inmunohistoquímico para el marcaje de células madre.

El epitelio intestinal de mamíferos se renueva totalmente cada 3-4 días mediante una secuencia bien organizada de proliferación, diferenciación, muerte y descamación celular. La continua renovación celular se abastece de células madres multipotentes localizadas en la base de las criptas, que generan principalmente cuatro tipos de células: las células absortivas (llamadas enterocitos en el intestino delgado y colonocitos en el colon), las células caliciformes o Goblet (más abundantes en el colon), las enteroendocrinas y las células de Paneth (ausentes en el colon). Las células de Paneth descienden y se concentran en la parte más profunda de las criptas, mientras que las células absortivas, las caliciformes y las enteroendocrinas se diferencian, adquiriendo una polaridad morfológica y funcional, a medida que migran a lo largo del eje cripta-vellosidad o cripta-superficie epitelial. Una vez alcanzada la punta de la vellosidad o la superficie epitelial, las células entran en apoptosis y se exfolian a la luz del intestino (ver revisiones van der Flier y Clevers, 2009; Sellers y Morton, 2014). Se han descrito otros tres tipos celulares: las células Brush llamadas así por su borde en cepillo con largas microvellosidades que presentan analogía estructural con las células receptoras de los botones gustativos (ver revisión Sbarbati y Osculati, 2005); las células M, que poseen microvellosidades cortas e irregulares, se localizan en las placas de Peyer y desempeñan funciones de defensa frente a agentes patógenos (ver revisión Miller y cols., 2007); y las células cup, caracterizadas por sus cortas microvellosidades (ver revisión Gerbe y cols., 2012).

Los procesos de proliferación, migración y apoptosis celular del epitelio intestinal están regulados a fin de mantener la homeostasis epitelial. Las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular regulan dichos procesos. También afectan a dichos procesos celulares sustancias liberadas a la matriz extracelular por las células subyacentes tales como los fibroblastos, miofibroblastos, macrófagos, linfocitos y células dendríticas (ver revisiones Berrier y Yamada, 2007; Mifflin y cols., 2011). La alteración de estas vías de regulación puede alterar la homeostasis intestinal y producir patologías tales como las enfermedades inflamatorias intestinales.

MORFOLOGÍA DEL COLON

La pared del colon de mamíferos está organizada en 4 capas: mucosa, submucosa, muscular y serosa. La mucosa a su vez está constituida por: 1) un epitelio cilíndrico simple, 2) la lámina propia, formada por tejido conectivo y 3) una capa de músculo liso denominada muscular de la mucosa, que separa la mucosa de la submucosa (Figura 2). La submucosa está formada por tejido conectivo denso, presenta gran cantidad de vasos sanguíneos y el plexo nervioso de Meissner. La capa muscular, formada por dos subcapas de músculo liso, la circular interna y la longitudinal externa, es más gruesa que la del intestino delgado. Entre las dos subcapas musculares se encuentra el plexo mientérico de Auerbach. La serosa está formada por un epitelio que recubre una capa de tejido conectivo laxo, envuelve todo el tubo digestivo excepto el colon distal y el recto.

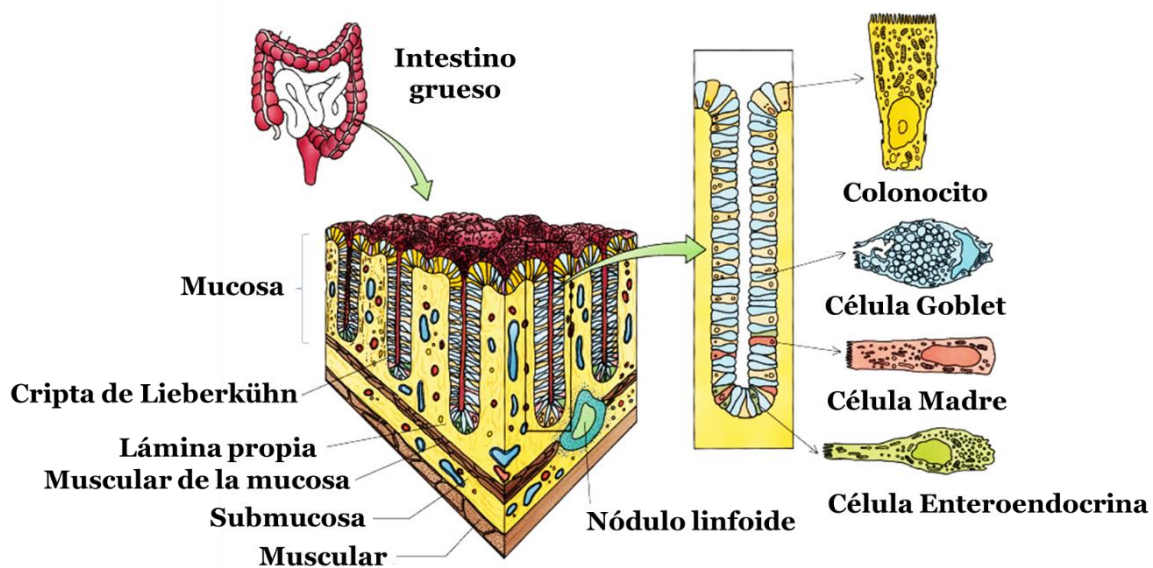


Figura 2. Representación esquemática de la pared del intestino grueso y de los principales tipos de células del epitelio del colon (esquema adaptado de Gartner y cols., 1997).

Epitelio

Es un epitelio cilíndrico simple que recubre la superficie y las criptas de Lieberkühn. Realiza dos funciones principales: i) actuar como una barrera para impedir el paso de sustancias nocivas como antígenos, microorganismos o toxinas y, ii) actuar como un filtro

selectivo, que permite el paso de sustancias desde el lumen a la circulación. Se pensaba que las células de la superficie estaban especializadas en la absorción y las de las criptas en la secreción, sin embargo, se ha demostrado que ambas realizan funciones absorptivas y secretoras y presentan una amplia cantidad de canales e intercambiadores iónicos (Geibel, 2005). Las células presentes en el epitelio del colon son:

Colonocitos

Son las células más abundantes en el epitelio del colon, junto con las células caliciformes. Los colonocitos están especializados en la absorción de agua y sales minerales y además pueden absorber algunos nutrientes como vitaminas hidrosolubles (ver revisión Said, 2011). Son células morfológica y funcionalmente polarizadas. En su dominio apical presentan microvellosidades mientras que la membrana basolateral es lisa (ver revisión Noah y cols., 2011). Las proteínas transportadoras y canales presentes en la membrana apical difieren de los presentes en la basolateral, lo que permite el transporte vectorial transepitelial de agua y solutos. Los colonocitos maduros expresan la enzima anhidrasa carbónica 1 (AC-1), responsable de catalizar la conversión del ácido carbónico en bicarbonato y protón y que se utiliza como marcador de los colonocitos (Sowden y cols., 1993).

Células caliciformes o Goblet

Están situadas entre los colonocitos y son las células secretoras más abundantes en el epitelio del colon. Constituyen aproximadamente el 50% del total de células del epitelio. Su función es sintetizar y secretar moco, el cual forma un gel continuo en la superficie intestinal, constituyendo uno de los componentes clave de la primera línea de defensa frente a patógenos (ver revisión de Noah y cols., 2011). El moco está formado por mucinas, que son glicoproteínas hidrosolubles de alto peso molecular, agua, electrolitos, inmunoglobulinas y péptidos “trefoil” (Schmitz y cols., 2013). En el colon, esta capa de moco está subdividida en dos: una interna, en contacto directo con las células caliciformes, que actúa como barrera frente a la entrada de patógenos, y otra externa, donde habita la microflora bacteriana. El componente fundamental del moco en el colon es la mucina de tipo 2 (Muc2), siendo un marcador de células caliciformes maduras (ver revisión Johansson y Hansson, 2013). Recientemente se ha demostrado que esta mucina regula la expresión por las células epiteliales de la β -defensina 2, importante en la defensa frente a

las bacterias (Cobo y cols., 2015). La producción y secreción del moco así como la proliferación de las células caliciformes es inducida en parte por la presencia y tipo de microflora en el colon. El moco desempeña funciones diversas: i) actúa como barrera físico-química entre el lumen y el epitelio protegiendo a éste de daños físicos producidos por el contenido intraluminal e impidiendo el contacto directo de agregados macromoleculares y partículas con las microvellosidades, ii) regula la hidratación del epitelio, iii) protege de la invasión de bacterias y virus y iv) colabora en el proceso de recuperación del epitelio tras una lesión. Se ha demostrado además que las células caliciformes participan en la respuesta inmunológica ya que son capaces de internalizar sustancias y presentarlas a las células dendríticas de la lámina propia (ver revisión Sellers y Morton, 2014).

Células enteroendocrinas

Constituyen una población compleja de células secretoras distribuidas a lo largo de las criptas del colon. Son reconocidas por numerosos marcadores entre los que destaca la cromogranina A, proteína secretora neuroendocrina (ver revisión Rindi y cols., 2004), que es almacenada y liberada junto con catecolaminas y que, además, puede funcionar como una pro-hormona capaz de generar varios péptidos biológicamente activos (D'Amico y cols., 2014). Aunque representan menos del 1% de las células del epitelio, producen gran variedad de péptidos y hormonas que regulan la motilidad, el apetito y el metabolismo de la glucosa. En el colon existen, al menos, dos tipos de células enteroendocrinas: las células L que producen, entre otros, GLP-1 (glucagon-like peptide-1) y el péptido tirosina-tirosina y las células enterocromafines, que segregan principalmente serotonina (ver revisión May y cols., 2010).

Células *brush* o caveoladas

Estas células fueron descritas por primera vez en el tracto gastrointestinal de ratón por Jarvi y Keyrilainen (1956). En el epitelio del colon se encuentran aisladas a lo largo de toda la cripta y en la superficie epitelial.

Han recibido diferentes nombres, todos relacionados con su morfología, así se denominan células *tuft*, caveoladas, fibrilovesiculares y *brush*. Son células polarizadas que presentan un gran número de invaginaciones del tipo de las caveolas y largas microvellosidades en su borde apical, microfilamentos citosólicos y un sistema

túbulo-vesicular abundante. Las células *brush* presentan analogía estructural con las células receptoras de los botones gustativos ya que en sus microvellosidades expresan proteínas receptoras del gusto y también presentan proteínas efectoras de la transducción, como la proteína G, α -gustducina (ver revisión Gerbe y cols., 2012). Además secretan eicosanoides como la prostaglandina D₂ (PGD₂), son la principal fuente de opioides y las únicas células que expresan enzimas ciclooxigenasas 1 y 2 (COX 1 y 2) (Schütz y cols., 2015).

Células M

Las células M también llamadas células membranosas se encuentran en el tejido linfoide asociado al intestino, revistiendo los folículos linfoides y las placas de Peyer. La morfología y abundancia de estas células varía según la especie animal y el órgano donde se localizan. Las células M están especializadas en captar antígenos (proteínas, bacterias, virus) de la luz intestinal y transportarlos por transcitosis hacia la submucosa, donde son presentados a los linfocitos, macrófagos y células dendríticas para iniciar la respuesta inmune. Las células M internalizan los antígenos por fagocitosis, endocitosis dependiente de clatrina o pinocitosis y mantienen la antigenicidad de los mismos gracias a que poseen escaso número de lisosomas. En el hombre las células M del colon presentan una membrana basolateral con invaginaciones, siendo esta zona donde se sitúan las células inmunitarias infiltradas (ver revisión Miller y cols., 2007).

Uniones intercelulares

Las uniones entre las células del epitelio intestinal son de conexión y de comunicación. Las uniones de conexión presentes en la membrana lateral de las células son: las uniones estrechas, las adherentes y los desmosomas. Todas estas uniones están formadas por proteínas transmembrana, que por su extremo extracelular contactan con las proteínas de células contiguas y por el extremo citosólico se unen al citoesqueleto. Las uniones estrechas y adherentes contactan con los filamentos de actina del citoesqueleto, mientras que los desmosomas se unen a los filamentos intermedios (Figura 3). El ensamblaje de estas uniones es esencial para la integridad estructural del epitelio intestinal. La alteración de las uniones puede tener graves consecuencias tales como diarrea, edema e infección y contribuyen al desarrollo de enfermedades inflamatorias intestinales. Las uniones intercelulares no son estructuras estáticas, sino que representan

micro-dominios altamente dinámicos, los cuales responden a señales tanto intra- como extra-celulares modificando su composición y función (revisiones Gassler y cols., 2001; Capaldo. y cols., 2014).

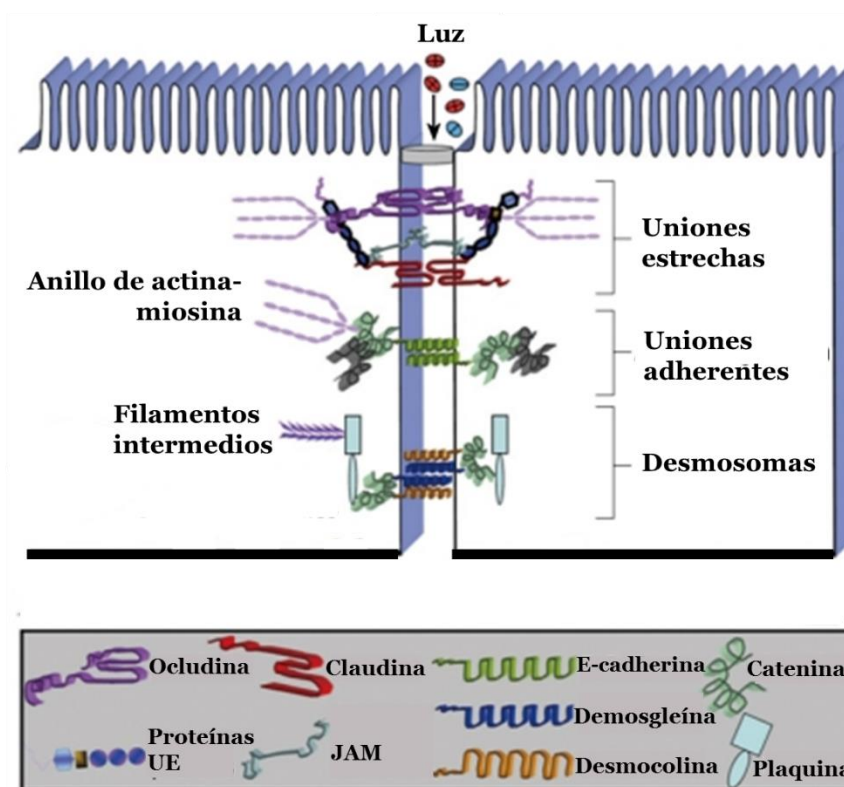


Figura 3. Esquema de las uniones intercelulares de la membrana lateral del epitelio intestinal (esquema adaptado por Laukoetter y cols. 2008). UE: unión estrecha; JAM: moléculas de adhesión intercelular.

Uniones estrechas: se localizan en la zona más apical del epitelio. Sus funciones mejor estudiadas son el establecimiento y mantenimiento de la polaridad celular y la regulación de la permeabilidad paracelular, actuando como primera línea de defensa al controlar selectivamente el paso de sustancias. Están formadas por proteínas transmembrana entre las que se incluyen: ocludinas, claudinas, moléculas de adhesión intercelular (JAM) y tricelulinas. Las claudinas parecen ser las responsables de determinar y regular la permeabilidad paracelular. El extremo citosólico de las proteínas transmembrana se une al citoesqueleto de actina a través de las proteínas ZO (zonula occludens) 1, 2 y 3, entre otras. A su vez los filamentos de actina están unidos a filamentos

de miosina que cuando se activan desencadenan la contracción y apertura de la vía paracelular. En el intestino las proteínas de la unión están reguladas por diversos factores que pueden afectar a su integridad y funcionamiento, entre ellos las citoquinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y la interleucina 1 β (IL-1 β), y los factores de crecimiento, como el factor de crecimiento transformante β (TGF β) y factor de crecimiento epidérmico (EGF) (ver revisión Lee, 2015). Participan también en la regulación de los procesos de proliferación y diferenciación celular (Shin y cols., 2006).

Uniones adherentes: se sitúan por debajo de las uniones estrechas, fijan mecánicamente las células vecinas mediante la unión del citoesqueleto. Participan en el mantenimiento de la integridad del epitelio, de la permeabilidad paracelular y de la forma y polaridad celular. En este tipo de uniones las proteínas transmembrana son las cadherinas, glicoproteínas cuya adhesión extracelular depende de calcio. El extremo intracelular de las cadherinas se une a proteínas citoplasmáticas de la familia de las cateninas (p120, α -catenina y β -catenina), las cuales se unen al citoesqueleto de actina. La E-cadherina y la β -catenina están implicadas en la regulación de la proliferación y diferenciación celular y sus niveles citosólicos están regulados por la vía de señalización Wnt (ver revisión Rudini y Dejana, 2008).

Desmosomas: Proporcionan una fuerte unión entre células contiguas, ya que actúan como un nexo entre ellas y los filamentos intermedios del citoesqueleto. Las proteínas transmembrana que participan son la desmogleína y la desmocolina, ambas pertenecientes a la familia de las cadherinas. Los extremos citosólicos se unen a una placa citoplasmática, compuesta por un complejo de proteínas de anclaje intracelular, que se unen al citoesqueleto. Además participan en la regulación de los procesos de proliferación y migración celular (ver revisión Garrod y Chidgey, 2008).

Lámina propia

Es un tejido conectivo laxo, que se extiende entre las criptas. La lámina propia proporciona un soporte para el epitelio y contiene los vasos sanguíneos y linfáticos, las fibras nerviosas y musculares lisas, y células mesenquimales como pericitos, fibroblastos y miofibroblastos y otros tipos celulares como linfocitos y células dendríticas (Figura 4).

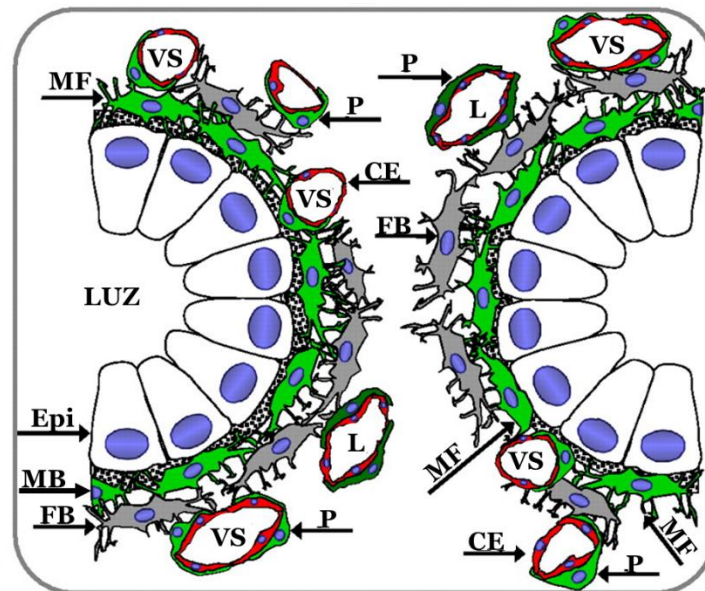


Figura 4. Representación esquemática del epitelio y de las células mesenquimales de la lámina propia en la mucosa de colon (esquema adaptado de Mifflin y cols., 2011). Corte transversal de las criptas. MB: Membrana basal; CE: célula endotelial; Epi: epitelio; FB: fibroblasto; L: vaso linfático; MF: miofibroblasto; P: pericitos; VS: vaso sanguíneo.

Los miofibroblastos subepiteliales se localizan justo por debajo de la membrana basal que separa las células epiteliales de la lámina propia. Forman un sincitio tridimensional bajo el epitelio superficial o rodeando las criptas, por lo que estos últimos son llamados fibroblastos pericripticos. Poseen características morfológicas y funcionales de fibroblastos y de células de músculo liso. Así, por ejemplo, expresan proteínas como la α -actina del músculo liso (α -SMA), considerada el mejor marcador de los miofibroblastos subepiteliales. Secretan proteínas de la matriz extracelular además de diferentes citoquinas, quimoquinas, hormonas, neurotransmisores, proteínas de adhesión, factores de crecimiento y mediadores de la inflamación. Los miofibroblastos también expresan receptores para muchos de esos ligandos, lo que les permite mediar información paracrina en ambas direcciones: hacia y desde las células epiteliales, el sistema inmune y otras células mesenquimales de la lámina propia. De esta manera controlan la homeostasis del epitelio intestinal e intervienen en procesos inflamatorios e inmunológicos, así como en la protección, remodelación, regeneración y reparación de lesiones de la mucosa intestinal (Andoh y cols., 2005; ver revisiones de Powell y cols., 2005; Mifflin y cols., 2011).

Nuestro grupo de investigación demostró por primera vez que los miofibroblastos subepiteliales del intestino delgado del ratón y rata también producen la proteína Reelina (García-Miranda y cols., 2010 y 2012) y que ésta regula la homeostasis cripta-vellosidad (García-Miranda y cols., 2013).

PRINCIPALES VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN LA HOMEOSTASIS DEL EPITELIO DEL COLON

Se han identificado y estudiado numerosas moléculas y vías de señalización que afectan a los procesos de proliferación, migración, diferenciación y apoptosis del epitelio del colon. Entre las vías de señalización podemos destacar las vía de Wnt, Notch, Hedgehog y la del factor de crecimiento transformante β (TGF β) /proteína morfogenética del hueso (Bmp) (Figura 5). Los mecanismos moleculares por los que ocurren estos procesos no son bien conocidos y aún menos los implicados en los procesos de inflamación, regeneración y cáncer de colon. Estas rutas de señalización no son independientes unas de las otras sino que interaccionan entre sí lo que permite una completa regulación de la homeostasis epitelial (ver revisiones Bertrand y cols., 2012; Jeon y cols., 2013).

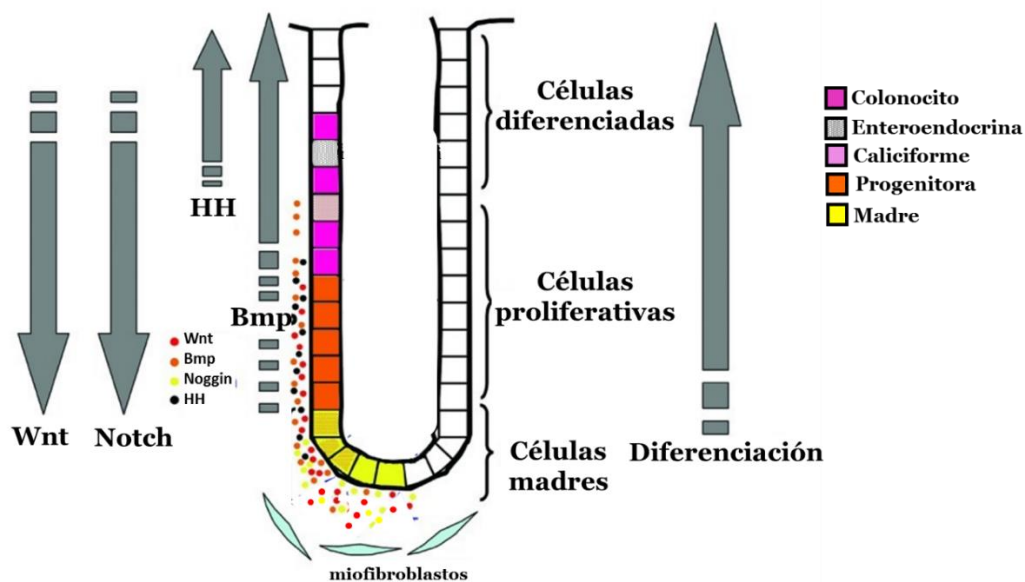


Figura 5. Representación esquemática de las principales vías de señalización implicadas en la homeostasis de la cripta del colon. Las flechas indican los gradientes de actuación de las vías. (Esquema adaptado de Bertrand y cols., 2012).

Vía Wnt

La vía de señalización Wnt es la principal vía de activación de la proliferación y diferenciación de las células madre de la cripta en el colon adulto.

La vía de señalización Wnt incluye dos posibles rutas, la canónica y la no canónica. La ruta no canónica es independiente de β -catenina y utiliza diferentes mecanismos de señalización como respuesta a la señal Wnt. La ruta canónica es dependiente de β -catenina, siendo la ruta esencial en la regulación de la proliferación celular intestinal. En ella, el ligando Wnt se une al complejo formado por los receptor de membrana, Frizzled, y los receptores de lipoproteínas de baja densidad. La activación del complejo receptor conduce a la inhibición del complejo APC (Adenomatosis Polyposis Coli) y a la acumulación de β -catenina en el citoplasma. La β -catenina viaja al núcleo, donde activa factores de transcripción celular de los genes diana de Wnt, como por ejemplo, *c-Myc*, *ciclina D*, *Efrina B*, *receptores de efrina B*, *SOX9* (“SRY-box containing gene 9”) y *Cdx-2* (“caudal type homeobox 2”).

En ausencia del ligando Wnt, las β -cateninas citoplasmáticas son degradadas por el complejo multiproteico formado por APC y cinasas, cuya función es marcar, mediante fosforilación, a las β -cateninas para su ubiquitinación y rápida degradación mediante proteosomas.

También se ha descrito que Wnt participa en la diferenciación de los colonocitos a través de la fosforilación e inhibición del factor de transcripción Atoh-1 (“Protein atonal homolog 1”) (perteneciente a la vía Notch), y junto con la vía TGF β /Bmp está implicada en la formación de las criptas (ver revisión Noah y cols., 2011). Estudios recientes demuestran que esta vía está involucrada también en los procesos de regeneración tisular (ver revisiones Yang y cols., 2014; Sebio y cols., 2014; Krausova y Korinek, 2014).

Vía Notch

La vía de señalización Notch es la principal vía de regulación de la diferenciación de las células de la cripta en el colon adulto. Notch1, Notch2, Dll1 y Dll4 son los receptores y ligandos que se expresan en el epitelio intestinal. La unión ligando-receptor resulta en una cascada proteolítica que libera el dominio intracelular de Notch, el cual se transporta al

núcleo activando la expresión de genes como *Hes-1* (“Hairy and enhancer of Split 1”) y *Olfm4* (Olfactomedina 4).

La activación de *Hes-1* produce una disminución de *Atoh1* y que las células no diferenciadas se diferencien hacia células absortivas o colonocitos. Una represión de *Hes-1* aumenta la actividad de *Atoh1*, y el destino celular es hacia el desarrollo de células secretoras como las caliciformes, enteroendocrinas y tufts.

La vía Notch participa también en la proliferación y supervivencia de las células madre a través de la activación del gen *Olfm4*. Esta vía está implicada en la mayoría de los cánceres de colon y en las enfermedades inflamatorias (ver revisiones Bertrand y cols., 2012; Jeon y cols., 2013; Noah y Shroyer, 2013).

Vía Hedgehog

La vía de Hedgehog es fundamental en la formación del sistema nervioso entérico y de la capa muscular durante el desarrollo embrionario del colon. Su función principal es la diferenciación de las células mesenquimales en células musculares, miofibroblastos y pericitos, regulando la homeostasis del mesénquima.

La unión de los ligandos Hedgehog a los receptores Patched libera la proteína Smoothened, que se inserta en la membrana y activa la translocación al núcleo de los factores de transcripción Gli, los cuales promueven la proliferación y diferenciación celular. En ausencia de ligandos, los receptores Patched inhiben la señal traducida por el receptor Smoothened.

La vía Hedgehog inhibe de forma paracrina la vía Wnt en las células de la cripta, regulando la formación de la cripta.

Se ha demostrado que la señalización de esta vía disminuye cuando se produce daño tisular y aumenta durante la fase de reparación, lo que indica que la vía Hedgehog tiene una función importante en la regeneración del epitelio intestinal. (ver revisiones Büller y cols., 2012; Bertrand y cols., 2012; Jeon y cols., 2013).

Vía TGF β /BMP

La señalización de la superfamilia de factores de crecimiento transformantes tipo β (TGF β) regula el desarrollo embrionario, la cicatrización de heridas, la proliferación y la

diferenciación celular. La superfamilia TGF β consta de citoquinas, como la isoforma TGF β , de la proteína morfogenética del hueso (BMP) y de activinas.

La unión de los ligandos a sus receptores serina/treonina quinasa fosforila a los factores de transcripción Smad (BMP fosforila principalmente a Smad 1,5 y 8 y TGF β a Smad 2 y 3), los cuales forman un complejo con Smad -4 que se traslada al núcleo y regula la transcripción y la expresión de sus genes diana, controlando así el desarrollo intestinal.

La vía Bmp antagoniza a la vía Wnt/ β -catenina, por lo que participa junto a ésta en la regulación de la formación de la cripta y de la proliferación celular. Mutaciones en la vía Bmp favorece la progresión del cáncer y de enfermedades como la poliposis intestinal juvenil, demostrando su papel inhibitorio en la proliferación celular (ver revisiones Noah y cols., 2011; Betrand y cols., 2012; Jeon y cols., 2013).

ENFERMEDADES INFLAMATORIAS INTESTINALES

Las enfermedades inflamatorias intestinales constituyen un problema sanitario cuya incidencia ha ido incrementándose en los últimos años. Principalmente incluye dos patologías: la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. La enfermedad de Crohn puede cursar con una inflamación transmural y afectar a cualquier parte del tracto gastrointestinal, aunque suele ser más común en el íleon o en la región perianal. Por otro lado, la colitis ulcerosa cursa con una inflamación de la mucosa limitada a la región del colon. Aunque la etiología de las enfermedades inflamatorias intestinales está todavía por determinar, estudios recientes indican que se debe a la integración de distintos factores, tales como la susceptibilidad genética, las condiciones ambientales externas, la flora microbiana intestinal y la respuesta inmune (ver revisión Zhang y Li, 2014). Estudios recientes han identificado una gran variedad de genes asociados a las enfermedades inflamatorias intestinales (Jostins y cols., 2012).

Durante las dos últimas décadas la mayoría de los estudios sobre la respuesta inmunitaria en las enfermedades inflamatorias intestinales se han centrado en la respuesta inmune adaptativa, sin embargo, las investigaciones más recientes lo hacen en la respuesta inmune innata de la mucosa durante la inflamación aguda o en la primera fase de la inflamación crónica. En este tipo de respuesta desempeña una función fundamental la barrera intestinal que forma el epitelio, el moco que recubre el epitelio, los enterocitos/colonocitos y las células especializadas en la defensa e inflamación como las células de Paneth y los neutrófilos (ver revisión Zhang y Li, 2014).

La enfermedad inflamatoria intestinal se caracteriza por una desregulación de la homeostasis epitelial. Las células epiteliales se comunican con las células mesenquimales que las rodean a través de cascadas de señalización de citoquinas inflamatorias u otras moléculas, y alteraciones en estas vías pueden producir patologías intestinales. Las células mesenquimales promueven la proliferación de las células epiteliales e intervienen en los procesos de reparación, directamente mediante comunicación con las células madre epiteliales, o indirectamente regulando la actividad de leucocitos inflamatorios. Entre las citoquinas mejor estudiadas que contribuyen a la patogénesis de la enfermedad inflamatoria intestinal destacan el interferón γ (IFN γ), la interleucina-1 β (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α). Por otro lado, citoquinas antiinflamatorias sobre la homeostasis intestinal son la interleucina-10 (IL-10) y el factor de crecimiento transformante- β 1 (TGF- β 1), las cuales protegen la mucosa intestinal al inhibir la expresión de citoquinas inflamatorias. Además de las citoquinas antiinflamatorias se producen otras moléculas que intervienen en la resolución de la inflamación intestinal, afectando a los procesos que mantienen la homeostasis intestinal (ver revisión Koch y Nusrat, 2012).

SISTEMA DE SEÑALIZACIÓN DE LA REELINA

En 1951, Falconer describió por primera vez un tipo de ratones mutantes espontáneos a los que les denominó *reeler*. Este tipo de ratones presentaban una mutación autosómica recesiva que les provocaba anomalías arquitectónicas severas en la corteza cerebral. Las neuronas no eran capaces de alcanzar su posición correcta durante el desarrollo del cerebro. El resultado era la desaparición de la estructura laminar de la corteza cerebral, cerebelar y del hipocampo. Los ratones *reeler* presentan ataxia al desplazarse, distonía postural y temblores a partir de la segunda semana de vida. Son incapaces de mantenerse sobre sus patas traseras, y frecuentemente se caen hacia los lados cuando se están desplazando. La viabilidad y fertilidad de estos ratones mutantes es reducida (D’Arcangelo y cols., 1995).

En 1995 se clonó el gen que codifica la Reelina y se descubrió que el ratón “*reeler*” no expresaba Reelina (D’Arcangelo y cols., 1995; Bar y cols., 1995; Hirotsune y cols., 1995).

La Reelina es una glicoproteína de la matriz extracelular de gran tamaño (420 KDalton). Contiene un extremo amino-terminal glicosilado necesario para la multimerización de la proteína y la consiguiente actividad biológica, una región central que contiene 8 secuencias de aminoácidos que se repiten, necesaria para la unión de la Reelina

a sus receptores y un extremo carboxilo-terminal fundamental para la activación de la señalización intracelular. Una vez en el espacio extracelular la Reelina puede sufrir rotura proteolítica produciéndose tres fragmentos: extremo amino, extremo carboxilo y fragmento central. La proteasa que actúa hidrolizando a la Reelina no ha sido descrita aún, aunque se sabe que pertenece a la familia de las metaloproteinasas. Tanto la Reelina completa, como el fragmento central son capaces de unirse a los receptores, si bien parece que sus efectos principales los realiza en su forma completa (ver revisiones D'Arcangelo, 2006).

La proteína Reelina es fundamental para la regulación de la migración y posicionamiento de las neuronas, células de la glía y astrocitos durante el desarrollo embrionario, regulando la laminación de la corteza cerebral, hipocampo y cerebelo. En el cerebro adulto participa en el mantenimiento de la conectividad y plasticidad sináptica, responsables del desarrollo cognitivo (ver revisión Folsom y Fatemi, 2013).

Para ejercer su acción la Reelina se une a los receptores de membrana VldLR (receptores de lipoproteínas de muy baja densidad), ApoER2 (receptor 2 de la apolipoproteína E), o $\alpha\beta 1$ integrina. Algunos autores también consideran como receptor a la proteína CNR1 (receptor 1 neuronal relacionado con la cadherina) y el receptor de la Efrina (Ephb). Sin embargo, se ha descrito que los receptores que median la señal de la Reelina *in vivo* son el VldLR y el ApoER2 ya que sólo los ratones doble-mutantes en ambos genes (*VldLR* y *ApoER2*) presentan un fenotipo igual al del ratón reeler (ver revisión Knuesel, 2010; Bouché y cols. 2013).

El ARNm de ambos receptores se ha detectado en cerebro, testículo y ovarios. VldLR también se ha observado en corazón, riñón, músculo, pulmón, tejido adiposo e hígado (ver revisión Reddy y cols., 2011). Nuestro grupo de investigación detectó la presencia de ambos receptores en el epitelio del intestino delgado de rata y ratón (García-Miranda y cols., 2010, 2012).

La unión de la Reelina a sus receptores induce la fosforilación de la proteína citosólica Dab1 (Disabled 1) mediante cinasas de la familia Src. La función mejor estudiada y descrita de la Dab1 es la de traducir la señal iniciada por la Reelina regulando la migración neuronal durante el desarrollo del cerebro. Ratones mutantes espontáneos para el gen de la Dab1 presentan un fenotipo muy parecido al de los ratones mutantes para el gen de la Reelina (Gonzalez y cols., 1997; Howell y cols., 1997).

La Dab1 fosforilada traduce la señal a otras vías de señalización, que regulan la dinámica microtubular de la célula, promoviendo la migración neuronal y la laminación cerebral. Por otro lado, activa a los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) que permiten la entrada de Ca^{2+} en la célula contribuyendo así en la formación y modulación de la transmisión y plasticidad de la sinapsis neuronal (ver revisión Folsom y Fatemi, 2013) (Figura 6).

El ARNm de Dab1 se ha detectado en el sistema nervioso, en células hematopoyéticas (Howell y cols., 1997), en próstata, endometrio, cérvix, ovario y glándulas mamarias (McAvoy y cols., 2008) y más recientemente en tejido adiposo, testículo y bazo (Long y cols., 2011), entre otros. Nuestro grupo de investigación lo ha detectado en la mucosa del intestino delgado y grueso (García-Miranda y cols., 2010) y hemos sugerido una función ligada a la Reelina en la homeostasis de la unidad cripta-vellosidad (Vázquez-Carretero y cols., 2014).

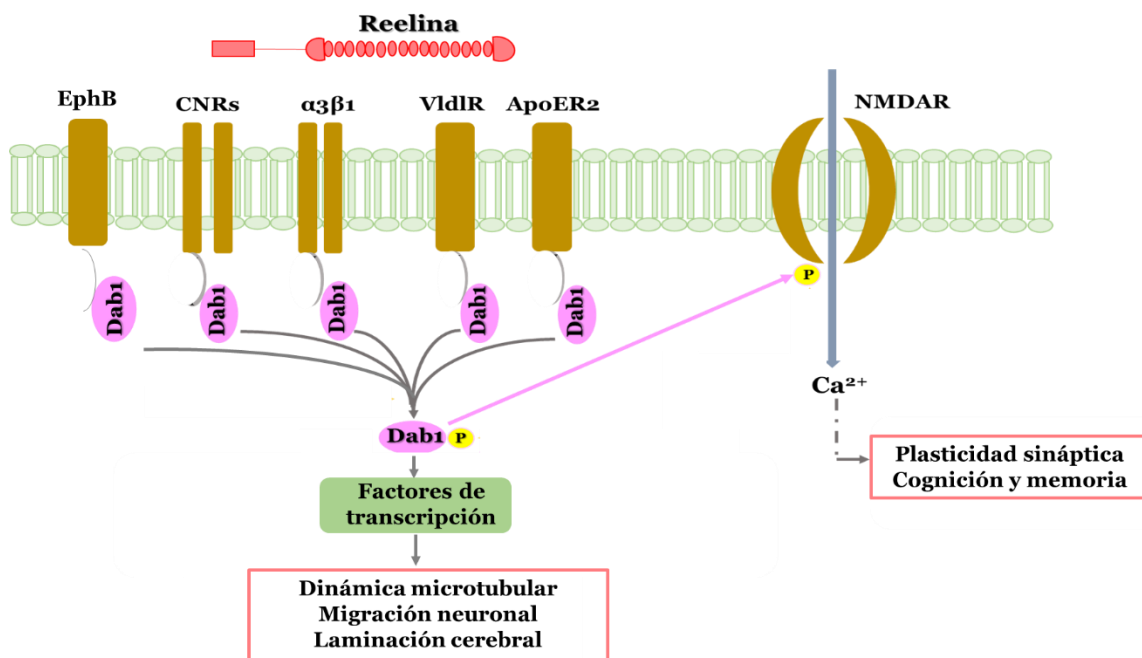


Figura 6. Sistema de señalización de la Reelina-Dab1 en el sistema nervioso (esquema adaptado de Folsom y Fatemi, 2013).

En el sistema nervioso central, la Reelina es secretada fundamentalmente por las células de Cajal-Retzius durante el desarrollo embrionario, mientras que en el cerebro

adulto es secretada fundamentalmente por interneuronas GABAérgicas de la neocorteza e hipocampo, las células granulosas glutamatérgicas del cerebelo, las células piramidales de la corteza entorrinal y células de la glía (Knuesel, 2010).

La Reelina también se expresa en otros tejidos adultos periféricos aunque en menor cantidad que en cerebro. Se ha detectado en: los túbulos seminíferos del testículo, la región intersticial del ovario y las células endoteliales de los vasos sanguíneos de riñón, hígado y bazo (Ikeda y Terashima, 1997); las células cromafines de la glándula adrenal, la glándula pituitaria y el plasma sanguíneo (Smalheiser y cols., 2000); odontoblastos (Maurin y cols., 2004); las células estrelladas del hígado (Kobold y cols., 2002; Samama y Boehm, 2005); el páncreas (Sato y cols., 2006); la retina y la córnea (Pulido y cols., 2007); el tejido mamario (Stein y cols., 2010; Khialeeva y cols., 2011); el epitelio gástrico (Dohi y cols., 2010) y tejido mesodérmico (Díaz-Mendoza y cols., 2013), entre otros. Nuestro grupo de investigación describió por primera vez la presencia de Reelina en el epitelio del intestino delgado (García-Miranda y cols., 2010), y su función en la regulación de la dinámica de la cripta-vellosidad (García-Miranda y cols., 2013). Posteriormente otros autores han corroborado la expresión de Reelina en el tejido intestinal (Saaed y cols., 2012; Xiong y cols., 2013). La función de la Reelina en los tejidos periféricos es desconocida, aunque hay datos que parecen indicar que la Reelina está implicada en el desarrollo de los tejidos y en la reparación tras daño tisular (Pulido y cols., 2007; Lorenzetto y cols., 2008; Won y cols., 2006; Courtès y cols., 2011; Rebutini y cols., 2012).

Regulación de la transcripción de la *Reelina*

Se han descrito dos mecanismos de regulación transcripcional de la *Reelina* en el sistema nervioso: regulación a través de factores de transcripción que se unen a secuencias específicas del promotor, y regulación epigenética, mediante metilación de sitios CpG del promotor y acetilación de histonas.

La *Reelina* es un gen largo compuesto por 65 exones que ocupa 450 kb del ADN genómico. Su promotor contiene sitios de unión a factores de transcripción y una isla CpG con residuos de citosinas susceptibles de metilación (Figura 7). Los factores de transcripción Sp1, Pax6 (Paired Homeobox 6), Tbr1 (T brain 1), CREB (elemento de unión dependiente de AMPc), NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) y Cask (serina cinasa dependiente de calcio/calmodulina) actúan como reguladores positivos de la expresión de *Reelina*. Cask puede ejercer su acción

uniéndose directamente al promotor o bien formando un complejo con la proteína Tbr1 (Bredt, 2000). La unión del factor de transcripción Snail inhibe la expresión de la *Reelina* y es mediador de la señal producida por la proteína TGF β 1 (Yuan y cols., 2012). De igual forma el fragmento intracelular del receptor ApoER2 de la Reelina (ApoER2-ICD), que surge tras unión de la Reelina con ApoER2, se une al promotor regulando negativamente la transcripción (Balmaceda y cols., 2014).

La proteína DNMT1 (ADN metiltransferasa 1) es la principal proteína encargada de metilar los sitios CpG del promotor de la *Reelina*, silenciando su expresión. Inicialmente se pensaba que la DNMT1 sólo actuaba en el mantenimiento del patrón de metilación de las células mitóticas, sin embargo se ha demostrado que también regula la metilación de los genes en células que no están en división (Inano y cols., 2000). La metilación del promotor por la DNMT1 recluta proteínas desacetilasas de las histonas (HDCAs), produciéndose un alto grado de condensamiento de la cromatina que dificulta el acceso de los factores de transcripción al promotor. La suma de todos estos procesos provoca el silenciamiento de la expresión del gen de la *Reelina*. Para que la transcripción de la *Reelina* se active es necesario que las histonas se acetilen y se desmetilen los sitios CpG, para que el promotor quede accesible a los factores de transcripción (ver revisiones Grayson y cols., 2006; Levenson y cols., 2008).

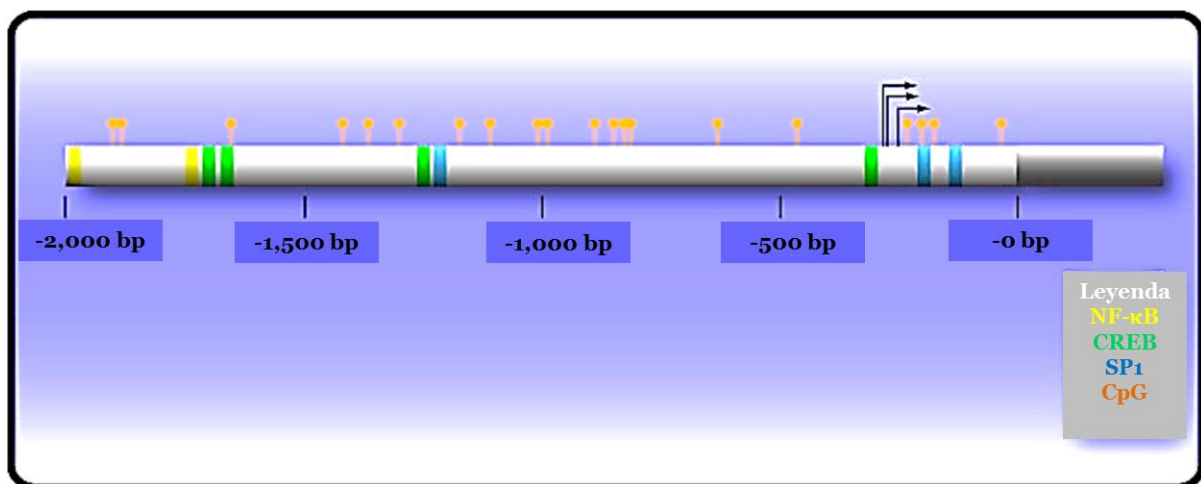


Figura 7. Promotor de la Reelina en el ratón. Se muestran algunos de los sitios CpG y de unión específica a factores de transcripción. (Esquema adaptado de Levenson y cols., 2008)

Implicación de la Reelina en procesos patológicos y en la regeneración tisular

En el hombre existen múltiples enfermedades neurológicas que se han relacionado con el gen de la Reelina o con los componentes de la vía de señalización, como la esquizofrenia, el autismo, el Alzheimer, la lisencefalia, el trastorno bipolar, el desorden depresivo mayor (ver revisión Folsom y Fatemi, 2013) y la epilepsia (Haas y Frotscher, 2010; Dazzo y cols., 2015). En casi todas ellas la expresión de la Reelina se encuentra reducida. En el Alzheimer además se considera que la disminución de la proteína Reelina precede a la formación de las placas beta amiloides.

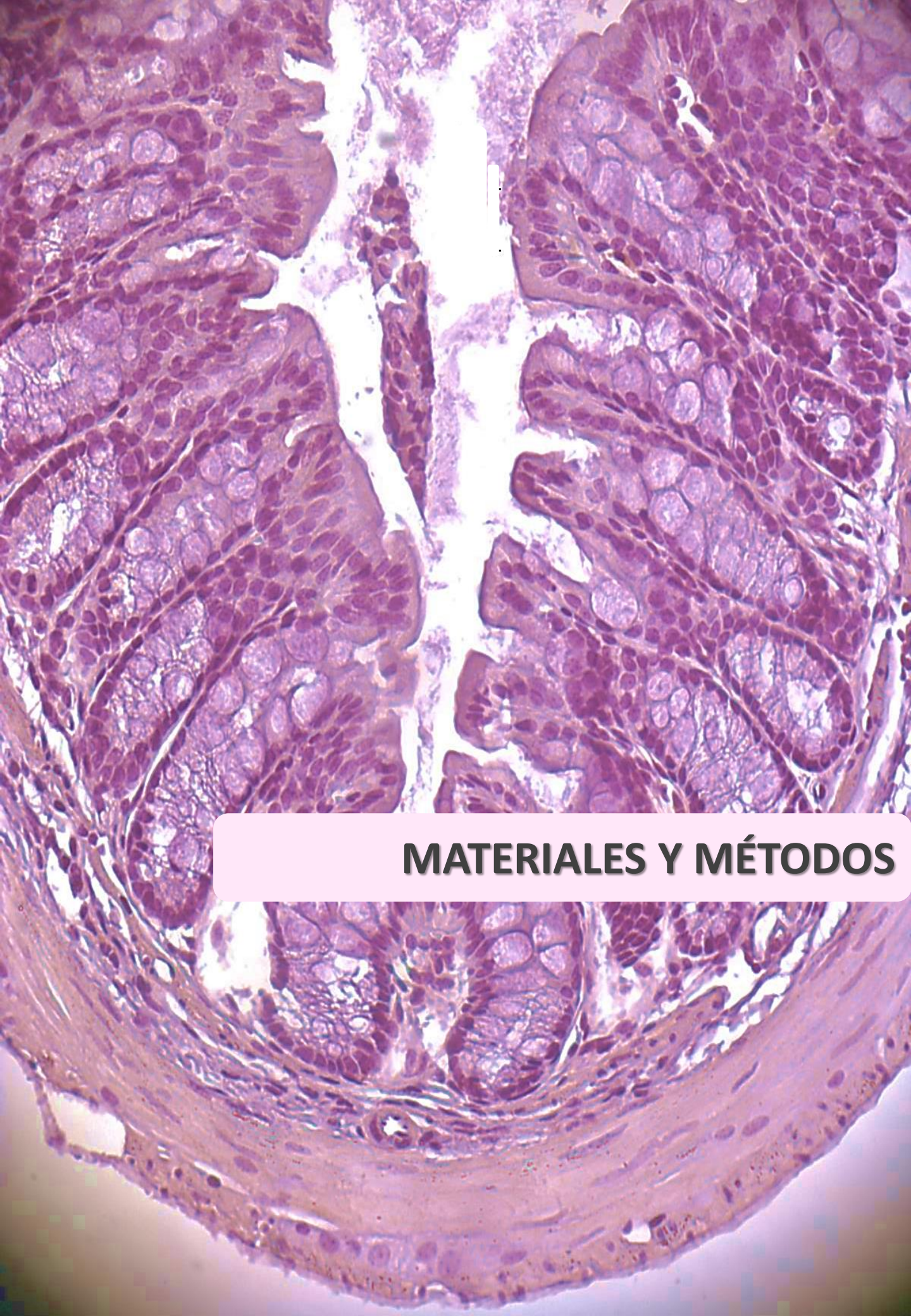
También ha sido relacionada con procesos patológicos periféricos, como la enfermedad de Hirschprung, donde la Reelina se encuentra aumentada (Saeed y cols., 2012). La expresión de Reelina también se encuentra alterada en el desarrollo de algunos cánceres. En el cáncer de mama (Stein y cols., 2010), en el gástrico (Dohi y cols., 2010), en el pancreático (Sato y cols., 2006) y en el carcinoma hepatocelular (Okamura y cols., 2011) la Reelina se encuentra disminuida, en cambio los niveles aumentan en el cáncer de próstata (Perrone y cols., 2007) y en el retinoblastoma (Seigel y cols., 2007). Wang y cols. (2002) observaron un aumento en la expresión de Cask y Reelina en el cáncer de esófago mientras que Yuan y sus cols. (2012) describieron una disminución de la Reelina por acción del TGF β 1 en este mismo tipo de cáncer. También ha sido relacionada con procesos inflamatorios así, en la artritis reumatoide la Reelina está aumentada (Magnani y cols., 2010) y disminuye en el cerebro de embriones de ratones gestantes cuyas madres han sido sometidas previamente a inflamación cerebral (Harvey y Boksa, 2012). La infección por rotavirus de las células Caco-2 induce un aumento de la expresión del ARNm de Reelina (Cuadras y cols., 2002).

Se han observado aumentos en la expresión de la Reelina tras lesión de distintos tejidos, sugiriendo la participación de la Reelina en la reparación/regeneración de los tejidos dañados. Es el caso de lesiones en la córnea y la retina (Pulido y cols., 2007), en la mielina del nervio periférico (Lorenzatto y cols., 2008), tras isquemia y daño cerebral (Won y cols., 2006; Courtès y cols., 2011) y en la regeneración de la glándula submandibular (Rebustini y cols., 2012).

Nuestro grupo de investigación identificó por primera vez los componentes del sistema de señalización de la Reelina (Reelina, VldlR, ApoER2 y Dab1) en el intestino delgado de rata y ratón y demostró que las proteínas Reelina y Dab1 están implicadas en la dinámica del eje cripta-vellosidad. Otros resultados observados en los ratones *reeler* (deficientes en Reelina) mostraban: i) alteraciones en la morfología de la mucosa del intestino delgado observándose mayor anchura de las uniones adherentes, lo que podría permitir el acceso de antígenos de la luz intestinal; ii) una disminución en el número de células Paneth, que reduciría la defensa antimicrobiana intestinal; y iii) variaciones en la expresión de genes implicados en la respuesta inmune e inflamación. Todo ello nos hizo pensar que la Reelina podría tener una función en las patologías intestinales.

Por lo anteriormente expuesto, el objeto del presente trabajo es estudiar la expresión, función y regulación del sistema de señalización de la Reelina en la mucosa del colon normal e inflamado de ratón, de acuerdo con el siguiente plan de trabajo:

1. Expresión de los genes *Reelina*, *Dab1*, *VldlR* y *ApoER2* en la mucosa del colon de ratón, y el efecto de la edad en dicha expresión.
2. Localización de las proteínas Reelina, VldlR, ApoER2 y Dab1 en las células de la mucosa del colon de ratón.
3. Análisis de la morfología y homeostasis de la mucosa del colon de ratón en presencia y ausencia de la *Reelina*.
4. Efecto de la ausencia de la Reelina en la expresión de los genes *SOX9*, *Ciclina D1*, *Cdx-2*, *Smad5*, *Hes-1* y *Atoh-1* en el colon de ratón.
5. Efecto del tratamiento con un agente inflamatorio en la expresión de Reelina, Dab1, VldlR y ApoER2.
6. Análisis del grado de inflamación en el colon de ratones control y *reeler*.
7. Efecto de la inflamación en la expresión de los genes *SOX9*, *Ciclina D1*, *Cdx-2*, *Smad5*, *Hes-1* y *Atoh-1* en el colon de ratones control y *reeler*.
8. Regulación de la expresión de la Reelina en el colon de ratón durante la inflamación.



MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se han utilizado ratones de la cepa C57BL/6J y ratones control (tipo salvaje) y *reeler* (mutante) de la cepa B6C3Fe/J.

Los ratones de la cepa C57BL/6J procedían del Centro de Producción y Experimentación animal de la Universidad de Sevilla (Espartinas) y las parejas de ratones heterocigóticos para el gen de la Reelina (rl^+/rl^-) (cepa B6C3Fe/J) de los Laboratorios Jackson (Estados Unidos), a través de los Laboratorios Charles River (España). Los ratones homocigóticos para la mutación (rl^-/rl^-) se obtuvieron mediante el cruce de parejas de heterocigóticos en el animalario de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla. La cepa de ratones mutantes para el gen de la Reelina utilizada fue la “Edinburgh”, que posee una delección de 150 kb, de manera que al transcribirse el gen de la Reelina se origina un ARN mensajero que posee una delección de 8 kb en el extremo 3' de las 12 kb de las que consta, no pudiendo ser detectado ni el ARN mensajero ni la proteína (D'Arcangelo y cols., 1996, Royaux y cols., 1997).

Los animales se mantuvieron con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, en condiciones adecuadas de temperatura y humedad en el animalario de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, con libre acceso al agua y al pienso. El pienso utilizado fue Global Rodent Diet para los ratones C57BL/6J y pienso extrusionado Global 2019 para los ratones transgénicos, ambos de Harlan Iberica S.L.

Las edades de los ratones fue de 16 días, 1, y 3 meses.

El sacrificio de éstos se realizó de acuerdo a las normas éticas de experimentación con animales 86/609/EEC del Consejo Europeo, mediante dislocación cervical.

APARATOS

Para la realización del presente trabajo se han empleado los siguientes aparatos:

- Agitador de balanceo (Heidolph, Duomax 1030)
- Autoclave (Selecta, Autester-E)

- Baño termostático (Selecta, Precisdig)
- Cámara de flujo laminar (Microflow, 25674)
- Cámara de fotos digital (SPOT Insight V 3.5)
- Cámara de fotos manual (POLAROID, DS34)
- Campana extractora (CRUMA, 870)
- Centrífuga refrigerada (Beckman, J2-21) con rotor JA-17
- Criostato (Leica, CM 1510 S)
- Cubeta de electroforesis para geles de acrilamida (Bio-Rad, Mini Trans-Blot Cell)
- Cubeta de electroforesis para geles de agarosa (Sigma-Aldrich, SHU6)
- Espectrofotómetro (Hitachi, U-2001)
- Estufa digital (Selecta, Digitheat, 2001242)
- Fuentes de alimentación Power-Pac 200, Power-Pac 300 y Power-Pac 3000 (Bio-Rad)
- Homogeneizador Politrón (Ystral, T-1500)
- Incubadora con agitación orbital (Innova 4000, 152)
- Lámpara de luz ultravioleta (CE, TFX-20M)
- Lector de placas (ASYS, UVM 340)
- Microcentrífuga (Eppendorf, 5415C)
- Microscopio electrónico (Philips, CM-10)
- Microscopio óptico (Axioskop 40, Carl Zeiss)
- Microtomo (Histo-line Laboratories, MR 2258)
- pHmetro (HANNA, HI 221)
- Sonificador (Sonic&Materials Inc. Danbury, Vibra Cell)
- Termociclador (Techne, Progenie)
- Termociclador para tiempo real (Bio-Rad, MJ MiniOpticom)

REACTIVOS

Los productos químicos utilizados se obtuvieron de Sigma-Aldrich (España), salvo que se indique otra procedencia.

Los anticuerpos para las distintas técnicas inmunológicas realizadas se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Anticuerpos empleados

	ANTICUERPO	PROCEDENCIA	LABORATORIO	DILUCIÓN	
Anticuerpos primarios	Inmunohistoquímica	α Actina de músculo liso Clon1A4 (A2547)	Ratón	Sigma-Aldrich	1:100
		ApoER2 (H-135): sc-20746	Conejo	Santa Cruz Biotechnology, INC.	1:25
		BrdU (Clon BU 33) (B2531)	Ratón	Sigma-Aldrich	1:300
		CA I (H48):sc-134853	Conejo	Santa Cruz Biotechnology, INC.	1:50
		Caspasa 3 activa (Asp175)	Conejo	Cell Signaling	1:200
		Cromogranina A (NB120-15160)	Conejo	Novus Biologicals	1:100
		Dab1 (AB5840)	Conejo	Chemicon	1:200
		Mucina 2 (H-300):sc-15334	Conejo	Santa Cruz Biotechnology, INC.	1:50
		Reelina (G10) (NB600-1081)	Ratón	Novus Biologicals	1:500
		Reelina (H-221): sc-5578	Conejo	Santa Cruz Biotechnology, INC.	1:50
		Sox9 (H-90):sc-20095	Conejo	Santa Cruz Biotechnology, INC.	1:50
		Vilina Ab-1(Clon CWWB1)	Ratón	Thermo Scientific	1:100
		VldLR (6A6):sc-18824	Ratón	Santa Cruz Biotechnology, INC.	1:25
		Western Blot	α Actina de músculo liso (A5228)	Ratón	Sigma-Aldrich
β -Actina (AC-74) (A5316)	Ratón		Sigma-Aldrich	1:4000	
DNMT1 (D4692)	Conejo		Sigma-Aldrich	1:4000	
GAPDH Clon71.1 (G8795)	Ratón		Sigma-Aldrich	1:15.000	
Anticuerpos secundarios	IH	IgG de conejo conjugado con biotina	Cerdo	Dako	1:300
		IgG de ratón conjugado con biotina	Conejo	Dako	1:300
		IgG de cabra conjugado con biotina	Conejo	Dako	1:300
		IgG de conejo conjugado con biotina	Cabra	Vector Laboratories	1:200
		IgG de ratón conjugado con biotina	Cabra	Vector Laboratories	1:200
	W-B	IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano	Cabra	Sigma-Aldich	1:8000
		IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano	Oveja	Sigma-Aldich	1:8000

GENOTIPADO DE RATONES

El genotipado de los ratones se realiza siguiendo el protocolo descrito por D'Arcangelo y cols., (1996). Primero se extrae el ADN genómico procedente de alguno de los dedos de los ratones siguiendo un código para su identificación y utilizando la solución de extracción QuickExtract™ (EPICENTRE), conforme a las instrucciones del fabricante.

Posteriormente, con 5 µl del ADN genómico extraído se realiza una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando tres cebadores específicos del gen de la Reelina, de los cuales, uno es sentido (TAATCTGTCCTCACTCTGCC) y dos son anti-sentido (CAGTTGACATACCTTAAT; TGCATTAATGTGCAGTGT). La polimerasa de ADN usada para esta reacción fue la MyTaq (Bioline), y las condiciones de reacción fueron: una primera etapa de desnaturalización del ADN de 2 min a 95°C, posteriormente, cuarenta ciclos que comprendían: 20 segundos a 95°C, 20 segundos a 55°C y 15 segundos a 72°C, y por último, una etapa de elongación de 2 min a 72°C.

El producto de esta reacción se analiza mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2%. Los tres posibles genotipos se identifican en función del tamaño de las bandas obtenidas: 266 pb para el genotipo normal (+/+), 266 y 363 pb para el heterocigótico (+/-) y 363 pb para el reeler (-/-).

MATERIAL BIOLÓGICO EMPLEADO

Tras el sacrificio de los ratones los tejidos se extraen rápidamente del animal y se lavan con solución salina fisiológica fría (4°C). Se miden, pesan y se cortan en trozos que se procesan según para lo que van a ser utilizados. Así se procede a su congelación en nitrógeno líquido, fijación en p-formaldehído al 4% o incubación en 1mM ditioneitol (DTT) en PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10,1 mM Na₂HPO₄ y 1,8 mM KH₂PO₄), según la finalidad del mismo.

Las preparaciones biológicas empleadas fueron: tejido cerebral, tejido intestinal y mucosa, muscular, células aisladas y extractos proteicos de colon.

Obtención de la capa mucosa y muscular del colon de ratón

Para obtener la capa mucosa del colon proximal y distal, una vez extraídos los tejidos se abren longitudinalmente y, sobre una placa de vidrio y en baño de hielo, se raspa la

mucosa con un portaobjetos y se guarda en tubos de 1,5 ml, congelándose en nitrógeno líquido y conservándose a -80°C hasta su utilización. Luego se continúa raspando para asegurar la retirada de posibles restos de la capa mucosa y submucosa y se termina recogiendo el tejido restante que corresponde a la capa muscular. Al igual que con la mucosa, el tejido se guarda en tubos de 1,5 ml, se congela en nitrógeno líquido y se conserva a -80°C . Para asegurar que la obtención de las dos capas ha sido correcta se fija un trozo del tejido muscular aislado en un portaobjeto con adhesivo y se procede luego a su tinción con hematoxilina para su observación al microscopio óptico.

Aislamiento de fracciones celulares del colon de ratón

El aislamiento secuencial de fracciones enriquecidas en colonocitos y miofibroblastos de la mucosa del colon se realiza siguiendo el protocolo descrito por Leeb y cols. (2002) con algunas modificaciones. Para ello, los tejidos del colon proximal y distal del animal, una vez extraídos y lavados, se abren longitudinalmente y se cortan en segmentos de aproximadamente 2 cm. Las piezas se incuban a temperatura ambiente durante 15 min en PBS con 1 mM DTT. A continuación se incuban durante 30 min en un baño a 37°C con agitación en PBS que contiene 1 mM EDTA y 2 mM glucosa. Los segmentos de intestino se agitan manualmente con una varilla, durante 30 segundos, para favorecer el desprendimiento de los colonocitos y, la suspensión celular resultante se filtra a través de una malla de nylon de 60 μm de poro. Se recogen los colonocitos por centrifugación a 900 g durante 2 min a 4°C . A continuación se repite el proceso (incubación, agitación y filtración) para favorecer el desprendimiento de los colonocitos y criptas restantes que son desechados.

Para el aislamiento de los miofibroblastos se continúa con el tejido no descartado. Para ello se lava con PBS y se incuba a 37°C con agitación durante 30 min en PBS que contiene 1 mg/ml de colagenasa y 2 mg/ml de hialuronidasa. Finalmente se agita mediante vórtex durante 30 segundos y se recogen los miofibroblastos subepiteliales por centrifugación a 900 g durante 2 min a 4°C .

Las distintas fracciones celulares se montan sobre portaobjetos con adhesivo y se almacenan a -20°C hasta su uso en inmunohistoquímica o bien se congelan en nitrógeno líquido y se conservan a -80°C hasta su utilización para extracción de ARN.

El enriquecimiento celular de cada una de las fracciones se evalúa midiendo , mediante PCR en tiempo real, el ARNm de marcadores específicos de cada tipo celular: Vilina para colonocitos (West y cols., 1998) y la α -actina del músculo liso (α -SMA) para los miofibroblastos (Mahida y cols., 1997).

Obtención de los extractos proteicos

Se obtienen del colon intacto mediante su homogeneización con Polytron (Ystral) a alta velocidad en “solución de lisis” (50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1% NP40, 0,1% Na deoxicolato, 150mM NaCl, 2 mM EDTA, 10mM EGTA) que contienen inhibidores de proteasas: aprotinina (20 μ g/ml), leupeptina (10 μ g/ml) y fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) (1 mM). El homogenado se incubaba a 4°C durante 10 min y se clarifica mediante centrifugación a 14.000 g durante 30 min.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

La concentración de proteínas presente en los extractos se determina mediante el método descrito por Bradford (1976) empleando la γ -Globulina como proteína estándar.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA SU OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO

Microscopio óptico

Los tejidos extraídos del colon proximal y distal se fijan con p-formaldehído al 4% durante toda la noche a 4°C y con agitación orbital. Dependiendo de si se quiere incluir en parafina o en resina el tejido a observar, se realiza uno u otro de los siguientes procedimientos:

En el primero de los casos, los tejidos ya fijados se someten a un proceso de deshidratación utilizando alcoholes de concentraciones crecientes (70%, 80%, 90% y 100%) y por último xilol, a temperatura ambiente y con agitación orbital. A continuación se pasan por una mezcla de xilol: parafina (1:1) a 60°C y se incluyen en parafina previamente calentada a 60°C, donde se mantienen toda la noche. Por último, los bloques de parafina con los tejidos correctamente orientados se dejan solidificar a temperatura

ambiente. Se realizan secciones de 5 μm con un microtomo, se montan en portaobjetos con adhesivo (StarFrost® *adhesive slides*, Knittel Glaser, Alemania) y se conservan a temperatura ambiente hasta su utilización.

Cuando se quiere incluir el tejido en resina, los tejidos ya fijados se sumergen en soluciones con concentraciones crecientes de sacarosa (20 y 30%) y se congelan en isopentano a -15°C . Se realizan cortes histológicos de 10 μm con un criostato y, tras ser montados en portaobjetos con adhesivo (StarFrost® *adhesive slides*, Knittel Glaser, Alemania), se conservan a -20°C hasta su utilización.

En el caso de las preparaciones con células aisladas (ver Aislamiento de fracciones celulares), el volumen del pellet obtenido de colonocitos y miofibroblastos es diluido en PBS y se montan alícuotas de 20 μl sobre portaobjetos con adhesivo, extendiéndolas aproximadamente en 1 cm^2 . Las preparaciones se secan durante 10 min a 37°C y se almacenan a -20°C .

Microscopio electrónico de transmisión

Los tejidos extraídos del colon distal se fijan en Glutaraldehído al 4% en tampón Cacodilato 0,1 M (pH 7,4) durante 3 horas a 4°C . Posteriormente se lavan en tampón Cacodilato 0,1 M y se vuelven a fijar a 4°C durante 1-2 horas con Tetróxido de Osmio (OsO_4) al 1%. Tras un nuevo lavado en tampón Cacodilato con Sacarosa al 7,5%, los tejidos son sometidos a un proceso de deshidratación a 4°C pasándolos por cantidades crecientes de Acetona (30, 50 y 70%) y se tiñen con una solución al 2% de acetato de uranilo en acetona al 70%. Finalmente los tejidos son incluidos en resina SPURR y se realizan secciones ultrafinas (80-100nm) con micrótopo (Reichert-Jung, Ultracut E.) que son recogidas en rejillas de cobre (Electron Microscopy Science, G200-Cu). Tanto la inclusión en resina como la preparación del corte del tejido se realizan en el CITIUS (Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla).

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Se realizan medidas morfológicas de la mucosa y muscular de la pared del colon y de las microvellosidades y uniones intercelulares del epitelio del colon.

Las medidas morfológicas de la pared del colon se hacen en secciones de parafina de 5 μm , obtenidas del colon proximal y distal de ratones control y reeler de 1 y 3 meses. Para unificar el estudio, se realizan las medidas en cortes de la misma porción de colon, para lo cual se cortó un segmento de un centímetro de longitud de la zona más proximal del colon proximal y más distal del colon distal. Para estas medidas se utiliza el microscopio óptico y el programa de tratamiento de imágenes SPOT Advance. Las preparaciones utilizadas fueron previamente teñidas con hematoxilina-eosina, de acuerdo a métodos rutinarios.

Las medidas morfológicas del epitelio del colon se hacen en secciones ultrafinas de resina de 80-100 nm, obtenidas del colon distal de ratones control y reeler de 3 meses. Las secciones son examinadas y fotografiadas en el CITIUS mediante microscopio electrónico de transmisión (Philips CM-10) equipado con cámara (Olympus Veleta).

Las medidas son realizadas por tres observadores.

INMUNOHISTOQUÍMICA

Los ensayos de inmunohistoquímica se han realizado en preparaciones de células aisladas y en secciones de tejido del colon proximal y distal de ratón. Los anticuerpos empleados en el presente estudio, así como las diluciones de los mismos, se detallan en la Tabla 1.

Inmunohistoquímica en células aisladas

Las preparaciones de fracciones celulares se descongelan y se fijan durante 10 min con p-formaldehído al 2% en PBS a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se lavan con PBS y se permeabilizan con tritón X-100 al 0,1% en PBS durante 20 min a temperatura ambiente. Tras lavar con PBS, se incuban durante 30 min con H_2O_2 al 0,3% en metanol, para inhibir la actividad peroxidasa endógena. Las uniones inespecíficas del anticuerpo se bloquean incubando las muestras en solución de bloqueo (1% suero de cabra, 1% albúmina bovina sérica, 0,1% tritón en PBS) durante 30 min a temperatura ambiente, en cámara húmeda y con agitación. Seguidamente, se incuban con el anticuerpo primario en solución de bloqueo o únicamente con solución de bloqueo, sin anticuerpo primario (para el control), a 4°C durante toda la noche.

Tras lavado con PBS, las muestras se incuban con el anticuerpo secundario conjugado con biotina, diluido en solución de bloqueo, a temperatura ambiente y en oscuridad durante 90 min. Se lavan extensivamente con PBS y se incuban durante una hora a temperatura ambiente con el complejo avidina-biotina (ABC, Vector), siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras varios lavados con PBS, se incuban durante 15 min con diaminobenzidina (DAB) en cámara húmeda y oscuridad y a continuación con DAB y H₂O₂ al 0.05% hasta la aparición de color. Por último se lava con PBS y se deja secar. Las muestras se incluyen en pegamento de montaje EUKITT® (O. Kindler GmbH) para su observación al microscopio óptico. Las preparaciones fueron fotografiadas utilizando la cámara fotográfica digital SPOT Insight V3.5., acoplada al microscopio Axioskop 40 Carl Zeiss y el programa informático SPOT advanced 3.5.4.1.

Inmunohistoquímica en tejido

A excepción de los ensayos de inmunohistoquímica realizados para medida de la migración, proliferación y apoptosis celular sobre criosecciones del tejido (ver apartados “Medidas de proliferación y migración celular” y “Medida de apoptosis”), los demás ensayos se realizaran sobre secciones de tejido incluido en parafina, siguiendo el proceso que se detalla a continuación:

Los portaobjetos con secciones de parafina de colon proximal y distal se desparafinan pasando primero por la estufa a 60°C durante 30 min y luego por una batería de alcoholes: xilol (1,5 min x2), etanol 100% (30 s), metanol (14,5 min), etanol 100%, 95% y 70% (30 s en cada uno) y agua (30 s). A continuación se sumergen en una solución de citrato trisódico, pH 6, durante 10 min en el microondas.

Tras permeabilizar se lavan con PBS y las uniones inespecíficas del anticuerpo se bloquean mediante incubación con solución de bloqueo (Dako), durante 10 min. Todas las incubaciones se realizan en cámara húmeda y a temperatura ambiente.

Los portaobjetos se lavan con PBS y se incuban durante 15 min con avidina-estreptavidina (Vector). Tras lavar con PBS 5 min se incuban con biotina (Vector) 15 min. Se lavan con PBS 5 min.

A continuación las preparaciones se incuban con el anticuerpo primario disuelto en PBS (con suero de cabra al 5%) o únicamente con PBS, sin el anticuerpo primario (para el control) durante 1 hora. Tras lavado extensivo con PBS, las muestras se incuban con el

anticuerpo secundario disuelto en PBS (con 5% suero de cabra) durante 45 min. Se lavan extensivamente con PBS y se incuban con peroxidasa- estreptavidina (Vector) disuelto en PBS, durante 30 min. Tras varios lavados, se incuban a temperatura ambiente con DAB, durante 10-15 min, hasta la aparición de señal. Se lavan con PBS y se procede a deshidratar siguiendo la misma batería de alcoholes que al inicio pero esta vez en sentido creciente, finalizando con la incubación en xilol durante 20 segundos.

Finalmente las muestras se incluyen en pegamento de montaje EUKITT® para su observación al microscopio óptico. Las preparaciones son fotografiadas utilizando la cámara fotográfica digital SPOT Insight V3.5. acoplada al microscopio Axioskop 40 Carl Zeiss.

MEDIDAS DE PROLIFERACIÓN Y MIGRACIÓN CELULAR

Las medidas de proliferación y migración celular se realizan mediante la detección de la incorporación de 5-Bromodeoxiuridina en el ADN de nueva síntesis, según el protocolo descrito por Garabedian y cols. (1997). Para ello se inyecta intraperitonealmente 0,12 mg de 5-Bromodeoxiuridina (ref. B5002) por gramo de peso corporal del ratón. Los ratones se sacrifican a las 1,5 h y a las 15 h después de la inyección para la medida de proliferación y migración, respectivamente. Se usaron ratones control y reeler de 1 mes.

La incorporación de 5-Bromodeoxiuridina en el ADN se detecta mediante ensayo inmunohistoquímico sobre criosecciones del colon proximal y distal. Las criosecciones se descongelan (10 min a 37° C), y se tratan 10 min a 37°C con H₂O₂ al 3% en metanol para inactivar la actividad peroxidasa endógena. Posteriormente, para desnaturalizar el ADN, se incuban 30 min a 37°C con HCl 2N y para permeabilizar el tejido 10 min a 37°C con tripsina al 0,1% en PBS.

Para bloquear los sitios de unión inespecíficos del anticuerpo primario se tratan con solución de bloqueo (5% Suero de cabra en PBS) a 37°C durante 15 min. Seguidamente, se incuban con el anticuerpo anti-BrdU (5-Bromodeoxiuridina) a una dilución de 1:300 en solución de bloqueo a 4°C durante 15 horas. Tras un lavado extensivo, los cortes se incuban con el anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con biotina a una dilución 1:100 durante 1,5 h, a temperatura ambiente y en la oscuridad. Finalmente, se lavan extensivamente con PBS.

Para visualizar la señal se utiliza el kit ABC (Vector), siguiendo el protocolo del fabricante, y se incuba posteriormente con Diaminobenzidina (ref. D4293) durante 15 min a temperatura ambiente y oscuridad. Luego se vuelve a incubar con Diaminobenzidina y H_2O_2 al 0,05% hasta la aparición de señal. Las preparaciones son observadas con el microscopio óptico y fotografiadas utilizando la cámara fotográfica digital SPOT Insight V 3.5. acoplada al microscopio.

Después de las 1,5 horas de la incorporación de 5-Bromodeoxiuridina, nos permite identificar las células que se encuentran en la Fase S del ciclo celular. De esta forma, la proliferación celular se mide como el número de células marcadas por cripta bien orientada longitudinalmente. La velocidad de la migración celular se cuantificó midiendo la distancia entre la base de las criptas y la última célula marcada tras las 15 horas después de la inyección. Para estas medidas se utilizó el programa SPOT Advance a partir de imágenes digitalizadas de las preparaciones.

Las medidas fueron realizadas por tres observadores.

MEDIDA DE LA APOPTOSIS CELULAR

El estudio de la apoptosis celular se aborda mediante ensayos inmunohistoquímicos utilizando el anticuerpo anti-Caspasa 3 activa. La Caspasa 3 es una proteína proapoptótica, la cual al activarse desencadena la muerte celular. Se considera por lo tanto un buen marcador para la mayoría de los sistemas apoptóticos (Gown y Willingham, 2002).

Los ensayos inmunohistoquímicos se realizan sobre criosecciones del colon proximal y distal. Las criosecciones se descongelan durante 40 min a temperatura ambiente, y se permeabilizan con etanol del 100% a $-20^{\circ}C$ durante 10 min. Tras lavar con PBS se realiza una segunda permeabilización con Tritón al 0,1% en PBS a temperatura ambiente durante 10 min. Se vuelve a lavar con PBS y se incuban con H_2O_2 al 3% en metanol en cámara húmeda y temperatura ambiente (para inactivar la actividad peroxidasa endógena).

Para bloquear los sitios de unión inespecíficos del anticuerpo primario las secciones se tratan con solución de bloqueo (3% Suero de cabra, 3% de albúmina bovina sérica y 0,1% tritón en PBS) durante 30 min a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Seguidamente, se incuban con el anticuerpo anti-Caspasa3 activa a una dilución 1:200 en solución de bloqueo a $4^{\circ}C$ durante toda la noche. Tras lavado extensivo, los cortes se

incubaban con el anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con biotina a una dilución 1:200 durante 1,5 horas, a temperatura ambiente y en la oscuridad. Se lavan extensivamente con PBS.

Para visualizar la señal se utiliza el kit ABC (Vector), siguiendo el protocolo del fabricante, e incubando posteriormente con Diaminobenzidina (ref. D4293) durante 20 min a temperatura ambiente y oscuridad. Luego se vuelve a incubar con Diaminobenzidina y H₂O₂ al 0,05% hasta la aparición de señal. Las preparaciones son observadas con el microscopio óptico y fotografiadas utilizando la cámara fotográfica digital SPOT Insight acoplada al microscopio.

La apoptosis se expresa como el número de células macadas por cripta. Las medidas fueron realizadas por tres observadores distintos.

DETECCIÓN DE LAS CÉLULAS CALICIFORMES

La identificación de las células caliciformes se realiza mediante ensayo inmunohistoquímico de la glicoproteína Mucina 2 (Muc-2), característica de las células caliciformes maduras, y mediante tinción con colorante Alcian-Blue y Ácido Periódico-Schiff (PAS) marcadores del moco ácido y neutro, respectivamente, en secciones de parafina de colon proximal y distal de ratones control y reeler de 3 meses de edad. Las preparaciones son observadas con el microscopio óptico y fotografiadas utilizando la cámara fotográfica digital SPOT Insight acoplada al microscopio.

La cuantificación se realiza con la tinción PAS y los resultados se presentan como el número de células caliciformes por cripta. Las medidas son realizadas por tres observadores diferentes.

ANÁLISIS DE WESTERN BLOT

Los ensayos de Western se realizan con extractos de proteínas (ver “obtención de extractos proteicos”) según el método de Laemmli y cols. (1970).

La electroforesis se realiza en geles de sodio-dodecil-sulfato-poliacrilamida (SDS-PAGE) de diferente porcentaje según la proteína en estudio. Se cargan 30-80 µg de proteína en cada carril. Luego se transfiere a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm de diámetro de poro (NitroBind, Osmonics).

Para bloquear las uniones inespecíficas del anticuerpo, la membrana se incubaba con leche no grasa (Bio-Rad) al 5% en TBST (154 mM NaCl, 0,1% Tween 20 y 100 mM Tris-HCl (pH 7,5)) durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación se incubaba con el anticuerpo primario (Tabla 1) en TBST con 5% de leche a 4°C durante 15 horas. La membrana se lava 3 veces con TBST durante 15 min. Posteriormente, se incubaba con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (Tabla 1) disuelto en TBST con 5% de leche a temperatura ambiente durante 1 hora, seguido de otros 3 lavados de 15 min con TBST.

Para normalizar la abundancia de la proteína, las membranas también se incubaban con el anticuerpo anti- β -actina o anti-GADPH seguido de una incubación con un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa.

La visualización de las bandas se realiza mediante quimioluminiscencia utilizando el *kit* “ECL Western Blotting Analysis System” (GE Healthcare RPN2109). Luego se revela mediante autorradiografía utilizando la película fotográfica Hyperfilm ECL (GE Healthcare). El tamaño de las bandas fue calculado a partir de marcadores estándar de proteínas (Bio-Rad) y su abundancia relativa fue cuantificada mediante el programa informático “PCBAS” versión 2.0 (Fuji, EEUU), usando el programa Image J (versión 1.46).

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL

El ARN total se extrae de cerebro, duodeno, yeyuno, íleon, colon proximal y colon distal y de las fracciones celulares mediante el *kit* comercial “RNeasy® Mini” (QUIAGEN). La concentración, la pureza y la integridad del ARN total obtenido se determinan mediante espectrofotometría (absorbancia a 260 nm y 280 nm) y electroforesis en gel de agarosa al 1%. El ARN obtenido se somete a un tratamiento con DNAsa y a una transcripción reversa, usando 1 μ g de ARN total y el *kit* comercial “QuantiTect® Reverse Transcription” (QUIAGEN) para obtener el ADN complementario (ADNc). En ambos casos se siguieron las instrucciones del fabricante.

Para la reacción de amplificación se utiliza: 1 μ l ADNc problema, 0,4 μ M de cebadores específicos (Tabla 2) y 10 μ l de la enzima SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad). En

todos los casos se incluyen blancos que no tienen ADNc. Se utiliza β -actina como gen de referencia para la normalización de los valores de ARNm de las diferentes muestras.

La amplificación se realiza en el termociclador MiniOpticon™ (Bio-Rad) utilizando el siguiente protocolo: 3 min a 95°C para desnaturalizar el ADN, seguido de 35 ciclos de 40 s a 95°C, 40 s a 58°C y 40 s a 72°C y por último, una etapa de elongación de 3 min a 72°C. Posteriormente se realiza un análisis de curvas de disociación calentando la muestra desde los 65°C hasta los 95°C en intervalos de 1°C y monitorizando la fluorescencia. Esta curva representa la temperatura de separación de las cadenas de ADN o temperatura de fusión frente a la fluorescencia emitida por el producto de PCR. La temperatura de fusión es específica para cada fragmento de ADN amplificado. La obtención de un único producto de PCR fue confirmado por la aparición de un único pico en la curva de disociación obtenida.

Para cada ADNc, la reacción de PCR se hace por triplicado. En cada muestra, se determinó el número de ciclos necesarios para alcanzar un nivel de fluorescencia umbral (Ct). Los resultados se analizan usando el método comparativo de Ct en una hoja de cálculo (*Gene Expression Macro*) proporcionada por Biorad (Vandesompele y cols., 2002). Se usa el método 2^{-AC^T} para validar a la β -actina como gen de control interno (Livak y Schmittgen, 2001). Para normalizar la expresión del ARNm se toma como valor 1 el valor mínimo del gen que presenta menor abundancia relativa.

Tabla 2. Cebadores específicos para PCR en Tiempo Real

RATON			
GEN	GenBank ID	SENTIDO (5'...3')	ANTISENTIDO (5'...3')
ApoER2	NM_001080926.1	GAATGAAGGCAGCCAGAT	GTTGTCGAAATTCATGCTC
α-SMA	NM_007392.3	CTTTGCTGGTGATGATGCTC	GCGAAGCTCGTTATAGAAGG
β-actina	NM_007393.3	ACCCACACTGTGCCCATCTA	CGGAACCGCTCATTGCC
Cask	NM_001284503.1	TCTCCAGAAAGTGCTAACGG	ATGAAGTGACCTTGCCTGTG
Cdx2	NM_007673.3	AACTACAGGAGCCAGAGGCA	AGGGACAGGAAGTCCAGGTT
CycD1	NM_007631.2	AGGCTACAGAAGAGTATTTATGGGAA	TGCGTTTGAATCAAGGGAGAT
Dab1	NM_010014.2	GACATCACAGATCATCGG	CTGGTACACAGATTGTTAC
Dnmt1	NM_010066.4	CAAGTTCGCTATCTTGTATCC	TGATGTTGAAAGTAAAGGCCTC
IFN-g	NM_008337.3	CAGCAACAGCAAGGCGAAA	CTGGACCTGTGGGTTGTTGAC
Il1b	NM_008361.4	TTGACGGACCCAAAAGATG	AGAAGGTGCTCATGTCCTCAT
Il6	NM_031168.1	ACAAGTCGGAGGCTTAATTACACAT	TTGCCATTGCACAACCTTTTTTC
Reln	NM_011261.2	GGACTAAGAATGCTTATTTCC	GGAAGTAGAATTCATCCATCAG
Smad5	NM_021692.1	GACAGCAGCATCTTTGTTTCAG	ATCCATGGTTGACTGACTGAG
Sox9	NM_011448.4	TCGTGTGTGTGTGTTTATAG	ATTCCTATTGCTACACTCAG
Sp1	NM_013672.2	AACAACACTACCACCAGCA	AACTAGCTGAGGCTGAATAAGGA
TGFβ1	NM_011577.1	ATCCTGTCCAAACTAAGGCTC	TGACCTCTTTAGCATAGTAGTCC
TNF-α	NM_013693.3	TCTCATCAGTTCTATGGCCC	GGGAGTAGACAAGGTACAAC
Vilina	NM_009509.2	TGGAAGAGTTTCAACAGAGG	GTGGTTCATAATTGCCATCAG
VldLR	NM_013703.2	GTGTACTIONTGAAGACCACTGAAGAG	GCTGGCTCTGTTACCATTC

PCR ESPECÍFICA DE METILACIÓN (MSP) Y SECUENCIACIÓN GENÓMICA

El ADN total del colon distal de los ratones se extrae mediante el *kit* comercial “DNeasy® Blood & Tissue” (QUIAGEN). La concentración y la pureza del ADN total obtenido se determinan mediante espectrofotometría (absorbancia a 260 nm y 280 nm).

Para identificar los sitios CpG metilados del promotor génico de la Reelina se utiliza el *kit* comercial “EZ DNA Methylation™” (Zymo Research), en el que el ADN es tratado con bisulfito sódico transformando así las citosinas metiladas en citosinas no metiladas y

las citosinas no metiladas en timinas. El producto obtenido se amplifica mediante PCR usando: 200 ng del ADN transformado, 0,4 μM de cebadores específicos (5'GTGATAGTGGTTATGTATGATATGTAG 3' y 5'ACCTTCTTAAAACCCCTAAC 3') y 2 μl de la enzima ADN polimerasa MyFi™ (Bioline). Los cebadores se diseñan con el programa "Methyl Primer Express Software" (v.1.0).

La amplificación se realiza en el termociclador MiniOpticon™ (Bio-Rad) utilizando el siguiente protocolo: 1 min a 95°C para desnaturalizar el ADN, seguido de 40 ciclos de 15 s a 95°C, 15 s a 61°C y 30 s a 72°C y por último, una etapa de elongación de 5 min a 72°C. Posteriormente se realiza un análisis de las curvas de disociación tal y como se menciona en el apartado "PCR en tiempo real"

El producto que se obtiene de esta reacción se carga en un gel de agarosa al 2%. A continuación se recoge la banda obtenida y se procede a purificar el ADN usando el *kit* comercial "QIAquick® Gel Extraction". Con este ADN purificado se realiza una segunda PCR idéntica a la primera para obtener mayor cantidad de producto de ADN que se extrae y purifica siguiendo el mismo método anterior. Las muestras de ADN extraídas son enviadas al servicio de Genómica y Secuenciación del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS) para el procesamiento y análisis de las secuencias resultantes.

Para determinar el porcentaje de metilación de cada uno de los sitios CpG se analiza directamente el cromatograma obtenido en la secuenciación de cada una de las muestras. Para ello se aplica el criterio propuesto por Kate Patterson y cols.(2011): 0% metilado (cuando la onda obtenida en el cromatograma es una timina), 25%metilado (cuando aparecen dos ondas, una correspondiente a la timina, más alta, y otra correspondiente a la citosina, más baja), 50% metilado (cuando aparecen dos ondas , una correspondiente a la timina y otra a la citosina, y se encuentran a la misma altura), 75% metilado (cuando aparecen dos ondas, una correspondiente a la citosina, más alta, y otra correspondiente a la timina, más baja), 100% metilado (cuando la onda obtenida en el cromatograma corresponde a citosina).

Los resultados se expresan como la media del porcentaje obtenido para cada sitio CpG tras analizar 5 secuencias/muestra, de un total de 5 muestras por cada condición experimental.

Las medidas son analizadas por tres observadores diferentes.

INDUCCIÓN DE LA INFLAMACIÓN

En las últimas décadas se han desarrollado diferentes modelos animales que reproducen la enfermedad inflamatoria intestinal con características muy parecidas a la humana. Estos modelos pueden dividirse en modelos de colitis inducible y animales genéticamente modificados. La inducción de la colitis a través de sustancias químicas es uno de los más usados ya que son simples de generar y fácilmente controlables en cuanto al inicio, duración y gravedad de la inflamación. Los compuestos químicos más usados en las últimas dos décadas son el dextrano sulfato sódico (DSS) y el ácido sulfónico trinitrobencénico (TNBS).

El DSS es un polisacárido sulfatado con variable peso molecular que puede ir desde los 5 kDa hasta los 1400 kDa. Está demostrado que es tóxico para las células epiteliales del colon alterando la integridad de la barrera epitelial por afectación de las uniones ocluyentes, principalmente. El peso molecular del DSS es un parámetro importante para la inducción y localización de la colitis. En ratones la colitis más severa se alcanza con la administración de DSS con peso molecular de 40 kDa, afectando principalmente a la parte media y distal del colon (ver revisión Perse y Cerar, 2012).

Por lo descrito anteriormente, en el presente trabajo hemos escogido el modelo de colitis inducido por DSS porque nos permite generar una colitis aguda de manera sencilla y reproducible. La colitis se induce mediante la administración de DSS (TdB Consultancy, Pm= 40 KDa) al 3% en el agua de bebida (ver revisión Solomon y cols., 2010). Dado que los ratones reeler beben una media de 5-6 ml al día, se limita a todos los animales a este volumen para que la ingesta sea la misma.

El sacrificio de los animales se realiza: 1) a los 9 días de administración de DSS, cuando la pérdida de peso es superior al 10% de su peso inicial, en grupos experimentales de colitis aguda y 2) a los 3, 6 y 9 días de administración de DSS, en grupos experimentales en los que se evalúa la progresión de la enfermedad.

EVALUACIÓN DE LA INFLAMACIÓN

Índice de la actividad de la enfermedad (DAI)

La evaluación clínica de la inflamación incluye un registro diario del peso corporal, de la consistencia de las heces y de la aparición de sangrado rectal que son valorados según la escala descrita en la Tabla 3 y permite calcular el índice de actividad de la enfermedad (DAI) (Gommeaux y cols., 2007). Este parámetro se obtiene realizando la media de las distintas medidas y puede tener valores entre 0-3.

La valoración es realizada por dos observadores distintos.

Tabla 3. Criterios de puntuación del DAI.

Puntuación	Pérdida de Peso (%del peso inicial)	Consistencia de heces	Sangre Rectal
0	<1	Consistentes, formadas	No
1	1-4,99	Sueltas pero no adheridas al ano	Pequeño sangrado en las heces; región anal seca
2	5-10	Muy ligeras y adheridas al ano	Sangrado en heces; la sangre en el orificio anal
3	>10	Líquidas o muy líquidas y ano húmedo	Alto sangrado en las heces; la sangre se extiende por todo el ano

Análisis macroscópico del intestino

Al finalizar el tratamiento los ratones son sacrificados, se extrae el colon y se lava con suero salino a 4°C como se ha descrito anteriormente. Se realiza un análisis macroscópico de los tejidos consistente en determinar: 1) la presencia de sangre y 2) el peso y longitud de las distintas partes del intestino. De estos últimos datos se calcula la relación peso (g)/longitud (cm) de cada uno de los tejidos indicativo también del grado de inflamación.

Análisis histológico del colon

Los tejidos desparafinados e hidratados (xilol- etanol 100%- 96%- 80%- 70%- 50% y agua) se tiñen con hematoxilina y eosina y se incluyen en pegamento de montaje EUKITT® para su observación al microscopio óptico. Las secciones se fotografían utilizando la cámara fotográfica digital SPOT Insight acoplada al microscopio óptico.

Para evaluar las alteraciones histológicas se realizan medidas morfométricas del tejido (profundidad de las criptas, ancho de la mucosa y ancho de la muscular) y se puntúan los siguientes parámetros en una escala de 0-3, según el método descrito por Gaudio y cols. (1999): 1) destrucción del epitelio y glándulas; 2) dilatación de las criptas glandulares; 3) reducción y pérdidas de células caliciformes, 4) infiltración de células inflamatorias, 5) edema y 6) abscesos en las criptas, utilizando para ello el programa de tratamiento de imágenes SPOT Advance.

Este estudio es realizado por 3 investigadores diferentes que hacen un análisis ciego de los tejidos. La puntuación histológica se obtiene realizando la media aritmética de cada uno de los parámetros estudiados.

Medida de la actividad de la mieloperoxidasa

La infiltración de los neutrófilos se determina midiendo la actividad de la mieloperoxidasa (MPO), según el método descrito por Suzuki y cols. (1983) con algunas modificaciones.

Se descongela el tejido conservado a -80°C y se homogeneiza con el homogeneizador Polytron (Ystral) durante 30 segundos a 4°C en 0,5% HTAB (bromuro de hexametiltrimetilamonio) en tampón 0,2M Tris, pH 6. Este proceso se repite 3 veces. Luego se realizan 5 ciclos de congelación y descongelación, incluyendo sonicación (10

pulsos de 1 segundo) en los tres primeros ciclos. De esta forma se favorece la rotura de las estructuras celulares y la liberación del enzima. La suspensión resultante se centrifuga a 7000 g durante 10 min, a 4°C. La actividad de la MPO se determina añadiendo 50 µL del homogenado a 150 µL de tampón de reacción MPO (50mM fosfato sódico, 33,4 mg/50 ml de orto-dianisidina-HCl, 83 µL/50 ml de H₂O₂ 0,005%) previamente sonicado y calentado a 37°C. A los 5 min de reacción (a 37°C) se mide la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro y se calcula la actividad de la mieloperoxidasa a partir de una curva patrón utilizando MPO de rábano (5 UI/50 µL).

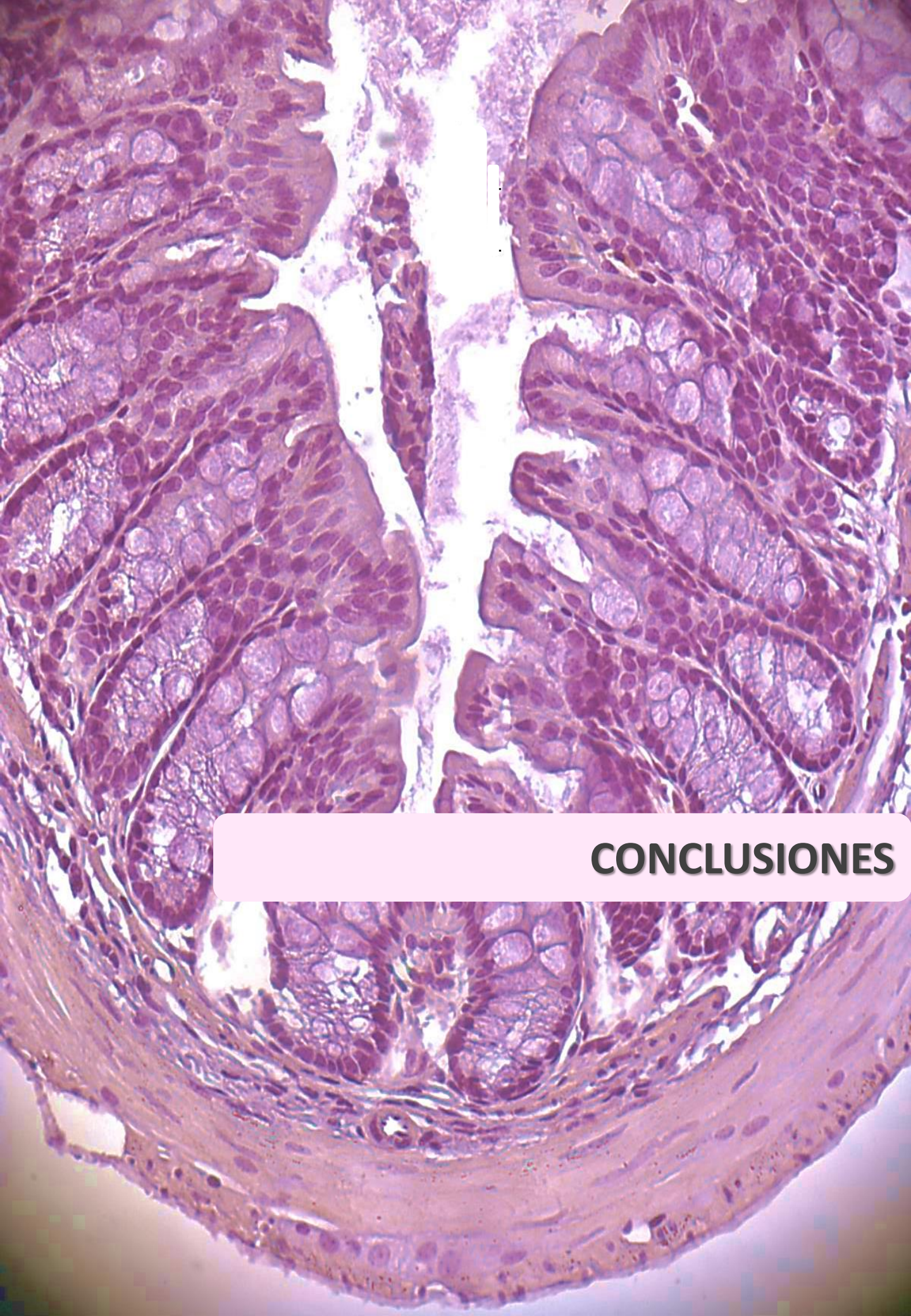
Se define como una unidad de actividad MPO aquella que es capaz de degradar 1mmol de H₂O₂ por min, a 37°C. Los resultados se expresan como unidades de MPO/mg de proteína x min. La determinación de la concentración de proteína es determinada por el método de Bradford (ver apartado “Determinación de la concentración de proteínas”).

Niveles de expresión de marcadores de la inflamación

Se midieron los niveles de ARNm de las citoquinas Interleucina 1β (IL-1β) y factor de necrosis tumoral α (TNF-α), marcadoras de inflamación, mediante RT-PCR en tiempo real.

PRESENTACIÓN DE LOS RESULTADOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los resultados se presentan como la media acompañada de su error estándar (EEM). A menos que se indique lo contrario en los pies de figura, el número de animales (n) usados en cada condición experimental oscila entre 3 y 5. La comparación entre los distintos grupos experimentales (datos pareados) se realizó estadísticamente mediante el test de la “t de Student”. Para comparaciones múltiples se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía, seguido del test de Newman-Keuls (p<0,05).



CONCLUSIONES

1. La mucosa del colon de ratón expresa las proteínas Reelina, sus receptores VldlR y ApoER2 y su proteína efectora Dab1.
2. La Reelina desempeña funciones a lo largo del intestino principalmente en edades más tempranas, mientras que la Dab1 realiza funciones más relevantes en el intestino delgado a todas las edades.
3. La Reelina en la mucosa del colon sólo se expresa en los miofibroblastos, mientras que el resto de componentes del sistema se expresa en los colonocitos y en los miofibroblastos.
4. La ausencia de Reelina disminuye la profundidad y diámetro de las criptas, el grosor de la capa muscular del colon y el grosor de las microvellosidades, y aumenta la longitud de las microvellosidades y el espacio intercelular de los desmosomas del epitelio del colon.
5. La Reelina regula la dinámica del epitelio del colon activando la proliferación, migración, diferenciación y apoptosis celular.
6. La mutación del gen Reelina disminuyó la expresión de los factores de transcripción SOX9 y Cdx-2, sugiriendo que la Reelina regula los procesos de homeostasis del epitelio del colon a través de estos genes pertenecientes a la vía de señalización Wnt.
7. La inflamación inducida con DSS aumenta la abundancia del ARNm y de la proteína Reelina debido a un aumento de su expresión génica en los miofibroblastos de la mucosa del colon.
8. El aumento en la expresión de Reelina durante la inflamación del colon, se produce principalmente por hipometilación de su promotor, debido, entre otros factores, a la disminución de la expresión de la enzima ADN metiltransferasa 1 (DNMT1).
9. La disminución en la expresión de la ADN metiltransferasa 1, durante la inflamación, puede ser debida a un aumento en la expresión del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1) sugiriendo que el efecto antiinflamatorio de esta citocina podría estar mediado, al menos en parte, por la Reelina.
10. Los ratones *reeler* son más susceptibles a la inflamación inducida con DSS, lo que sugiere que la Reelina ejerce una acción protectora en la mucosa del colon.
11. En los ratones *reeler*, el tratamiento con DSS en el colon aumenta la expresión de los genes implicados en la proliferación y migración celular, *Ciclina D1* y *Smad-5*, pertenecientes a las vías de señalización Wnt y BMP, respectivamente, sugiriendo que la Reelina puede participar en el proceso de reparación del tejido dañado.



BIBLIOGRAFÍA

Abdolmaleky HM, Cheng KH, Russo A, Smith CL, Faraone SV, Wilcox M, Shafa R, Glatt SJ, Nguyen G, Ponte JF, Thiagalingam S, Tsuang MT. (2005) Hypermethylation of the reelin (RELN) promoter in the brain of schizophrenic patients: a preliminary report. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 134:60-6.

Allaire JM, Darsigny M, Marcoux SS, Roy SA, Schmouth JF, Umans L, Zwijsen A, Boudreau F, Perreault N. (2011) Loss of Smad5 leads to the disassembly of the apical junctional complex and increased susceptibility to experimental colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 300:586- 97.

Andoh A, Bamba S, Fujiyama Y, Brittan M, Wright NA. (2005) Colonic subepithelial myofibroblasts in mucosal inflammation and repair: contribution of bone marrow-derived stem cells to the gut regenerative response. *J Gastroenterol.* 40: 1089-99.

Balmaceda V, Cuchillo-Ibáñez I, Pujadas L, García-Ayllón MS, Saura CA, Nimpf J, Soriano E, Sáez-Valero J. (2014) ApoER2 processing by presenilin-1 modulates reelin expression. *FASEB J.* 28: 1543-54.

Bar I, Lambert De Rouvroit C, Royaux I, Krizman DB, DERNONCOURT C, Ruelle D, Beckers M y Goffinet AM. (1995). A YAC contig containing the reeler locus with preliminary characterization of candidate gene fragments. *Genomics.* 26: 543-549.

Bento-Abreu A, Velasco A, Polo-Hernández E, Lillo C, Kozyraki R, Tabertero A, Medina JM. (2009) Albumin endocytosis via megalin in astrocytes is caveola- and Dab-1 dependent and is required for the synthesis of the neurotrophic factor oleic acid. *J Neurochem.* 111(1):49-60.

Berrier AL, Yamada KM. (2007) Cell-matrix adhesion. *J Cell Physiol.* 213: 565-573.

Bertrand FE, Angus CW, Partis WJ, Sigounas G. (2012) Developmental pathways in colon cancer: crosstalk between WNT, BMP, Hedgehog and Notch. *Cell Cycle.* 11: 4344-51.

Beuling E, Aronson BE, Tran LM, Stapleton KA, ter Horst EN, Vissers LA, Verzi MP, Krasinski SD. (2012) GATA6 is required for proliferation, migration, secretory cell maturation, and gene expression in the mature mouse colon. *Mol Cell Biol.* 32:3392-402.

Blache P, van de Wetering M, Duluc I, Domon C, Berta P, Freund JN, Clevers H, Jay P.(2004) SOX9 is an intestine crypt transcription factor, is regulated by the Wnt pathway, and represses the CDX2 and MUC2 genes. *J Cell Biol.* 166:37-47.

Blikslager AT, Moeser AJ, Gookin JL, Jones SL, Odle J. (2007) Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. *Physiol Rev.* 87:545-64.

Botella-Lopez A, de Madaria E, Jover R, Bataller R, Sancho-Bru P, Candela A, Compañ A, Pérez-Mateo M, Martínez S, Sáez-Valero J. (2008) Reelin is overexpressed in the liver and plasma of bile duct ligated rats and its levels and glycosylation are altered in plasma of humans with cirrhosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 40:766-75.

Böttner M, Ghorbani P, Harde J, Barrenschee M, Hellwig I, Vogel I, Ebsen M, Förster E, Wedel T. (2014) Expression and regulation of reelin and its receptors in the enteric nervous system. *Mol Cell Neurosci.* Jul; 61:23-33.

Bouché E, Romero-Ortega MI, Henkemeyer M, Catchpole T, Leemhuis J, Frotscher M, May P, Herz J, Bock HH. (2013) Reelin induces EphB activation. *Cell Res.* 23:473-90.

Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.

Bredt DS. Cell biology. Reeling CASK into the nucleus. (2000) *Nature.* 16; 404: 241-2.

Büller NV, Rosekrans SL, Westerlund J, van den Brink GR. (2012) Hedgehog signaling and maintenance of homeostasis in the intestinal epithelium. *Physiology.* 27: 148-55.

Capaldo CT, Farkas AE, Nusrat A. (2014) Epithelial adhesive junctions. *F1000Prime Rep.* 2; 6: 1.

Cariboni A, Rakic S, Liapi A, Maggi R, Goffinet A, Parnavelas JG. (2005) Reelin provides an inhibitory signal in the migration of gonadotropin-releasing hormone neurons. *Development.* 132:4709-18.

Cattin AL, Le Beyec J, Barreau F, Saint-Just S, Houllier A, Gonzalez FJ, Robine S, Pinçon-Raymond M, Cardot P, Lacasa M, Ribeiro A. (2009) Hepatocyte nuclear factor 4alpha, a key factor for homeostasis, cell architecture, and barrier function of the adult intestinal epithelium. *Mol Cell Biol.* 29:6294-308.

Chen Y, Sharma RP, Costa RH, Costa E, Grayson DR. (2002) On the epigenetic regulation of the human reelin promoter. *Nucleic Acids Res.* 30:2930-9.

Cobo ER, Kisson-Singh V, Moreau F, Chadee K. (2015) Colonic MUC2 mucin regulates the expression and antimicrobial activity of β -defensin 2. *Mucosal Immunol.* 8:1360-72.

Coskun M. (2014) The role of CDX2 in inflammatory bowel disease. *Dan Med J.* 61:B4820.

Courtès S, Vernerey J, Pujadas L, Magalon K, Cremer H, Soriano E, Durbec P, Cayre M. (2011) Reelin controls progenitor cell migration in the healthy and pathological adult mouse brain. *PLoS One.* 6: e20430.

Cuadras MA, Feigelstock DA, An S, Greenberg HB. (2002) Gene expression pattern in Caco-2 cells following rotavirus infection. *J Virol.* 76: 4467-82.

D'amico MA, Ghinassi B, Izzicupo P, Manzoli L, Di Baldassarre A. Biological function and clinical relevance of chromogranin A and derived peptides. (2014) *Endocr Connect.* 3 :45-54.

D'Arcangelo G, Miao GG, Chen SC, Soares HD, Morgan JI y Curran T. (1995). A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature.* 374: 719-723.

D'Arcangelo G, Miao GG, Curran T. (1996) Detection of the reelin breakpoint in reeler mice. *Brain Res Mol Brain Res.* 39: 234-6.

D'Arcangelo G. (2006) Reelin mouse mutants as models of cortical development disorders. *Epilepsy Behav.* 8: 81-9.

Davidson LA, Goldsby JS, Callaway ES, Shah MS, Barker N, Chapkin RS. (2012) Alteration of colonic stem cell gene signatures during the regenerative response to injury. *Biochim Biophys Acta.* 1822:1600-7.

Dazzo E, Fanciulli M, Seriola E, Minervini G, Pulitano P, Binelli S, Di Bonaventura C, Luisi C, Pasini E, Striano S, Striano P, Coppola G, Chiavegato A, Radovic S, Spadotto A, Uzzau S, La Neve A, Giallonardo AT, Mecarelli O, Tosatto SC, Ottman R, Michelucci R, Nobile C. (2015) Heterozygous reelin mutations cause autosomal-dominant lateral temporal epilepsy. *Am J Hum Genet.* 96: 992-1000.

Diaz-Mendoza MJ, Lorda-Diez CI, Montero JA, Garcia-Porrero JA, Hurlé JM (2014) Reelin/DAB-1 signaling in the embryonic limb regulates the chondrogenic differentiation of digit mesodermal progenitors. *J Cell Physiol.* 229:1397-404.

Díaz-Mendoza MJ, Lorda-Diez CI, Montero JA, García-Porrero JA, Hurlé JM (2013) Interdigital cell death in the embryonic limb is associated with depletion of Reelin in the extracellular matrix. *Cell Death Dis.* 4:e800.

Dohi O, Takada H, Wakabayashi N, Yasui K, Sakakura C, Mitsufuji S, Naito Y, Taniwaki M, Yoshikawa T. (2010) Epigenetic silencing of RELN in gastric cancer. *Int J Oncol.* 36: 85-92.

Endo Y, Zhang M, Yamaji S, Cang Y. (2012) Genetic abolishment of hepatocyte proliferation activates hepatic stem cells. *PLoS One.*: e31846. doi: 10.1371/journal.pone.0031846. Epub 2012 Feb 23.

Falconer DS. (1951) Two new mutants 'trembler' and 'reeler' with neurological actions in the house mouse. *J. Gent.* 50: 192-205.

Folsom TD, Fatemi SH. (2013) The involvement of Reelin in neurodevelopmental disorders. *Neuropharmacology.* 68: 122-35.

Franco SJ, Martinez-Garay I, Gil-Sanz C, Harkins-Perry SR, Müller U. (2011) Reelin regulates cadherin function via Dab1/Rap1 to control neuronal migration and lamination in the neocortex. *Neuron.* 69:482-97.

Francoeur C, Bouatrouss Y, Seltana A, Pinchuk IV, Vachon PH, Powell DW, Sawan B, Seidman EG, Beaulieu JF. (2009) Degeneration of the pericryptal myofibroblast sheath by proinflammatory cytokines in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology.* 136:268-277.

Garabedian EM, Roberts LJ, McNevin MS y Gordon JI. (1997) Examining the role of Paneth cells in the small intestine by lineage ablation in transgenic mice. *J Biol Chem.* 272:23729-23740.

García-Miranda P, Peral MJ, Ilundain AA. (2010) Rat small intestine expresses the reelin-Disabled-1 signalling pathway. *Exp Physiol.* 95: 498-507.

García-Miranda P, Vázquez-Carretero MD, Sesma P, Peral MJ, Ilundain AA. (2013) Reelin is involved in the crypt-villus unit homeostasis. *Tissue Eng Part A.* 19:188-98.

García-Miranda P, Vázquez-Carretero MD, Sesma P, Peral MJ, Ilundain AA. (2013) Reelin is involved in the crypt-villus unit homeostasis. *Tissue Eng Part A.* 19: 188-98.

Garrod D, Chidgey M. (2008) Desmosome structure, composition and function. *Biochim Biophys Acta.* 1778:572-87.

Gartner L P y Hiatt J L. (1997) *Histología texto y atlas.* Ed. McGraw-Hill Interamericana.

Gassler N, Rohr C, Schneider A, Kartenbeck J, Bach A, Obermüller N, Otto HF, Autschbach F. (2001) Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 281:216- 28.

Gaudio E, Taddei G, Vetusch A, Sferra R, Frieri G, Ricciardi G, Caprilli R. (1999) Dextran sulfate sodium (DSS) colitis in rats: clinical, structural, and ultrastructural aspects. *Dig Dis Sci.* 44:1458-75.

Geibel JP. (2005) Secretion and absorption by colonic crypts. *Annu Rev Physiol.* 67:471-90.

Gerbe F, Legraverend C, Jay P. (2012) The intestinal epithelium tuft cells: specification and function. *Cell Mol Life Sci.* 69:2907-17.

Gersemann M, Becker S, Kübler I, Koslowski M, Wang G, Herrlinger KR, Griger J, Fritz P, Fellermann K, Schwab M, Wehkamp J, Stange EF. (2009) Differences in goblet cell differentiation between Crohn's disease and ulcerative colitis. *Differentiation.* 77:84-94.

Ghaleb AM, McConnell BB, Kaestner KH, Yang VW (2011) Altered intestinal epithelial homeostasis in mice with intestine-specific deletion of the Krüppel-like factor 4 gene. *Dev Biol.* 349:310-20.

Glória L, Cravo M, Pinto A, de Sousa LS, Chaves P, Leitão CN, Quina M, Mira FC, Soares J. (1996) DNA hypomethylation and proliferative activity are increased in the rectal mucosa of patients with long-standing ulcerative colitis. *Cancer.* 78:2300-6.

Gommeaux J, Cano C, Garcia S, Gironella M, Pietri S, Culcasi M, Pébusque MJ, Malissen B, Dusetti N, Iovanna J, Carrier A. (2007) Colitis and colitis-associated cancer are exacerbated in mice deficient for tumor protein 53-induced nuclear protein 1. *Mol Cell Biol.* 27:2215-28.

Gown AM y Willingham MC. (2002) Improved detection of apoptotic cells in archival paraffin sections: immunohistochemistry using antibodies to cleaved caspase 3. *J Histochem Cytochem.* 50: 449-454.

Grayson DR, Chen Y, Costa E, Dong E, Guidotti A, Kundakovic M, Sharma RP. (2006) The human reelin gene: transcription factors (+), repressors (-) and the methylation switch (+/-) in schizophrenia. *Pharmacol Ther.* 111:272-86.

Grayson DR, Jia X, Chen Y, Sharma RP, Mitchell CP, Guidotti A, Costa E. Reelin promoter hypermethylation in schizophrenia (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:9341-6.

Gumbiner BM. (2005) Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:622-34.

Haas CA, Frotscher M. (2010) Reelin deficiency causes granule cell dispersion in epilepsy. *Exp Brain Res.* 200:141-9.

Harvey L, Boksa P. (2012) A stereological comparison of GAD67 and reelin expression in the hippocampal stratum oriens of offspring from two mouse models of maternal inflammation during pregnancy. *Neuropharmacology*. 62:1767-76.

Hawthorne AL (2014) Repurposing Reelin: the new role of radial glia, Reelin and Notch in motor neuron migration. *Exp Neurol*. 256:17-20.

Hermiston ML, Wong MH y Gordon JI. (1996) Forced expression of E-cadherin in the mouse intestinal epithelium slows cell migration and provides evidence for nonautonomous regulation of cell fate in a self-renewing system. *Genes Dev*. 10: 985-996.

Hirotsune S, Takahara T, Sasaki N, Hirose K, Yoshiki A, Ohashi T, Kusakabe M, Murakami Y, Muramatsu M y Watanabe S. (1995). The reeler gene encodes a protein with an EGF-like motif expressed by pioneer neurons. *Nat Genet*. 10: 77-83.

Honda T, Kobayashi K, Mikoshiba K, Nakajima K. (2011) Regulation of cortical neuron migration by the Reelin signaling pathway. *Neurochem Res*. 36:1270-9.

Howell BW, Gertler FB, Cooper JA. (1997) Mouse disabled (mDab1): a Src binding protein implicated in neuronal development. *EMBO J*. 16:121-32.

Hsieh CJ, Klump B, Holzmann K, Borchard F, Gregor M, Porschen R (1998) Hypermethylation of the p16INK4a promoter in colectomy specimens of patients with long-standing and extensive ulcerative colitis. *Cancer Res*. 58:3942-5.

Hsueh YP, Wang TF, Yang FC, Sheng M. (2000) Nuclear translocation and transcription regulation by the membrane-associated guanylate kinase CASK/LIN-2 *Nature*. 404:298-302.

Hu B, Gharaee-Kermani M, Wu Z, Phan SH (2010) Epigenetic regulation of myofibroblast differentiation by DNA methylation. *Am J Pathol*. 177:21-8.

Huch M, Clevers H. Sox9 marks adult organ progenitors. (2011). *Nat Genet*. 1:9-10.

Hulit J, Wang C, Li Z, Albanese C, Rao M, Di Vizio D, Shah S, Byers SW, Mahmood R, Augenlicht LH, Russell R, Pestell RG. (2004) Cyclin D1 genetic heterozygosity regulates colonic epithelial cell differentiation and tumor number in ApcMin mice. *Mol Cell Biol*. 24:7598-611.

Hussain MM, Strickland DK y Bakillah A. (1999) The mammalian low-density lipoprotein receptor family. *Annu Rev Nutr*. 19: 141-172.

Ikeda Y, Terashima T. (1997) Expression of reelin, the gene responsible for the reeler mutation, in embryonic development and adulthood in the mouse. *Dev Dyn.* 210:157-72.

Inano K, Suetake I, Ueda T, Miyake Y, Nakamura M, Okada M, Tajima S. (2000) Maintenance-type DNA methyltransferase is highly expressed in post-mitotic neurons and localized in the cytoplasmic compartment. *J Biochem.* 128:315-21.

Islam MS, Kusakabe M, Horiguchi K, Iino S, Nakamura T, Iwanaga K, Hashimoto H, Matsumoto S, Murata T, Hori M, Ozaki H. (2014) PDGF and TGF- β promote tenascin-C expression in subepithelial myofibroblasts and contribute to intestinal mucosal protection in mice. *Br J Pharmacol.* 171:375-88.

Jarvi O, Keyrilainen O. (1956) On the cellular structures of the epithelial invasions in the glandular stomach of mice caused by intramural application of 20-methylcholantren. *Acta Pathol Microbiol Scand Suppl.* 39:72-3.

Jeon MK, Klaus C, Kaemmerer E, Gassler N. (2013) Intestinal barrier: Molecular pathways and modifiers. *World J Gastrointest Pathophysiol.* 4:94-9.

Jobson TM, Billington CK, Hall IP. (1998) Regulation of proliferation of human colonic subepithelial myofibroblasts by mediators important in intestinal inflammation. *J Clin Invest.* 101:2650-7.

Johansson ME, Hansson GC. (2013) Mucus and the goblet cell. *Dig Dis.* 31:305-9.

Johansson ME. (2014) Mucus layers in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 20:2124-31.

Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, Lee JC, Schumm LP, Sharma Y, Anderson CA, Essers J, Mitrovic M, Ning K, Cleynen I, Theatre E, Spain SL y cols. (2012) Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature.* 491: 119-24.

Keilani S, Healey D, Sugaya K (2012) Reelin regulates differentiation of neural stem cells by activation of notch signaling through Disabled-1 tyrosine phosphorylation. *Can J Physiol Pharmacol.* 90:361-9.

Khialeeva E, Lane TF, Carpenter EM. (2011) Disruption of reelin signaling alters mammary gland morphogenesis. *Development.* 138:767-76.

Kim HM, Qu T, Kriho V, Lacor P, Smalheiser N, Pappas GD, Guidotti A, Costa E, Sugaya K. (2002) Reelin function in neural stem cell biology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:4020-5.

Knuesel I. (2010) Reelin-mediated signaling in neuropsychiatric and neurodegenerative diseases. *Prog Neurobiol.* 91:257-74.

Kobold D, Grundmann A, Piscaglia F, Eisenbach C, Neubauer K, Steffgen J, Ramadori G, Knittel T.(2002) Expression of reelin in hepatic stellate cells and during hepatic tissue repair: a novel marker for the differentiation of HSC from other liver myofibroblasts. *J Hepatol.* 36:607-13.

Koch S, Nusrat A. (2012) The life and death of epithelia during inflammation: lessons learned from the gut. *Annu Rev Pathol.* 7:35-60.

Krausova M, Korinek V. (2014) Wnt signaling in adult intestinal stem cells and cancer. *Cell Signal.* 26:570-9.

Kundakovic M, Chen Y, Costa E, Grayson DR. (2006) DNA methyltransferase inhibitors coordinately induce expression of the human reelin and glutamic acid decarboxylase 67 genes. *Mol Pharmacol.* 71:644-53.

Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.

Laukoetter MG, Nava P, Nusrat A. (2008) Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 14:401-7.

Lee SH. (2015) Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases. *Intest Res.* 13:11-8.

Leeb SN, Vogl D, Falk W, Schölmerich J, Rogler G, Gelbmann CM. (2002) Regulation of migration of human colonic myofibroblasts. *Growth Factors.* 20: 81-91.

Levenson JM, Qiu S, Weeber EJ. (2008) The role of reelin in adult synaptic function and the genetic and epigenetic regulation of the reelin gene. *Biochim Biophys Acta.* 1779:422-31.

Li Y, Deuring J, Peppelenbosch MP, Kuipers EJ, de Haar C, van der Woude CJ. (2012) IL-6-induced DNMT1 activity mediates SOCS3 promoter hypermethylation in ulcerative colitis-related colorectal cancer. *Carcinogenesis.* 33:1889-96.

Livak KJ, Schmittgen TD. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 25:402-8.

Lombardero M, Kovacs K, Horvath E y Salazar I. (2007) Hormonal and morphological study of the pituitaries in reeler mice. *Int J Exp Pathol.* 88: 165-73.

Long H, Bock HH, Lei T, Chai X, Yuan J, Herz J, Frotscher M, Yang Z. (2011) Identification of alternatively spliced Dab1 and Fyn isoforms in pig. *BMC Neurosci.* 12: 17.

Lorentz O, Duluc I, Arcangelis AD, Simon-Assmann P, Kedinger M, Freund JN. (1997) Key role of the Cdx2 homeobox gene in extracellular matrix-mediated intestinal cell differentiation. *J Cell Biol.* 139:1553-65.

Lorenzetto E, Panteri R, Marino R, Keller F, Buffelli M. (2008) Impaired nerve regeneration in reeler mice after peripheral nerve injury. *Eur J Neurosci.* 27:12-9.

Magnani A, Pattacini L, Boiardi L, Casali B, Salvarani C. (2010) Reelin levels are increased in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 28:546-8.

Mahida YR, Beltinger J, Makh S, Göke M, Gray T, Podolsky DK, Hawkey CJ. (1997) Adult human colonic subepithelial myofibroblasts express extracellular matrix proteins and cyclooxygenase-1 and -2. *Am J Physiol.* 273: G1341-8.

Mähler M, Bristol IJ, Leiter EH, Workman AE, Birkenmeier EH, Elson CO, Sundberg JP. (1998) Differential susceptibility of inbred mouse strains to dextran sulfate sodium-induced colitis. *Am J Physiol.* 274:G544-51.

Mallo GV, Soubeyran P, Lissitzky JC, André F, Farnarier C, Marvaldi J, Dagorn JC, Iovanna JL. (1998) Expression of the Cdx1 and Cdx2 homeotic genes leads to reduced malignancy in colon cancer-derived cells. *J Biol Chem.* 273:14030-6.

Massalini S, Pellegatta S, Pisati F, Finocchiaro G, Farace MG y Ciafrè SA. (2009) Reelin affects chain-migration and differentiation of neural precursor cells. *Mol Cell Neurosci.* 42: 341-349.

Matrisciano F, Tueting P, Dalal I, Kadriu B, Grayson DR, Davis JM, Nicoletti F, Guidotti A. (2013) Epigenetic modifications of GABAergic interneurons are associated with the schizophrenia-like phenotype induced by prenatal stress in mice. *Neuropharmacology.* 68: 184-94.

Maurin JC, Couble ML, Didier-Bazes M, Brisson C, Magloire H, Bleicher F. (2004) Expression and localization of reelin in human odontoblasts. *Matrix Biol.* 23: 277-85.

May CL, Kaestner KH. (2010) Gut endocrine cell development. *Mol Cell Endocrinol.* 323:70-5.

McAvoy S, Zhu Y, Perez DS, James CD, Smith DI. (2008) Disabled-1 is a large common fragile site gene, inactivated in multiple cancers. *Genes Chromosomes Cancer.* 47:165-74.

Mifflin RC, Pinchuk IV, Saada JI, Powell DW. (2011) Intestinal myofibroblasts: targets for stem cell therapy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 300: 684-96.

Miller H, Zhang J, KuoLee R, Patel GB, Chen W. (2007) Intestinal M cells: The fallible sentinels? *World J Gastroenterol.* 13: 1477-1486.

Mitchell CP, Chen Y, Kundakovic M, Costa E, Grayson DR. (2005). Histone deacetylase inhibitors decrease reelin promoter methylation in vitro. *J Neurochem.* 93:483-92.

Murakami S, Lefebvre V, de Crombrughe B. (2000) Potent inhibition of the master chondrogenic factor Sox9 gene by interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem.* 275:3687-92.

Noah TK, Donahue B, Shroyer NF. (2011) Intestinal development and differentiation. *Exp Cell Res.* 317:2702-10.

Noah TK, Shroyer NF. (2013) Notch in the intestine: regulation of homeostasis and pathogenesis. *Annu Rev Physiol.* 75: 263-88.

Noh JS, Sharma RP, Veldic M, Salvacion AA, Jia X, Chen Y, Costa E, Guidotti A, Grayson DR. (2005) DNA methyltransferase 1 regulates reelin mRNA expression in mouse primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:1749-54.

Ohkubo N, Vitek MP, Morishima A, Suzuki Y, Miki T, Maeda N, Mitsuda N. (2007) Reelin signals survival through Src-family kinases that inactivate BAD activity. *J Neurochem.* 103:820-30.

Okamura Y, Nomoto S, Kanda M, Hayashi M, Nishikawa Y, Fujii T, Sugimoto H, Takeda S, Nakao A. (2011) Reduced expression of reelin (RELN) gene is associated with high recurrence rate of hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 18:572-9.

Okuno T, Andoh A, Bamba S, Araki Y, Fujiyama Y, Fujiyama M, Bamba T. (2002) Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha induce chemokine and matrix metalloproteinase gene expression in human colonic subepithelial myofibroblasts. *Scand J Gastroenterol.* 37:317-24.

Ose T, Kadowaki Y, Fukuhara H, Kazumori H, Ishihara S, Udagawa J, Otani H, Takasawa S, Okamoto H y Kinoshita Y. (2007) Reg I-knockout mice reveal its role in regulation of cell growth that is required in generation and maintenance of the villous structure of small intestine. *Oncogene.* 26: 349-359.

Pan X, Chen Z, Huang R, Yao Y, Ma G. (2013) Transforming growth factor β 1 induces the expression of collagen type I by DNA methylation in cardiac fibroblasts *PLoS One.* 8:e60335.

Panteri R, Mey J, Zhelyaznik N, D'Altocolle A, Del Fà A, Gangitano C, Marino R, Lorenzetto E, Buffelli M, Keller F. (2006) Reelin is transiently expressed in the peripheral nerve during development and is upregulated following nerve crush. *Mol Cell Neurosci.*32:133-42.

Pasten C, Cerda J, Jausoro I, Court FA, Cáceres A, Marzolo MP. (2016) Corrigendum to "ApoER2 and reelin are expressed in regenerating peripheral nerve and regulate Schwann cell migration by activating the Rac1 GEF protein, Tiam1"[*Mol Cell Neurosci* 69C (2015) 1-11]. *Mol Cell Neurosci.* 72:123.

Patterson K, Molloy L, Qu W, Clark S. (2011) DNA methylation: bisulphite modification and analysis. *J Vis Exp.* pii: e3170.

Perrone G, Vincenzi B, Zagami M, Santini D, Panteri R, Flammia G, Verzì A, Lepanto D, Morini S, Russo A, Bazan V, Tomasino RM, Morello V, Tonini G, Rabitti C. (2007) Reelin expression in human prostate cancer: a marker of tumor aggressiveness based on correlation with grade. *Mod Pathol.* 20:344-51.

Perse M, Cerar A. (2012) Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. *J Biomed Biotechnol.* 718617.

Pinto D, Clevers H. (2005) Wnt, stem cells and cancer in the intestine. *Biol Cell.* 97:185-96.

Powell DW, Adegboyega PA, Di Mari JF, Mifflin RC. (2005) Epithelial cells and their neighbors I. Role of intestinal myofibroblasts in development, repair, and cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 289:G2-7.

Pulido JS, Sugaya I, Comstock J, Sugaya K. (2007) Reelin expression is upregulated following ocular tissue injury. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 245: 889-93.

Quillard T, Devallière J, Coupel S, Charreau B.(2010) Inflammation dysregulates Notch signaling in endothelial cells: implication of Notch2 and Notch4 to endothelial dysfunction. *Biochem Pharmacol.* 80:2032-41.

Ramalingam S, Daughtridge GW, Johnston MJ, Gracz AD, Magness ST. (2012) Distinct levels of Sox9 expression mark colon epithelial stem cells that form colonoids in culture. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 302:G10-20.

Rebustini IT, Hayashi T, Reynolds AD, Dillard ML, Carpenter EM, Hoffman MP. (2012) miR-200c regulates FGFR-dependent epithelial proliferation via Vldlr during submandibular gland branching morphogenesis. *Development.* 139:191-202.

Reddy SS, Connor TE, Weeber EJ, Rebeck W. (2011) Similarities and differences in structure, expression, and functions of VLDLR and ApoER2. *Mol Neurodegener.* 6: 30.

Rindi G, Leiter AB, Kopin AS, Bordi C, Solcia E. (2004) The "normal" endocrine cell of the gut: changing concepts and new evidences. *Ann N Y Acad Sci.* 1014: 1-12.

Roda G, Dahan S, Mezzanotte L, Caponi A, Roth-Walter F, Pinn D, Mayer L. (2009) Defect in CEACAM family member expression in Crohn's disease IECs is regulated by the transcription factor SOX9. *Inflamm Bowel Dis.* 15:1775-83.

Royaux I, Lambert de Rouvroit C, D'Arcangelo G, Demirov D, Goffinet AM. (1997) Genomic organization of the mouse reelin gene. *Genomics.* 46:240-50.

Rudini N, Dejana E. (2008) Adherens junctions. *Curr Biol.* 18: R1080-2.

Saeed A, Barreto L, Neogii SG, Loos A, McFarlane I, Aslam A. (2012) Identification of novel genes in Hirschsprung disease pathway using whole genome expression study. *J Pediatr Surg.* 47: 303-7.

Said HM. (2011) Intestinal absorption of water-soluble vitamins in health and disease. *Biochem J.* 437: 357-72.

Saito S, Kato J, Hiraoka S, Horii J, Suzuki H, Higashi R, Kaji E, Kondo Y, Yamamoto K. (2011) DNA methylation of colon mucosa in ulcerative colitis patients: correlation with inflammatory status. *Inflamm Bowel Dis.* 17:1955-65.

Samama B, Boehm N. (2005) Reelin immunoreactivity in lymphatics and liver during development and adult life. *Anat Rec. A Discov Mol Cell Evol Biol.* 285: 595-9.

Sato N, Fukushima N, Chang R, Matsubayashi H, Goggins M. (2006) Differential and epigenetic gene expression profiling identifies frequent disruption of the RELN pathway in pancreatic cancers. *Gastroenterology.* 130: 548-65.

Sbarbati A, Osculati F. (2005). A new fate for old cells: brush cells and related elements. *J Anat.* 206: 349-358.

Schmitz S, Hill S, Werling D, Allenspach K. (2013) Expression of trefoil factor genes in the duodenum and colon of dogs with inflammatory bowel disease and healthy dogs. *Vet Immunol Immunopathol.* 151: 168-72.

Schütz B, Jurastow I, Bader S, Ringer C, von Engelhardt J, Chubanov V, Gudermann T, Diener M, Kummer W, Krasteva-Christ G, Weihe E. (2015) Chemical coding and chemosensory properties of cholinergic brush cells in the mouse gastrointestinal and biliary tract. *Front Physiol.* 6: 87.

Sebio A, Kahn M, Lenz HJ. (2014) The potential of targeting Wnt/ β -catenin in colon cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 18: 611-5.

Seigel GM, Hackam AS, Ganguly A, Mandell LM, Gonzalez-Fernandez F. (2007) Human embryonic and neuronal stem cell markers in retinoblastoma. *Mol Vis*. 13: 823-32.

Sellers RS, Morton D. (2014) The colon: from banal to brilliant. *Toxicol Pathol*. 42: 67-81.

Shimizu H, Okamoto R, Ito G, Fujii S, Nakata T, Suzuki K, Murano T, Mizutani T, Tsuchiya K, Nakamura T, Hozumi K, Watanabe M (2014) Distinct expression patterns of Notch ligands, Dll1 and Dll4, in normal and inflamed mice intestine. *PeerJ*. 1;2:e370.

Shin K, Fogg VC, Margolis B. (2006) Tight junctions and cell polarity. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 22: 207-35.

Simmons JG, Pucilowska JB, Keku TO, Lund PK. (2002) IGF-I and TGF-beta1 have distinct effects on phenotype and proliferation of intestinal fibroblasts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 283:G809-18.

Sitcheran R, Cogswell PC, Baldwin AS Jr. (2003) NF-kappaB mediates inhibition of mesenchymal cell differentiation through a posttranscriptional gene silencing mechanism. *Genes Dev*. 17:2368-73.

Smalheiser NR, Costa E, Guidotti A, Impagnatiello F, Auta J, Lacor P, Kriho V, Pappas GD. (2000) Expression of reelin in adult mammalian blood, liver, pituitary pars intermedia, and adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97: 1281-6.

Solomon L, Mansor S, Mallon P, Donnelly E, Hoper M, Loughrey M, Kirk S, Gardiner K (2010) The dextran sulphate sodium (DSS) model of colitis: an overview. *Comparative Clinical Pathology*. 19: 235-239.

Sowden J, Leigh S, Talbot I, Delhanty J, Edwards Y. (1993) Expression from the proximal promoter of the carbonic anhydrase 1 gene as a marker for differentiation in colon epithelia. *Differentiation*. 53:67-74.

Stein T, Cosimo E, Yu X, Smith PR, Simon R, Cottrell L, Pringle MA, Bell AK, Lattanzio L, Sauter G, Lo Nigro C, Crook T, Machesky LM, Gusterson BA. (2010) Loss of reelin expression in breast cancer is epigenetically controlled and associated with poor prognosis. *Am J Pathol*. 177: 2323-33.

Suh E, Chen L, Taylor J, Traber PG. (1994) A homeodomain protein related to caudal regulates intestine-specific gene transcription. *Mol Cell Biol*. 14:7340-51.

Suh E, Traber PG. (1996) An intestine-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation. *Mol Cell Biol.* 16:619-25.

Sumigray KD, Lechler T. (2012) Desmoplakin controls microvilli length but not cell adhesion or keratin organization in the intestinal epithelium. *Mol Biol Cell.* 23:792-9.

Suzuki K, Ota H, Sasagawa S, Sakatani T, Fujikura T. (1983) Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal Biochem.* 132: 345-52.

Suzuki K, Sun X, Nagata M, Kawase T, Yamaguchi H, Sukumaran V, Kawauchi Y, Kawachi H, Nishino T, Watanabe K, Yoneyama H, Asakura H. (2011) Analysis of intestinal fibrosis in chronic colitis in mice induced by dextran sulfate sodium. *Pathol Int.* 61 (4):228-38.

Takahashi S, Kawarabayasi Y, Nakai T, Sakai J y Yamamoto T. (1992) Rabbit very low density lipoprotein receptor: a low density lipoprotein receptor-like protein with distinct ligand specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89: 9252-9256.

Tamura Y, Kunugi H, Ohashi J, Hohjoh H. (2007) Epigenetic aberration of the human REELIN gene in psychiatric disorders. *Mol Psychiatry.* 12:519, 593-600.

Van der Flier LG, Clevers H. (2009). Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol.* 71: 241-60.

Van der Sluis M, De Koning BA, De Bruijn AC, Velcich A, Meijerink JP, Van Goudoever JB, Büller HA, Dekker J, Van Seuningen I, Renes IB, Einerhand AW. (2006) Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology.* 131:117-29.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A y Speleman F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3: RESEARCH0034.

Vázquez-Carretero MD, García-Miranda P, Calonge ML, Peral MJ, Ilundain AA. (2014) Dab1 and reelin participate in a common signal pathway that controls intestinal crypt/villus unit dynamics. *Biol Cell.* 106:83-96.

Veldic M, Caruncho HJ, Liu WS, Davis J, Satta R, Grayson DR, Guidotti A, Costa E. (2004) DNA-methyltransferase 1 mRNA is selectively overexpressed in telencephalic GABAergic interneurons of schizophrenia brains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:348-53.

Wang Q, Lu J, Yang C, Wang X, Cheng L, Hu G, Sun Y, Zhang X, Wu M, Liu Z. (2002) CASK and its target gene Reelin were co-upregulated in human esophageal carcinoma. *Cancer Lett.* 179: 71-7.

Ware ML, Fox JW, González JL, Davis NM, Lambert de Rouvroit C, Russo CJ, Chua SC Jr, Goffinet AM, Walsh CA. (1997) Aberrant splicing of a mouse disabled homolog, *mdab1*, in the scrambler mouse. *Neuron.* 19:239-49.

West AB, Isaac CA, Carboni JM, Morrow JS, Mooseker MS y Barwick KW. (1988) Localization of villin, a cytoskeletal protein specific to microvilli, in human ileum and colon and in colonic neoplasms. *Gastroenterology.* 94: 343-352.

Won SJ, Kim SH, Xie L, Wang Y, Mao XO, Jin K, Greenberg DA. (2006) Reelin-deficient mice show impaired neurogenesis and increased stroke size. *Exp Neurol.* 198: 250-9.

Wong NA, Mayer NJ, Anderson CE, McKenzie HC, Morris RG, Diebold J, Mayr D, Brock IW, Royds JA, Gilmour HM, Harrison DJ. (2003) Cyclin D1 and p21 in ulcerative colitis-related inflammation and epithelial neoplasia: a study of aberrant expression and underlying mechanisms. *Hum Pathol.* 34:580-8.

Xiong HL, Guo ZY, Li SX, Li N, Liu SH, Ji YH. (2013) In vivo detection of Hirschsprung's disease by optical coherence tomography in rats. *Phys Med Biol.* 58:1549-61.

Yamamoto H, Bai YQ, Yuasa Y. (2003) Homeodomain protein CDX2 regulates goblet-specific MUC2 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 300:813-8.

Yan Y, Dalmaso G, Nguyen HT, Obertone TS, Charrier-Hisamuddin L, Sitaraman SV, Merlin D. (2008) Nuclear factor- κ B is a critical mediator of Ste20-like proline-/alanine-rich kinase regulation in intestinal inflammation. *Am J Pathol.* 173:1013-28.

Yan Y, Kolachala V, Dalmaso G, Nguyen H, Laroui H, Sitaraman SV, Merlin D. (2009) Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis. *PLoS One.* 29; 4:e6073.

Yang Y, Yang JJ, Tao H, Jin WS. (2014) New perspectives on β -catenin control of cell fate and proliferation in colon cancer. *Food Chem Toxicol.* 74: 14-9.

Yuan Y, Chen H, Ma G, Cao X, Liu Z. (2012) Reelin is involved in transforming growth factor- β 1-induced cell migration in esophageal carcinoma cells. *PLoS One.* 7: e31802.

Zhang AH, Rao JN, Zou T, Liu L, Marasa BS, Xiao L, Chen J, Turner DJ, Wang JY. (2007) p53-dependent NDRG1 expression induces inhibition of intestinal epithelial cell

proliferation but not apoptosis after polyamine depletion. *Am J Physiol Cell Physiol.* 293:C379-89.

Zheng X, Tsuchiya K, Okamoto R, Iwasaki M, Kano Y, Sakamoto N, Nakamura T, Watanabe M. (2011) Suppression of *hath1* gene expression directly regulated by *hes1* via notch signaling is associated with goblet cell depletion in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 17:2251-60.