



Estudio del efecto de butirato de sodio en la expresión de proteínas de las uniones ocluyentes de células epiteliales intestinales y en la diferenciación de monocitos mediante técnicas de biología molecular cuantitativa

Benavides Almeida, Mayra Abigail

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Dr. Grijalva Silva, Rodrigo Marcelo M.D., Ph. D.

29 de septiembre del 2020

Document Information

Analyzed document Proyecto de Titulación Benavides Abigail.docx (D79586407)
Submitted 9/21/2020 7:39:00 PM
Submitted by
Submitter email rmgrjalva@espe.edu.ec
Similarity 7%
Analysis address rmgrjalva.espe@analysis.orkund.com

Sources included in the report

| | | | |
|-----------|---|---|----|
| SA | Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE / PROYECTO DE INVESTIGACIÓN NAYARA GÓMEZ.docx Document PROYECTO DE INVESTIGACIÓN NAYARA GÓMEZ.docx (D36574312) Submitted by: nmgomez@espe.edu.ec Receiver: rmgrjalva.espe@analysis.orkund.com |  | 59 |
| SA | PROYECTO ABIGAIL BENAVIDES.docx Document PROYECTO ABIGAIL BENAVIDES.docx (D55216462) |  | 2 |
| SA | Proyecto de Titulación_Álvarez Meythaler José Gabriel.docx Document Proyecto de Titulación_Álvarez Meythaler José Gabriel.docx (D21858130) |  | 6 |
| W | URL: https://docplayer.es/87345610-Departamento-de-ciencias-de-la-vida-y-de-la-agricult ... Fetched: 8/5/2020 8:13:03 PM |  | 1 |
| SA | TESIS FINAL Judith Valle (Rev WRC 01_10_2019).pdf Document TESIS FINAL Judith Valle (Rev WRC 01_10_2019).pdf (D59195106) |  | 1 |
| W | URL: https://ghr.nlm.nih.gov/gene/HPRT1#normalfunctionOlszewski, Fetched: 9/21/2020 7:40:00 PM |  | 1 |
| SA | Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE / Tesis marcadores respaldo.pdf Document Tesis marcadores respaldo.pdf (D35753228) Submitted by: rseqqat@espe.edu.ec Receiver: rseqqat.espe@analysis.orkund.com |  | 1 |
| SA | Tesis David Cabrera Cambios 17 05 2017.docx Document Tesis David Cabrera Cambios 17 05 2017.docx (D28339156) |  | 1 |
| W | URL: https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/3245/1/Tesis%20Ca ... Fetched: 8/15/2020 7:03:58 AM |  | 1 |
| SA | VILA_BORREGO_KI10210_20190708_2142_c007.pdf Document VILA_BORREGO_KI10210_20190708_2142_c007.pdf (D54381057) |  | 1 |





DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, **“Estudio del efecto de butirato de sodio en la expresión de proteínas de las uniones ocluyentes de células epiteliales intestinales y en la diferenciación de monocitos mediante técnicas de biología molecular cuantitativa”** fue realizado por la señorita **Benavides Almeida, Mayra Abigail**, el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 29 de septiembre de 2020

Dr. Grijalva Silva, Rodrigo Marcelo M.D., Ph. D.

1706590641



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Benavides Almeida, Mayra Abigail**, con cédula de ciudadanía n° 1722243340, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **Estudio del efecto de butirato de sodio en la expresión de proteínas de las uniones ocluyentes de células epiteliales intestinales y en la diferenciación de monocitos mediante técnicas de biología molecular cuantitativa** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 29 de septiembre de 2020

Benavides Almeida, Mayra Abigail

C.C. 1722243340



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo, **Benavides Almeida, Mayra Abigail**, con cédula de ciudadanía n° 1722243340, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Estudio del efecto de butirato de sodio en la expresión de proteínas de las uniones ocluyentes de células epiteliales intestinales y en la diferenciación de monocitos mediante técnicas de biología molecular cuantitativa”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 29 de septiembre de 2020

Benavides Almeida, Mayra Abigail

C.C. 1722243340

Dedicatoria

A mis padres Patricio y Cecilia por ser un soporte importante, por el amor y consejos brindados.

A mis hermanos Patricio y Sophia por su cariño y apoyo constante.

A Sebastián, por su confianza y amor.

Abigail Benavides

Agradecimientos

A Dios por su compañía en mi camino, sus bendiciones derramadas y por haberme dado la inteligencia y la paciencia para culminar esta etapa.

A mis padres que me han dado todo y me han apoyado incondicionalmente, son mi modelo a seguir.

A mi hermano Patricio, a Sarita y a Ignacio por brindarme tantas alegrías.

A mi hermana Sophi por todo el cariño, el consuelo y el abrazo que me ha sabido dar en los momentos que más he necesitado.

A Sebastián Chile, por su amor y la seguridad que me brinda, por ser el mejor compañero en este viaje, por ser además mi amigo, colega y confidente, por hacerme ver las cosas desde otra perspectiva y ayudarme a seguir adelante, gracias por todo.

A mis amigos, en particular a Cristian y Alejandro por todos los momentos y alegrías compartidas desde el inicio y a lo largo de este camino.

Al Dr. Marcelo Grijalva por darme su voto de confianza, por haberme permitido trabajar en su laboratorio y participar en tan interesante proyecto. Gracias por contagiarme su actitud siempre positiva, pero sobre todo por la guía y por las tantas enseñanzas compartidas.

A la Dra. Patricia Jiménez por su colaboración a lo largo de este proyecto.

A la Ing. Lizeth Salazar por todo lo que me ha enseñado, por el tiempo y ayuda que me ha brindado, por su paciencia y por atender a cualquiera de mis inquietudes, siempre con una sonrisa, gracias infinitas.

A quienes conforman el laboratorio de Biotecnología Humana por su ayuda, alegrías y vivencias compartidas.

Al equipo del CENBIO y un agradecimiento especial a la Ing. Erika Muñoz, su trabajo y colaboración hicieron posible que este proyecto se llevara a cabo.

Abigail Benavides

Índice de contenidos

| | |
|---|----|
| Certificación | 3 |
| Responsabilidad de autoría | 4 |
| Autorización de publicación | 5 |
| Dedicatoria | 6 |
| Agradecimientos | 7 |
| Índice de contenidos | 9 |
| Índice de tablas | 13 |
| Índice de figuras | 15 |
| Abreviaturas utilizadas | 17 |
| Resumen | 18 |
| Abstract | 19 |
| Capítulo 1: Introducción | 20 |
| Formulación del problema y antecedentes | 20 |
| Justificación del Problema | 23 |
| Objetivos del proyecto | 25 |
| Objetivo General | 25 |
| Objetivos específicos | 25 |
| Marco teórico | 25 |
| Microbiota intestinal | 25 |
| Barrera intestinal y permeabilidad intestinal | 26 |
| Células epiteliales intestinales | 27 |
| Microvilli | 27 |
| Enfermedades relacionadas a la disbiosis | 28 |
| Enfermedad intestinal inflamatoria | 28 |
| Enfermedades crónicas no transmisibles | 29 |
| Uniones ocluyentes o estrechas | 29 |
| Proteínas de las unión ocluyente | 30 |
| Receptor de inmunoglobulina polimérico | 30 |
| Lipopolisacárido | 31 |
| Diferenciación de monocitos- macrófagos | 32 |
| Ácidos grasos de cadena corta | 34 |
| Butirato | 34 |

| | |
|--|----|
| Sistema de cultivo celular dual..... | 35 |
| Línea celular Cáncer coli-2 (Caco-2) | 36 |
| Línea celular THP-1..... | 36 |
| PCR en tiempo real | 37 |
| Clasificación química o reporteros | 38 |
| Cuantificación relativa | 38 |
| Genes de referencia | 38 |
| Gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) | 39 |
| Gen hipoxantina fosforribosiltransferasa 1 (HPRT1)..... | 39 |
| Hipótesis..... | 40 |
| Capítulo 2: Materiales Y Métodos | 41 |
| Modelo de cultivo celular dual..... | 41 |
| Extracción de ARN..... | 42 |
| Extracción y purificación de ARN de células caco-2 | 42 |
| Extracción y purificación de ARN de células THP-1..... | 43 |
| Cuantificación del ARN extraído | 44 |
| Evaluación de la integridad del ARN | 44 |
| Secuencias de primers para los genes de interés | 45 |
| Estandarización de los sistemas de RT-PCR convencional | 45 |
| Estandarización los sistemas de PCR en tiempo real | 47 |
| Estandarización de RT-qPCR en la línea celular caco-2 | 47 |
| Estandarización de qPCR en la línea celular THP-1 | 49 |
| Estabilidad de genes de referencia | 52 |
| Sensibilidad analítica y eficiencia de amplificación | 52 |
| Sensibilidad analítica de sistemas en la línea celular caco-2 | 52 |
| Sensibilidad analítica de sistemas en la línea celular THP-1..... | 53 |
| Eficiencia de amplificación | 54 |
| Cultivo de células caco-2 y exposición a los tratamientos | 54 |
| Extracción, purificación, cuantificación y evaluación de la integridad del ARN extraído de células caco-2 expuestas a los tratamientos..... | 54 |
| Evaluación de los niveles de expresión de ICAM3, PPM1A, RUNX3 y TNF en células THP-1 expuestas a butirato y a lipopolisacárido..... | 55 |
| Cultivo de células THP-1 y exposición a los tratamientos..... | 55 |

| | |
|--|-----|
| Extracción, purificación, cuantificación y evaluación de la integridad del ARN extraído de células THP-1 expuestas a los tratamientos | 55 |
| Ensayos de qPCR con SYBR® Green | 56 |
| Análisis estadístico y expresión génica de ICAM3, PPM1A, RUNX3 y TNF | 57 |
| Capítulo 3: Resultados | 59 |
| Sistema de cultivo celular dual | 59 |
| Extracción de ARN..... | 59 |
| Características de los primers utilizados | 61 |
| Estandarización de los sistemas de RT-PCR convencional | 62 |
| Estandarización de sistemas de RT-PCR punto final en células caco-2 | 62 |
| Estandarización de sistemas de RT-PCR punto final en células THP-1 | 63 |
| Estandarización de PCR en tiempo real con SYBR® Green..... | 64 |
| Estandarización de sistemas de RT-qPCR en la línea celular caco-2..... | 65 |
| Estandarización de sistemas de RT-qPCR en la línea celular THP-1 | 67 |
| Estabilidad de genes de referencia | 69 |
| Sensibilidad analítica y eficiencia de amplificación | 70 |
| Sensibilidad analítica y eficiencia de amplificación de sistemas en la línea celular caco-2 | 70 |
| Sensibilidad analítica y eficiencia de amplificación de sistemas en la línea celular THP-1..... | 73 |
| Extracción de ARN de células caco-2 expuestas a butirato y a lipopolisacárido | 79 |
| Evaluación de los niveles de expresión de ICAM3, PPM1A, RUNX3 y TNF en células THP-1 expuestas a butirato y a lipopolisacárido..... | 81 |
| Ensayos de qPCR con SYBR® Green | 83 |
| Análisis estadístico y expresión génica | 88 |
| Capítulo 4: Discusión..... | 99 |
| Extracción de ARN..... | 99 |
| Síntesis de cDNA | 101 |
| Características de los primers utilizados | 101 |
| Estandarización de sistemas de RT-PCR punto final | 102 |
| Estandarización de sistemas de qPCR con SYBR® Green | 103 |
| Ensayos de estabilidad de genes de referencia..... | 106 |
| Expresión de ICAM3, PPM1A, RUNX3 y TNF en células THP-1 expuestas a butirato y a lipopolisacárido | 107 |

| | |
|--|-----|
| Expresión de las proteínas de las uniones ocluyentes | 114 |
| Capítulo 5: Conclusiones..... | 116 |
| Capítulo 6: Recomendaciones | 119 |
| Capítulo 7: Bibliografía..... | 120 |
| Anexos | 130 |

Índice de tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1 <i>Master Mix de reacción para los ensayos de RT-PCR convencional</i> | 46 |
| Tabla 2 <i>Programación del termociclador para los ensayos de RT-PCR</i> | 47 |
| Tabla 3 <i>Master Mix de reacción para los ensayos de RT-qPCR con Power SYBR Green RNA-to-CT™ 1-Step Kit</i> | 48 |
| Tabla 4 <i>Programación del QuantStudio™ 3 para los ensayos RT-qPCR</i> | 49 |
| Tabla 5 <i>Master Mix de reacción para la síntesis de ADNc</i> | 50 |
| Tabla 6 <i>Programación del termociclador para la síntesis de ADNc</i> | 50 |
| Tabla 7 <i>Master Mix de reacción para los ensayos de qPCR con PowerUp™ SYBR Green</i> | 51 |
| Tabla 8 <i>Programación del LightCycler® 96 Instrument para los ensayos qPCR</i> | 51 |
| Tabla 9 <i>Cuantificación de ARN extraído a partir de células caco-2 y THP-1</i> | 60 |
| Tabla 10 <i>Características de los primers utilizados</i> | 61 |
| Tabla 11 <i>Valores Ct y Tm para los sistemas ZO1, OCLN, PIGR, TNF y GAPDH</i> | 65 |
| Tabla 12 <i>Valores Ct y Tm para los sistemas ICAM3, PPM1A, RUNX3, TNF y HPRT1</i> . | 67 |
| Tabla 13 <i>Valores de Ct de los genes de referencia candidatos en la línea celular caco-2</i> | 69 |
| Tabla 14 <i>Valores de Ct de los genes de referencia candidatos en la línea celular THP-1</i> | 69 |
| Tabla 15 <i>Resultados de NormFinder de los ensayos realizados en células caco-2</i> | 70 |
| Tabla 16 <i>Resultados de NormFinder de los ensayos realizados en células THP-1</i> | 70 |
| Tabla 17 <i>Valores de Ct para el gen GAPDH</i> | 71 |
| Tabla 18 <i>EA y PEA para GAPDH</i> | 72 |
| Tabla 19 <i>Valores de Ct para el gen ICAM3 y PPM1A</i> | 73 |
| Tabla 20 <i>Valores de Ct para el gen RUNX3 y TNF</i> | 75 |

| | | |
|----------|--|----|
| Tabla 21 | <i>Valores de Ct para el gen HPRT1</i> | 77 |
| Tabla 22 | <i>EA y PEA para los sistemas ICAM3, PPM1A, RUNX3, TNF y HPRT1</i> | 78 |
| Tabla 23 | <i>Cuantificación de ARN extraído de células caco-2</i> | 79 |
| Tabla 24 | <i>Cuantificación de ARN extraído de células THP-1</i> | 81 |
| Tabla 25 | <i>Valores de Ct de los ensayos de qPCR de sistemas evaluados en células THP-1</i> | 83 |
| Tabla 26 | <i>Estadística descriptivos de los valores de Ct obtenidos para cada sistema</i> | 88 |
| Tabla 27 | <i>Radio de expresión para los diferentes tratamientos</i> | 91 |
| Tabla 28 | <i>ANOVA no paramétrico entre días de aplicación de tratamientos</i> | 94 |
| Tabla 29 | <i>ANOVA no paramétrico entre tratamientos para cada día</i> | 95 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1 <i>Esquema de sistema de cultivo dual</i> | 36 |
| Figura 2 <i>Distribución de los tratamientos para las células en el cultivo dual</i> | 42 |
| Figura 3 <i>Diluciones seriadas de ácido nucleico para los ensayos de sensibilidad analítica</i> | 53 |
| Figura 4 <i>Diseño de placa de los ensayos de qPCR con ADNc de células THP-1 cultivadas en el sistema dual en presencia y ausencia de butirato</i> | 56 |
| Figura 5 <i>Monocapa formada por células caco-2 visualizadas bajo el microscopio invertido (4X)</i> | 59 |
| Figura 6 <i>Células THP-1 cultivadas en la parte inferior del sistema dual visualizadas bajo el microscopio invertido (4x)</i> | 60 |
| Figura 7 <i>Evaluación cualitativa de ARN</i> | 61 |
| Figura 8 <i>Productos de RT-PCR convencional de los sistemas evaluados en células caco-2</i> | 63 |
| Figura 9 <i>Productos de RT-PCR convencional de los sistemas evaluados en células THP-1</i> | 64 |
| Figura 10 <i>Curvas de amplificación (izquierda) y de disociación (derecha) de los ensayos de qPCR de los sistemas evaluados en células caco-2</i> | 66 |
| Figura 11 <i>Curvas de amplificación (izquierda) y de disociación (derecha) de los ensayos de qPCR de los sistemas evaluados en células THP-1</i> | 68 |
| Figura 12 <i>Curvas de amplificación (izquierda) y de disociación (derecha) del ensayo de sensibilidad analítica para el gen GAPDH</i> | 71 |
| Figura 13 <i>Curva estándar de la concentración de ARN inicial vs el valor de Ct promedio del gen GAPDH</i> | 72 |
| Figura 14 <i>Ensayo de sensibilidad analítica del sistema ICAM3</i> | 73 |

| | |
|---|----|
| Figura 15 <i>Ensayo de sensibilidad analítica del sistema PPM1A</i> | 75 |
| Figura 16 <i>Ensayo de sensibilidad analítica del sistema RUNX3</i> | 76 |
| Figura 17 <i>Ensayo de sensibilidad analítica del sistema TNF</i> | 77 |
| Figura 18 <i>Ensayo de sensibilidad analítica del sistema HPRT1</i> | 78 |
| Figura 19 <i>Evaluación de la integridad de ARN de células caco-2</i> | 80 |
| Figura 20 <i>Evaluación de la integridad de ARN de células THP-1</i> | 82 |
| Figura 21 <i>Curvas de amplificación (izquierda) y disociación (derecha) de los sistemas evaluados en células THP-1, luego de la exposición a LPS en el día 7</i> | 85 |
| Figura 22 <i>Curvas de amplificación (izquierda) y disociación (derecha) de los sistemas evaluados en células THP-1 luego de la exposición a LPS en el día 14</i> | 86 |
| Figura 23 <i>Curvas de amplificación (izquierda) y disociación (derecha) de los sistemas evaluados en células THP-1 luego de la exposición a LPS en el día 7</i> | 87 |
| Figura 24 <i>Distribución de los valores de Ct obtenidos en los ensayos de qPCR</i> | 90 |
| Figura 25 <i>Radios de expresión en base log₂ de los genes evaluados en células THP-1</i> | 92 |
| Figura 26 <i>Comparaciones de medias entre días (izquierda) y entre tratamientos (derecha)</i> | 98 |

Abreviaturas utilizadas

| | |
|---------------|--|
| μL | microlitros |
| ACTB | Beta actina |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ADNc | Ácido desoxirribonucleico complementario |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ARNip | ARN pequeño de interferencia |
| Caco-2 | Línea celular de adenocarcinoma colorrectal epitelial humano |
| Ct | Threshold cycle |
| GAPDH | Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa |
| HPRT1 | Hipoxantina fosforribosiltransferasa 1 |
| ICAM3 | Molécula de adhesión intercelular 3 |
| IL | Interleuquina |
| LPS | Lipopolisacárido |
| mL | Mililitros |
| OCLN | Ocludina |
| pb | Pares de bases |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PIGR | Receptor de inmunoglobulina polimérico |
| PPM1A | Proteína fosfatasa 1A dependiente de Mg^{2+}/Mn^{2+} |
| qPCR | Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| RT | Retrotranscripción |
| RUNX3 | Factor de transcripción relacionado a Runt 3 |
| THP-1 | Línea celular monocítica humana |
| TNF | Factor de necrosis tumoral |
| ZO1 | Zona occludens-1 |

Resumen

En el presente trabajo se evaluó de manera indirecta el efecto del butirato en la expresión de genes de maduración de monocitos cultivados en un sistema dual que simula el epitelio intestinal. Para ello, se cultivaron células de carcinoma de colon humanas (caco-2) sobre membranas del soporte permeable por encima de células monocíticas humanas (THP-1); el co-cultivo fue tratado con LPS por 24 horas en presencia y ausencia de butirato. Se optimizaron ensayos de qPCR y se cuantificó el nivel de expresión de los genes reguladores de la maduración de monocitos hacia macrófagos ICAM3, RUNX3 y PPM1A, y de la citocina pro-inflamatoria TNF a partir de CDNA de células THP-1. Se encontró una inhibición significativa en la expresión de RUNX3 y TNF frente al aumento de la expresión de ICAM3 y PPM1A a partir del día 14 de cultivo en muestras tratadas con butirato, estos resultados sugieren que el butirato podría favorecer el mantenimiento de la barrera intestinal, estimulando la diferenciación y formación de una monocapa de células caco-2 que impiden el paso del LPS hasta los monocitos, disminuyendo su maduración.

Palabras clave:

- **BUTIRATO**
- **MONOCITOS**
- **GENES DE MADURACIÓN**
- **CITOCINA PROINFLAMATORIA**
- **QPCR**

Abstract

The present study aimed to evaluate the effect of butyrate on the expression of maturation genes of monocytes cultured in a dual system that simulates the intestinal epithelium. To do this, human epithelial colorectal adenocarcinoma cells (caco-2) were cultured on permeable supports above human monocytic cells (THP-1); the co-culture was treated with LPS for 24 hours in the presence and absence of butyrate. QPCR assays were optimized and the expression level of the ICAM3, RUNX3 and PPM1A genes, which are regulators of monocyte maturation towards macrophages, and of the pro-inflammatory cytokine TNF from CDNA of THP-1 cells were quantified. A significant inhibition in the expression of RUNX3 and TNF was found against the increase in the expression of ICAM3 and PPM1A from day 14 of culture in samples treated with butyrate, these results suggest that butyrate could favor the maintenance of the intestinal barrier, stimulating the differentiation and formation of a monolayer of caco-2 cells that prevent the translocation of LPS to monocytes, reducing their maturation.

Keywords:

- **BUTYRATE**
- **MONOCYTES**
- **MATURATION-ASSOCIATED GENE**
- **PRO-INFLAMMATORY CYTOKINE**
- **QPCR**

Capítulo 1: Introducción

Formulación del problema y antecedentes

La población de microbios que residen en el intestino, la microbiota intestinal, comprende decenas de billones de microorganismos incluidas al menos 1000 especies diferentes de bacterias conocidas. La microbiota intestinal cumple funciones fisiológicas con un impacto directo en la salud, pues actúa con las defensas del huésped y el sistema inmunológico para proteger contra la colonización y la invasión de patógenos. Además, desempeña funciones metabólicas esenciales, actuando como una fuente de nutrientes esenciales y vitaminas, y produciendo ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como resultado del catabolismo de los carbohidratos (Ríos-Covián et al., 2016; Tunland, 2018). Entre los principales AGCC se encuentran el acetato, el propionato y el butirato, los cuales proporcionan fuentes de energía para los tejidos del huésped, también ejercen efectos antiinflamatorios y antiapoptóticos que pueden ser importantes para la prevención de enfermedades (Flint, Duncan, Scott, & Louis, 2015).

Los cambios en la composición microbiana están asociados a una mayor propensión a una amplia gama de enfermedades inflamatorias, como la enfermedad alérgica, el asma, la enfermedad inflamatoria del intestino (EII), la obesidad y las enfermedades no transmisibles (ENT). Esto ha despertado el interés de buscar estrategias que modulen favorablemente la microbiota intestinal para reducir el riesgo de dichos trastornos (West et al., 2015). Una de estas estrategias es la ingestión de probióticos, la cual consiste en el consumo de microorganismos vivos que, después de ingresar al intestino, pueden ejercer efectos beneficiosos para la salud del huésped al mejorar su equilibrio microbiano intestinal (Hill et al., 2014). Los más comunes son las

cepas de lactobacilos y bifidobacterias, pero también se han usado ciertas cepas de estreptococos, bacteroides y enterococos (Y. Lee & Salminen, 2008).

Los probióticos eucarióticos como las levaduras han sido menos estudiados. *Saccharomyces boulardii*, se ha identificado como candidato para este nuevo enfoque terapéutico debido a su uso actual en el tratamiento de trastornos gastrointestinales (Hudson et al., 2016). Por ejemplo, diferentes estudios en roedores han demostrado que la administración de *S. boulardii* redujo significativamente la mortalidad a causa de colitis provocada por *Clostridium difficile*, también disminuyó la hipersecreción de sales y líquidos provocada por la inoculación previa con la toxina del cólera, mientras que en el modelo de diarrea inducida por la bacteria *Escherichia coli* produjo un efecto inhibitor importante en la hipersecreción intestinal (Buts, 2005).

Otra táctica es el uso de prebióticos específicos, ellos promueven una colonización intestinal favorable y sus productos fermentados tienen propiedades antiinflamatorias, además es probable que proporcionen una alternativa más efectiva, para una terapia a largo plazo, posiblemente mejor, para prevenir y tratar la disbiosis (Tungland, 2018; West et al., 2015). Se ha demostrado en estudios que, ratones obesos tratados con prebióticos aumentaron selectivamente *Bifidobacterium* y mostraron una disminución en las concentraciones de lipopolisacárido (LPS) y citoquinas inflamatorias en la sangre, lo cual se asoció con mejoras en la función de la barrera intestinal (Richards, Yap, McLeod, Mackay, & Mariño, 2016).

El uso de butirato como prebiótico, ha demostrado resultados favorables para el tratamiento de distintas enfermedades no transmisibles, inflamatorias y autoinmunes. Este compuesto promueve la motilidad del colon, reduce la inflamación, aumenta la irrigación visceral, induce la apoptosis e inhibe la progresión de las células tumorales,

todas estas propiedades son beneficiosas en la prevención del cáncer colorrectal (Richards et al., 2016). El butirato inhibe el crecimiento de células colónicas cancerosas, pero no de colonocitos normales y, dependiendo de la concentración, aumenta la proliferación de este último tipo de células (Ríos-Covián et al., 2016). En pacientes con colitis, el tratamiento experimental con enemas de butirato ha reducido los signos clínicos de inflamación e incluso ha conducido a la remisión en algunos casos (Richards et al., 2016).

Las uniones ocluyentes son estructuras de proteínas que mantienen unidas las células en la pared epitelial del intestino. Crean una barrera de impermeabilidad impidiendo el libre flujo de sustancias entre células y a través de la barrera intestinal, como partículas grandes que no han sido digeridas, por lo que brindan protección contra la inflamación o las reacciones alérgicas y, por lo tanto, mantienen la integridad intestinal (Palital, 2015).

Se ha evaluado el efecto del butirato de sodio sobre la diarrea en relación con la cicatrización de heridas de la barrera intestinal en enterocitos porcinos, a las cuales se les provocó una lesión. El butirato de sodio promovió significativamente el proceso de curación de heridas y mejoró significativamente la expresión de ARNm de la unión ocluyente de la mucosa intestinal. Esto sugiere que el proceso de curación de heridas estimulado por butirato está relacionada con el mantenimiento y la integridad de la barrera intestinal (Ma et al., 2012).

Los prebióticos por sí mismos podrían tener efectos estabilizadores en la barrera intestinal. El butirato desempeña un papel particular para mantener la barrera intestinal, como se muestra en la enfermedad inflamatoria intestinal, en la que el déficit de este metabolito provoca lesiones en la unión ocluyente y perjudica la permeabilidad

intestinal. A su vez, los experimentos en un modelo de rata con colitis inducida mostraron que el tratamiento con butirato conduce a una recuperación en la resistencia transepitelial, que se asoció con el mantenimiento de la integridad de la unión ocluyente y la inhibición de la liberación de TNF. En modelos celulares, el butirato disminuye la translocación bacteriana y modifica la expresión de las proteínas de unión ocluyente claudina-1 y claudina-2 en favor de una preservación de la barrera. Por lo tanto, la deficiencia de butirato puede tomarse como un indicador indirecto de la función de la barrera intestinal alterada (Bischoff et al., 2014).

Justificación del Problema

Los estilos de vida modernos y las dietas poco saludables promueven cambios en la biodiversidad de la microbiota intestinal humana. Las alteraciones en la composición microbiana, conocidas como disbiosis, pueden alterar la permeabilidad intestinal, afectan la inmunidad intestinal y están asociadas a una amplia gama de afecciones patológicas, como la EII, la obesidad y las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT), incluidas las enfermedades cardiovasculares, metabólicas, cáncer y diabetes (Bischoff et al., 2014; OMS, 2018; West et al., 2015).

Esto ha despertado el interés en buscar estrategias que mejoren el equilibrio microbiano intestinal, como los prebióticos, que promueven una colonización intestinal favorable y sus productos fermentados tienen propiedades antiinflamatorias (Tunland, 2018; West et al., 2015) También los microorganismo probióticos ejercen efectos beneficiosos para la salud del huésped, pues están relacionados con la inmunomodulación, la digestión y la eficiencia de utilización de nutrientes, la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y vitaminas esenciales, así como la exclusión competitiva de microorganismos patógenos (Kim et al., 2019).

Los AGCC son metabolitos microbianos producidos en el intestino grueso como productos de fermentación de componentes de alimentos que no se absorben ni se digieren en el intestino delgado. Los principales productos son el acetato, propionato y butirato, los cuales se encuentran en altas concentraciones en el tracto intestinal, desde donde son captados por las células epiteliales intestinales (CEI) como fuente de ATP. Además, estas moléculas actúan como un enlace entre la microbiota y el sistema inmunológico mediante la modulación de diferentes aspectos del desarrollo, la supervivencia y la función de las CEI (Corrêa-Oliveira, Fachi, Vieira, Sato, & Vinolo, 2016; Ríos-Covián et al., 2016).

De los AGCC producidos en el colon, el butirato es utilizado preferentemente por la mucosa intestinal como fuente de energía. Este metabolito es considerado beneficioso para la salud, pues ejerce una acción antiinflamatoria. Se ha demostrado en ratas que, el butirato disminuye la translocación de LPS, lo que conduce a la inhibición de la activación de macrófagos y de la cascada inflamatoria. Además, parece ser el regulador más importante de las proteínas de las uniones ocluyentes y que mejora la función de la barrera intestinal mediante el aumento de la expresión de dichas proteínas (Louis & Flint, 2017; Morrison & Preston, 2016).

Ya que las enfermedades mencionadas están relacionadas con cambios en las poblaciones de microbiota o con la reducción de la diversidad de la microbiota, estas patologías se asocian con una función de barrera intestinal alterada y una mayor permeabilidad del epitelio, así como una mayor acumulación de grasa e inflamación inducida por LPS (Bischoff et al., 2014).

Como se ha mencionado previamente, la aplicación de butirato reduce todos estos efectos, por lo que investigación adicional debe efectuarse en modelos celulares

humanos con los propósitos de: evaluar microorganismos probióticos, determinar si moléculas como el butirato y otros AGCC desempeñan un papel importante en el mantenimiento e integridad de la mucosa intestinal y verificar si el favorecimiento del equilibrio de la microbiota constituye una estrategia para prevenir y tratar las enfermedades inflamatorias y las ECNT.

Objetivos del proyecto

Objetivo General

Evaluar el efecto que ejerce el butirato en la expresión de proteínas de las uniones ocluyentes de células epiteliales intestinales y en la diferenciación de monocitos hacia macrófagos en un modelo *in vitro* de cultivo celular dual.

Objetivos específicos

- Determinar la expresión de genes de proteínas presentes en las uniones ocluyentes de las células epiteliales intestinales (caco-2) tratadas con lipopolisacárido en presencia o ausencia de butirato mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).
- Determinar la expresión de genes relacionados con la diferenciación de monocitos humanos (THP-1) tratados con lipopolisacárido mediante qPCR.

Marco teórico

Microbiota intestinal

El colon está habitado por una densa población de microorganismos, que se denominan colectivamente "microbiota intestinal". Esta tiene un papel principal en varios procesos fisiológicos como la absorción de nutrientes y la regulación metabólica

humana a través de sus interacciones simbióticas con el huésped, lo cual es esencial para el correcto funcionamiento del sistema inmunológico. La flora intestinal está encargada de modular procesos como el desarrollo de células inmunes, la producción de anticuerpos y péptidos antimicrobianos y es capaz de fermentar carbohidratos y proteínas que no han sido absorbidos durante la digestión en el intestino delgado, produciendo una amplia gama de metabolitos, incluidos los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) (Corrêa-Oliveira et al., 2016; Ríos-Covián et al., 2016).

Barrera intestinal y permeabilidad intestinal

La barrera intestinal constituye una gran superficie mucosa encargada del transporte vectorial de iones, nutrientes y otras sustancias. El elemento central es la capa epitelial, que separa físicamente el lumen y el medio interno. El lado extraepitelial está reforzado por péptidos antimicrobianos, sIgA y la secreción de mucinas formadoras de moco, mientras que una variedad de células inmunes contribuye a la defensa de la mucosa en el lado interno. La microbiota forma parte de este sistema debido a la influencia mutua que se produce entre el huésped y los microorganismos luminales (Bischoff et al., 2014; Sánchez de Medina, Romero-Calvo, Mascaraque, & Martínez-Augustin, 2014).

Una barrera intestinal intacta protege al organismo humano contra la invasión de microorganismos patógenos o sus moléculas, como las toxinas, y cuando estos invaden el cuerpo, responden rápidamente a ellos. Por otro lado, esta barrera debe estar abierta para permitir la absorción de líquidos y nutrientes esenciales. Esto se logra a través de la "permeabilidad intestinal" que es la propiedad que permite el intercambio de soluto y líquido entre el lumen y los tejidos. A la inversa, la función de barrera intestinal se refiere

a la capacidad de la mucosa y los componentes de la barrera extracelular, de evitar este intercambio (Bischoff et al., 2014; S. H. Lee, 2015).

El aumento de la permeabilidad implica la translocación de bacterias y sus componentes de la pared celular que desencadenan una cascada inflamatoria que se ha relacionado con la obesidad y la resistencia a la insulina (Morrison & Preston, 2016).

Células epiteliales intestinales

La barrera intestinal, es decir, el epitelio, es una monocapa compuesta principalmente por 4 tipos de células epiteliales intestinales (CEI): enterocitos absorbentes, células caliciformes, células Paneth y células enteroendocrinas. Todas ellas son fuente de mucina y péptidos antimicrobianos que se secretan a la luz intestinal, así como mediadores inmunitarios, incluyendo citoquinas y quimiocinas, que reclutan y regulan la diferenciación y activación de las células inmunitarias que constituyen mecanismos importantes de defensa contra la infección (Corrêa-Oliveira et al., 2016; Sánchez de Medina et al., 2014).

Microvilli

Las microvilli o microvellosidades son prolongaciones digitiformes (en forma de dedo) de células del epitelio como en el intestino, que permiten ampliar la superficie de las mismas, y por lo tanto aumentar la superficie de intercambio de sustancias. se encuentran en el dominio apical de la célula epitelial orientada hacia la superficie o luz del conducto que reviste (Müller-Esterl, 2004). La microbiota intestinal puede desempeñar un papel en el desarrollo del epitelio intestinal al aumentar la densidad de los capilares de las vellosidades del intestino delgado e influir en la fisiología y motilidad intestinal, promoviendo la extracción calórica de la dieta (Boulangé, Neves, Chilloux, Nicholson, & Dumas, 2016).

Enfermedades relacionadas a la disbiosis

La disbiosis se define como un desequilibrio en la comunidad microbiana intestinal, el cual podría deberse a la ganancia o pérdida de miembros de la comunidad o cambios en la abundancia relativa de microbios (Said & Ghishan, 2018). Esto, sumado al aumento de la permeabilidad intestinal y el deterioro de la inmunidad de la mucosa, se ha vinculado como paso previo al inicio de enfermedades inflamatorias y de autoinmunidad. Lo cual se debe posiblemente a la alteración en la ecología microbiana y la disminución de la producción de ácidos grasos de cadena corta. Una barrera mucosa intestinal "permeable" respalda la degradación de la tolerancia inmunológica y conduce a enfermedades e inflamaciones intestinales, como la enfermedad celíaca, alergias, asma, enfermedad renal crónica, enfermedad inflamatoria del intestino, obesidad y enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT), como las enfermedades cardiovasculares, metabólicas, cáncer y diabetes (Richards et al., 2016; West et al., 2015).

Enfermedad intestinal inflamatoria

La enfermedad intestinal inflamatoria (EII) consiste en dos trastornos principales, la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn. Ambas enfermedades exhiben cambios inflamatorios crónicos que consisten en una intensa infiltración de macrófagos y linfocitos con un gran número de células plasmáticas. En la colitis ulcerosa, los cambios patológicos incluyen inflamación difusa con úlceras de la mucosa. Mientras que en la enfermedad de Crohn, el infiltrado inflamatorio frecuentemente forma granulomas y puede extenderse a través de todas las capas de la pared intestinal (Fusunyan & Sanderson, 1998).

Enfermedades crónicas no transmisibles

Las enfermedades inflamatorias crónicas no transmisibles (ECNT) tienen en común una inflamación subyacente de bajo grado. Estos incluyen las ECNT de inicio temprano, como alergias, asma y algunas enfermedades autoinmunes, y las ECNT de inicio más tardío, que incluyen enfermedades cardiovasculares, enfermedades metabólicas y trastornos neurodegenerativos, que también parecen compartir factores de riesgo ambientales comunes y variantes de riesgo genético. Si bien la inflamación y las vías de la enfermedad son multifactoriales, los patrones de colonización intestinal asociados con la disminución de la diversidad microbiana son un tema central y están cada vez más implicados en la desregulación fisiológica, inmunológica y metabólica observada en muchas de estas patologías (West et al., 2015).

Uniones ocluyentes o estrechas

Los organismos multicelulares están separados del entorno externo por una capa de células epiteliales cuya integridad se mantiene mediante complejos de unión intercelular compuestos de uniones estrechas, uniones adherentes y desmosomas, mientras que las uniones de brecha proporcionan una comunicación intercelular (Schneeberger & Lynch, 2004).

Las uniones estrechas, también conocidas como uniones ocluyentes o zonulas occludens (TJ, del inglés: Tight Junction,) son complejos de unión multiproteínicos cuya función general es regular el movimiento selectivo de solutos y agua transportados a través del epitelio (Anderson & Van Itallie, 2009).

Proteínas de las unión ocluyente

Se han identificado y caracterizado más de 40 moléculas dentro de la unión ocluyente que consisten en proteínas transmembrana y citoplasmáticas. Las tres principales proteínas transmembrana son ocludina, claudinas y moléculas de adhesión de unión (JAM). Estas se asocian con diferentes proteínas de la membrana periférica, como la zona occludens-1, codificada por el gen ZO1 ubicada en el lado intracelular de la membrana plasmática, que ancla las cadenas al componente de actina del citoesqueleto (Anderson & Van Itallie, 2009).

Por su parte, ocludina es una proteína que en humanos está codificada por el gen OCLN. Es una proteína integral de membrana plasmática que junto con el grupo de claudinas, es el componente principal de las uniones estrechas y juega un papel crítico en el mantenimiento de las propiedades de barrera de una unión ocluyente (Ando-Akatsuka et al., 1996).

Receptor de inmunoglobulina polimérico

El receptor de inmunoglobulina polimérico (pIgR) es una proteína transmembrana que se produce, entre otros, por las CEI y células epiteliales bronquiales. En los humanos está codificada por el gen PIGR. Es un receptor de Fc que facilita la transcitosis (proceso de transporte de inmunoglobulinas poliméricas del lado basolateral al apical) de las isoformas poliméricas solubles de la inmunoglobulina A y los complejos inmunes. Se encuentran principalmente en el revestimiento epitelial de las superficies mucosas del tracto gastrointestinal. La expresión de pIgR está bajo la fuerte regulación de las citoquinas, hormonas y estímulos patógenos (Asano & Komiyama, 2011; Kaetzel, 2005).

Lipopolisacárido

Los lipopolisacáridos (LPS), también denominados endotoxinas, se derivan de la membrana celular externa de las bacterias Gram-negativas y están conformadas por una parte lipídica y cadenas características de oligosacáridos y polisacáridos (Boulangé et al., 2016; Cani et al., 2007).

El LPS endógeno se produce continuamente en el intestino por la muerte de bacterias Gram-negativas y se transloca fisiológicamente en capilares intestinales que induce a la activación sistémica de monocitos/macrófagos. El aumento de LPS bacteriano desencadena una cascada proinflamatoria mediada por el receptor tipo Toll-4 (TLR4) en células inmunes tales como monocitos, macrófagos y células de Kupffer. Esto lleva a la activación de vías de señalización descendentes, como el factor nuclear kappa β (NF- κ B) y la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), que puede conducir a una inflamación provocada por citoquinas como el factor de necrosis tumoral (TNF), interleuquina 1 (IL-1 β) e interleuquina 6 (IL-6). Las citoquinas proinflamatorias a su vez activan una serie de eventos y procesos mediados por células, incluyendo la activación de células T helper CD4+ en el intestino. (Cani et al., 2007; Fusunyan & Sanderson, 1998; Morrison & Preston, 2016).

El LPS sistémico se encuentran en bajas concentraciones en individuos sanos, pero alcanzan altas concentraciones en personas con obesidad, una condición llamada endotoxemia metabólica. Entre los mecanismos que vinculan la obesidad y la endotoxemia metabólica, se ha propuesto el consumo de una dieta alta en grasas, en la que se modifica la microbiota intestinal, lo que conduce al aumento de la permeabilidad intestinal y de los niveles sistémicos de productos bacterianos como el LPS (Boulangé et al., 2016).

Diferenciación de monocitos- macrófagos

A partir de una célula precursora de la línea mielocítica en la médula ósea, surgen los monocitos que circulan en la sangre y son reclutados en los tejidos, durante procesos inflamatorias, allí maduran hasta convertirse en macrófagos (Abbas, 2015). Los monocitos se diferencian en macrófagos inflamatorios (M1) y células dendríticas (CD) en respuesta a la inflamación o productos microbianos, como estímulos pro-Th1 (interferón- γ), factor estimulante de colonias de macrófagos granulocitos (GM-CSF) o LPS. En contraste, los monocitos se convierten en macrófagos antiinflamatorios (M2) en respuesta a los estímulos antiinflamatorios pro-Th2 (IL-4, IL-10 y M-CSF). En el microentorno de tumor, los monocitos están influenciados por factores de crecimiento derivados del tumor (M-CSF, IL-10, IL-6 y factor de crecimiento transformante β (TGF- β)), que diferencia los monocitos hacia macrófagos M2 (Sánchez-Martín et al., 2011).

Las señales microambientales, que operan a través del control de la expresión génica mediante factores de transcripción, dictan el proceso de diferenciación terminal de los monocitos. Las proteínas RUNX son factores heterodiméricos que juegan papeles cruciales durante el desarrollo y la diferenciación de las células del sistema inmune. RUNX3 media la señalización de TGF- β en células dendríticas (CD) y es esencial para la generación de células de Langerhans, por lo cual es un buen candidato para regular la diferenciación de monocitos (Puig-Kröger et al., 2010).

La molécula de adhesión intercelular 3 (ICAM3) se encuentra en la superficie de la mayoría de los leucocitos y es altamente expresado en monocitos de sangre periférica, neutrófilos, eosinófilos y linfocitos. Estecha y colaboradores (2012) han observado que la expresión de ICAM-3 está regulada negativamente en las primeras etapas del proceso de diferenciación *in vitro* de monocitos a macrófagos y en la

transmigración de monocitos a través de monocapas endoteliales. También han demostrado que RUNX3 ejerce un efecto regulador negativo sobre la expresión de ICAM-3 en células mieloides (Esteche et al., 2012).

De igual forma, el análisis de proteínas realizado por Sanchez-Martin y colaboradores (2011), reveló que los niveles de ICAM-3 disminuyeron con la diferenciación de macrófagos derivados de monocitos, la migración transendotelial de monocitos y la maduración de CD, cambios que se correlacionan con un aumento de RUNX3 (Sánchez-Martín et al., 2011).

Por otro lado, en macrófagos, la proteína fosfatasa 1A dependiente de Mg^{2+}/Mn^{2+} (PPM1A), actúa como un punto de control tanto para la respuesta inmune celular innata a las infecciones virales como a la infección con *Mycobacterium tuberculosis*. Por lo que en estudios previos, Smith y colaboradores (2018), han demostrado que PPM1A controla la diferenciación de monocitos a macrófagos y actúa como un regulador de umbral para limitar la diferenciación en macrófagos activados M1 en respuesta a GM-CSF (Smith et al., 2018).

El factor de necrosis tumoral, codificado por el gen TNF, es una proteína de señalización celular del grupo de las citocinas involucrada en la inflamación sistémica. Es un pirógeno endógeno que además de inducir fiebre, provoca muerte celular apoptótica, inflamación e inhibe la tumorigénesis y la replicación viral y responde a la sepsis a través de células productoras de IL1 e IL6. El TNF se produce principalmente por macrófagos activados y es liberado en grandes cantidades en respuesta al LPS y otros productos bacterianos (Olszewski et al., 2007).

Ácidos grasos de cadena corta

Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) son los principales metabolitos producidos por las comunidades microbianas que colonizan el intestino de los mamíferos, a través de la fermentación anaeróbica de hidratos de carbono no digeridos en el colon (Bischoff et al., 2014; Louis & Flint, 2017). Tienen importantes impactos sobre la fisiología del huésped como fuentes de energía y como moduladores de procesos celulares que incluyen quimiotaxis, expresión génica, diferenciación, proliferación y apoptosis. Además, actúan como un enlace entre la microbiota y el sistema inmunológico pues se han descubierto mecanismos mediante los cuales los AGCC regulan el desarrollo de las células inmunitarias y suprimen la inflamación (Corrêa-Oliveira et al., 2016; Louis & Flint, 2017; Richards et al., 2016). Finalmente modifican la integridad de la barrera epitelial a través de la regulación coordinada de las proteínas de unión ocluyente (TJP) (Morrison & Preston, 2016).

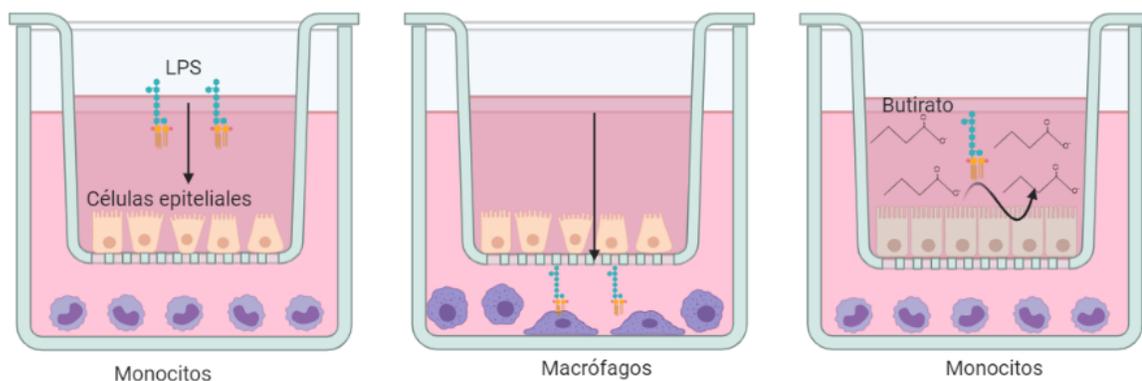
Butirato

Los principales y más estudiados AGCC son los ácidos acético, propiónico y butírico, que tienen, respectivamente, dos, tres y cuatro carbonos en su estructura química (Corrêa-Oliveira et al., 2016). Entre ellos, el butirato desempeña un papel particular para mantener la barrera intestinal mediante el aumento de la expresión de las TJP. Este ácido promueve la regulación positiva de la transcripción de la proteína de unión estrecha Claudin-1, revierte la expresión de ZO-1 y disminuye la translocación de LPS, lo que conlleva a la inhibición de la activación de macrófagos, la producción de citoquinas proinflamatorias y la infiltración de neutrófilos. Por lo tanto, el déficit de butirato provoca lesiones en la unión estrecha y perjudica la permeabilidad intestinal (Bischoff et al., 2014; Morrison & Preston, 2016; Plöger et al., 2012).

Algunos de los efectos gastrointestinales del butirato tienen implicaciones clínicas. Por ejemplo, en el tejido intestinal normal, el butirato induce la proliferación epitelial pero disminuye la proliferación celular, aumenta la apoptosis y estimula la diferenciación celular en las células de cáncer de colon, lo que puede minimizar la incidencia y la progresión del cáncer de colon. También estimula la absorción de NaCl en el colon distal de la rata e inhibe la acción prosecretora de varios secretagogos generadores de AMPc, lo que puede ser beneficioso en el tratamiento de trastornos diarreicos. Finalmente, puede mejorar la función de barrera de los epitelios gastrointestinales y, por lo tanto, mejorar los trastornos diarreicos que se presentan por una falla de la barrera, por ejemplo, la enfermedad inflamatoria intestinal (Plöger et al., 2012).

Sistema de cultivo celular dual

El sistema de cultivo celular dual utiliza insertos Transwell que utiliza una cámara de plástico hueca, sellada en un extremo con una membrana porosa de 0,4 μm . Esta cámara está suspendida sobre un pozo más grande que contiene medio de cultivo. Las células se colocan dentro de la cámara y están en contacto a través de la membrana con los monocitos que se encuentran en el pozo más grande. Esto ha proporcionado los medios para estudiar muchos procesos celulares epiteliales, incluidas las interacciones con otros tipos de células, las interacciones con los microbios, la absorción de fármacos y el transporte intracelular (Said & Ghishan, 2018).

Figura 1*Esquema de sistema de cultivo dual*

Nota: Ilustración creada en el Software BioRender por A. Benavides, 2020.

Línea celular Cáncer coli-2 (Caco-2)

La línea celular Caco-2 es una línea continua de células heterogéneas humanas epiteliales colorrectales de adenocarcinoma, desarrollado en el Sloan-Kettering Institute for Cancer Research por Dr. Jorgen Fogh. Aunque se derivan de un carcinoma de colon, cuando se cultivan en condiciones específicas, las células se diferencian y polarizan de manera que su fenotipo, morfológica y funcionalmente, se asemeja a los enterocitos que recubren el intestino delgado. Estas células expresan uniones ocluyentes, microvellosidades y una serie de enzimas y transportadores que son característicos de los enterocitos: peptidasas, esterasas, glicoproteína P, transportadores de captación de aminoácidos, ácidos biliares y ácidos carboxílicos (Hidalgo, Raub, & Borchardt, 1989).

Línea celular THP-1

La línea THP-1 es una línea celular monocítica humana derivada de la sangre periférica de un paciente con leucemia monocítica aguda. En general, exhiben una

morfología grande, redonda y unicelular. Presentan producción de IL-1 y polarización en el fenotipo M1 mediante incubación con IFN- γ y LPS, o con el fenotipo M2 mediante incubación con IL-1 e IL-4 (Genin, Clement, Fattaccioli, Raes, & Michiels, 2015; Tsuchiya et al., 1980).

PCR en tiempo real

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (del inglés, qPCR) o PCR en tiempo real es una técnica sensible con capacidad para detectar y medir cantidades mínimas de ácidos nucleicos en una amplia gama de muestras de numerosas fuentes, a medida que ocurre la amplificación (Bustin et al., 2009).

Durante la qPCR, el ácido nucleico amplificado se marca con fluorescencia y la cantidad de fluorescencia liberada durante la amplificación es directamente proporcional a la cantidad de ADN amplificado. Cuanto mayor sea el número inicial de moléculas de ADN en la muestra, más rápido aumentará la fluorescencia durante los ciclos de PCR. El ciclo en el que se puede detectar la fluorescencia se denomina ciclo de cuantificación (Ct) y es el resultado básico de qPCR: valores de Ct más bajos significan números de copia iniciales más altos del ácido nucleico de interés (Čepin, 2017).

La PCR cuantitativa con retrotranscripción (RT-qPCR) convierte un transcrito de ARN en una plantilla de ADN complementario antes de la amplificación. RT-qPCR puede hacerse en uno o dos pasos. El método de un paso ahorra tiempo y se requiere de un solo mix de reacción pues la transcripción inversa y amplificación ocurren en un mismo tubo. En el proceso de dos pasos, la reacción de transcripción inversa se realiza primero, y luego sus productos se usan en una reacción de amplificación separada. El ADNc producido durante la reacción de transcripción inversa se puede guardar para su uso posterior (Schweitzer, 2014).

Clasificación química o reporteros

Hay dos tipos comunes de químicas o de indicadores de fluorescencia, las moléculas que se unen al ADN bicatenario y las sondas o cebadores marcados. El agente más común que se une al ADN bicatenario producido como resultado de la amplificación por PCR es SYBR Green I, por lo que el resultado es un aumento en la intensidad de fluorescencia. Por otro lado, las químicas basadas en sondas se sustentan en un mecanismo de reportero-quencher. Una sonda específica de secuencia que está marcada con un indicador fluorescente y una molécula de desactivación se unen al templado. La señal fluorescente no se detecta hasta que la sonda se degrada durante la amplificación del templado. También se necesitan cebadores, como las sondas TaqMan, las cuáles hacen que la reacción sea más específica (Schweitzer, 2014).

Cuantificación relativa

La cuantificación relativa se basa en la comparación entre el nivel de expresión del gen a estudiar versus un gen control, llamado normalizador, que se selecciona por su expresión casi constante (Vandesompele et al., 2002). Determina el cambio en la expresión de una secuencia de ácido nucleico objetivo en una muestra en relación con la misma secuencia en una muestra de calibrador, que puede ser un control no tratado o una muestra en el tiempo cero en un estudio de curso de tiempo (Livak & Schmittgen, 2001).

Genes de referencia

Los genes de referencia suelen denominarse, en inglés, house-keeping genes, o genes endógenos ya que están involucrados en funciones básicas en la supervivencia celular, por lo que se expresan de manera constitutiva (Vandesompele et al., 2002). El gen de

referencia consiste en una secuencia genética contenida en una muestra que se utiliza para normalizar cantidades objetivo. Además de la secuencia objetivo, un control endógeno se cuantifica como un medio para corregir los resultados que pueden sesgarse por las diferencias de carga de ácido nucleico de entrada (Livak & Schmittgen, 2001).

Los genes normalizadores más comúnmente utilizados son los que codifican las proteínas tubulina, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, albúmina, ciclofilina, ARN ribosomales, etc (M. Pfaffl, Tichopad, Prgomet, & Neuvians, 2004).

Gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)

El gen GAPDH produce una única transcripción de ARNm sin variantes de empalme conocidas, codifica una enzima de ~ 37kDa que cataliza el sexto paso de la glucólisis, la oxidación y fosforilación del gliceraldehído-3-fosfato a 1,3-bisfosfoglicerato. Además, se ha visto implicada en varios procesos no metabólicos, incluida la activación de la transcripción, el inicio de la apoptosis. A menudo este gen se expresa de manera estable y constitutiva a altos niveles en la mayoría de los tejidos y células, por lo que se lo considera un gen de referencia y es usado frecuentemente como control para qPCR (Tarze et al., 2007).

Gen hipoxantina fosforribosiltransferasa 1 (HPRT1)

El gen HPRT1 codifica la enzima que cataliza la conversión de hipoxantina en monofosfato de inosina y de guanina en monofosfato de guanosina. Esta reacción transfiere el grupo 5-fosforibosilo del 5-fosforibosil 1-pirofosfato (PRPP) a la purina. El gen HPRT1 se conserva de bacterias a humanos y es un marcador genético de uso frecuente en las células eucariotas (Duan, Nilsson, & Lambert, 2004). La enzima HPRT1 permite a las células reciclar purinas. La fabricación de purinas usa más energía y lleva

más tiempo que reciclarlas, lo que hace que el reciclaje de estas moléculas sea más eficiente. Reciclar purinas asegura que las células tengan un suministro abundante de bloques de construcción para la producción de ADN y ARN (NCBI, 2017).

Hipótesis

El butirato estimula la diferenciación de las células epiteliales intestinales, aumentando la expresión de proteínas presentes en las uniones ocluyentes.

El butirato contrarresta el aumento de permeabilidad de las células epiteliales estimuladas con lipopolisacárido inhibiendo la diferenciación de monocitos subepiteliales hacia macrófagos.

Capítulo 2: Materiales Y Métodos

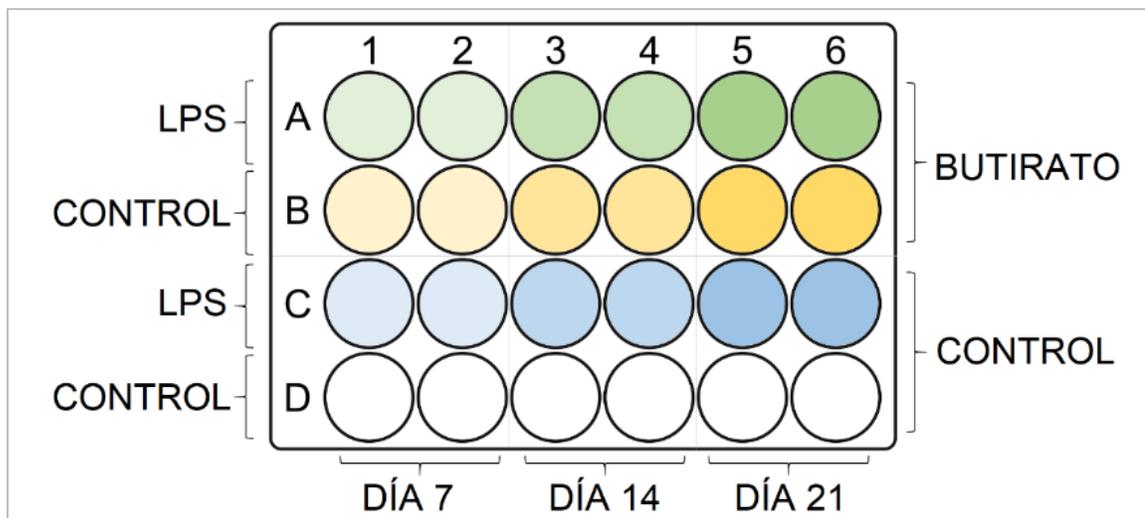
Modelo de cultivo celular dual

El Centro de Investigación Biomédica – CENBIO, de la Universidad UTE, proporcionó el sistema de cultivo dual que simula la estructura y funcionalidad del epitelio gastrointestinal. Este consiste en una monocapa de la línea celular humana procedente de adenocarcinoma colorrectal epitelial humano, cáncer coli-2 (Caco-2), cultivadas en insertos transwell de poliestireno de 24 pocillos (0.4µm poro membrana), sobre la línea celular de monocitos humanos THP-1 (Figura 1).

Inicialmente, ambas líneas celulares fueron cultivadas por separado. La células caco-2 fueron cultivadas en medio MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) sobre las membranas de los insertos transwell. La línea celular THP-1 fue cultivada en medio RPMI-146 en la placa de 24 pocillos, los 12 horas antes de la exposición al tratamiento en el sistema dual. A partir del cuarto día, las células caco-2 fueron tratadas con 1.5 mM de butirato de sodio. Posteriormente, se empleó el sistema de cultivo celular dual, al cual se agregaron 450 ng/mL de LPS por 24h en los días 7, 14 y 21 del cultivo. Se incluyeron dos repeticiones técnicas por cada tratamiento y dos repeticiones biológicas, además se incluyeron controles negativos de células sin exposición al butirato de sodio y al LPS (Figura 2).

Figura 2

Distribución de los tratamientos para las células en el cultivo dual



Nota: Células expuestas a (fila A) butirato de sodio y LPS; (fila B) butirato de sodio; (fila C) LPS; (fila D) sin exposición. Las células fueron tratadas con LPS (columnas 1 y 2) en el día 7 de iniciado el cultivo; (columnas 3 y 4) día 14; (columnas 5 y 6) día 21.

Extracción de ARN

Extracción y purificación de ARN de células caco-2

Se realizó la extracción de ARN de células caco-2 en los días 8, 15 y 22 de iniciado el cultivo, mediante el protocolo del kit PureLink® RNA Mini kit de Ambion y la purificación mediante el kit PureLink® DNase del mismo fabricante. Durante todo el procedimiento se utilizó material estéril y libre de RNasas para evitar la degradación del ARN.

Se removió el medio de cultivo de las células caco-2. Los pasos que se describen a continuación se realizaron a temperatura ambiente, incluyendo las centrifugaciones e incubaciones. Se añadieron 600 µL de Buffer de Lisis preparado con

1% de 2-mercaptoetanol y se agitó mediante vórtex a alta velocidad hasta que el sedimento celular se dispersó completamente. Para homogenizar se pasó el lisado 10 veces a través de una aguja de calibre 18-21 conectada a una jeringa. Se añadieron 600 μL de etanol (70 %), se homogenizó completamente mediante vórtex y se transfirió el contenido a la columna. Se centrifugó a 12 000 rcf durante 15 segundos, se descartó el sobrenadante y se reinsertó la columna en el tubo colector.

Para la purificación se prepararon 80 μL de solución de *PureLink® DNase* por muestra. Para ello, en un microtubo se mezclaron 8 μL de Buffer de Reacción I DNasa, 10 μL de DNase resuspendida y 62 μL de Agua libre de RNasas.

Se añadieron 350 μL de Buffer de Lavado I a la columna, se centrifugó a 12 000 rcf durante 15 segundos, se descartaron el sobrenadante y el tubo colector y se transfirió la columna a un tubo colector estéril. Se añadieron 80 μL de la mezcla de *PureLink® DNase* directamente sobre la superficie de la membrana de la columna y se incubó por 15 minutos. Se repitió el paso con el Buffer de Lavado I. Posteriormente, se añadieron 500 μL de Buffer de Lavado II y se centrifugó a las condiciones establecidas, se eliminó el sobrenadante y se reinsertó la columna en el tubo colector. Se repitió el paso con el Buffer de Lavado II. Para secar la membrana, se centrifugó por 2 minutos a las condiciones establecidas, se descartó el tubo colector y se insertó la columna en un tubo de recuperación. Finalmente, se añadieron 50 μL de agua libre de RNasas y se incubó el tubo durante 1 minuto. Se centrifugó a 12 000 rcf por 2 minutos. Se procedió a realizar la cuantificación y evaluación de la integridad del ARN extraído.

Extracción y purificación de ARN de células THP-1

Se realizó la extracción y purificación de ARN de células THP-1 en los días 8, 15 y 22 de iniciado el cultivo, mediante los kits de Ambion mencionados anteriormente y

bajo los mismo procedimientos, excepto por una modificación inicial. Al tratarse de células en suspensión, se transfirieron las células THP-1 a un tubo libre de RNAsas, se centrifugó a 2000 rcf por 5 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. Se añadieron 600 µL de Buffer de Lisis preparado con 2-mercaptoetanol y se homogenizó mediante vórtex. Se centrifugó a 12 000 rcf durante 2 minutos, y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo. Se añadieron 600 µL de etanol (70 %), se homogenizó completamente mediante vórtex y se transfirió el contenido a la columna. Se centrifugó a 12 000 rcf durante 15 segundos, se descartó el sobrenadante y se reinsertó la columna en el tubo colector.

Los procedimientos subsiguientes de purificación y lavados con buffers hasta la resuspensión del RNA en agua libre de RNAsas, se realizaron con la misma metodología descrita para la extracción de RNA de células caco-2.

Cuantificación del ARN extraído

La cuantificación del ARN extraído y la determinación de su pureza se realizaron en el equipo *Cytation 5*. Previo a la medición se aplicó el protocolo descrito en el Anexo 1. A continuación, se colocó 2 µL de la muestra en dupletas y se procedió a la medición. Se determinaron los valores de las relaciones 260/280 y 260/230, las cuales permiten evaluar la pureza biológica y química, respectivamente. Se comprobó que dichos valores se encuentren en los rangos óptimos que son de 1.8 a 2 y 1.8 a 2.2, respectivamente.

Evaluación de la integridad del ARN

Se evaluó la integridad del ARN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. La condiciones para la corrida electroforética fueron a 100 voltios (V) y 300

miliamperios (mA) por 60 minutos. Mediante un transiluminador de luz UV, se observaron las bandas correspondientes a las subunidades ribosómicas, 28S y 18S.

Secuencias de primers para los genes de interés

Las secuencias de primers para los genes target y genes de referencia fueron obtenidas mediante revisión bibliográfica. Así, las secuencias de primers para ZO1 y OCLN se obtuvieron de los estudios realizados por Park et al. (2015), mientras que las secuencias de ICAM3, RUNX3, TNF, GAPDH, HPRT1 y ACTB se obtuvieron de los estudios realizados por Jin et al. (2018), Li et al. (2016), Jin et al. (2014), Sanchez-Martin et al. (2011), Monsuur et al. (2018) y Li Yan et al. (2011), respectivamente.

Las secuencias de primers para PIGR fueron obtenidas de la base de datos pública PrimerBank, cuyo número de identificación de primers es 239915993c2.

Las secuencias de primers para PPM1A fueron diseñados mediante el programa bioinformático *Primer BLAST*. Con dicho programa, también se verificó que las secuencias de los primers hibriden únicamente con las secuencias respectivas de los genes en estudio, que fueron obtenidas de la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés).

Estandarización de los sistemas de RT-PCR convencional

Se realizaron ensayos de RT-PCR convencional a fin de determinar las condiciones óptimas (temperatura de hibridación o *annealing* y programación del termociclador) de amplificación de los genes de interés para la estandarización de los sistemas de RT-qPCR. Para estos ensayos se utilizó el kit *SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen), ARN de células caco-2 y

THP-1 (sin tratamiento) y primers específicos tanto para los genes target como para los genes de referencia.

En la estandarización de los sistemas de RT-PCR para los genes de interés se modificó el protocolo recomendado por el fabricante y se optimizó el volumen final de reacción a 12.5 μL . Se realizaron dupletas del control positivo y se incluyeron dos controles negativos. Con el objetivo de comprobar que no exista contaminación en los reactivos o en la cabina de flujo laminar, en el primer control negativo se añadió agua DEPC en lugar de ARN. Por otro lado, para descartar que las muestras de ARN no están contaminadas con ADN, en el segundo control negativo se añadió *GoTaq Hot Start Polimerase* (Promega) en lugar del mix enzimático proporcionado por el kit. Los componentes, concentraciones y volúmenes utilizados en la estandarización de los sistemas de RT-PCR para los diferentes genes se muestran en la Tabla 1.

Adicionalmente, mediante un programa de RT-PCR con gradiente de temperatura, se determinó la temperatura de annealing óptima para cada sistema, a fin de evitar la obtención de productos no específicos. La programación del termociclador que se utilizó para los diferentes genes se describe en la Tabla 2.

Tabla 1

Master Mix de reacción para los ensayos de RT-PCR convencional

| Componente | C_{stock} | C_{final} | 1X (μL) | 4X (μL) |
|--|--------------------------|--------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Mix de reacción 2X | 2X | 1X | 6.25 | 25 |
| Primer Forward | 10 μM | 0.2 μM | 0.25 | 1 |
| Primer Reverse | 10 μM | 0.2 μM | 0.25 | 1 |
| <i>SuperScript III RT/ Platinum Taq Mix*</i> | --- | --- | 0.50 | --- |
| <i>Taq Polimerasa Platinum*</i> | --- | --- | --- | --- |

| Componente | C _{stock} | C _{final} | 1X (μL) | 4X (μL) |
|---------------------------|--------------------|--------------------|-------------|-----------|
| ARN* | 5 ng/μL | 1 ng/μL | 2.50 | --- |
| Agua DEPC | -- | -- | 2.75 | 11 |
| Volumen Total (μL) | | | 12.5 | 38 |

Nota: *Componentes no añadidos al Master Mix. A partir del Master Mix se ensamblaron los controles positivos y negativos. Para las dupletas del control positivo, se añadió el mix enzimático (*SuperScript III RT/ Platinum Taq Mix*) y ARN; para el primer control negativo se añadió el mix de enzimas y agua DEPC en lugar de ARN; y para el segundo control negativo, se añadió *GoTaq Hot Start Polimerase* en lugar del mix enzimático y ARN.

Tabla 2

Programación del termociclador para los ensayos de RT-PCR

| Proceso | Temperatura | Tiempo | Ciclos |
|----------------------|-------------|--------|--------|
| Síntesis de ADNc | 55°C | 15 min | 1 |
| Denaturación inicial | 94°C | 2 min | 1 |
| Denaturación | 94°C | 15 s | 35 |
| Annealing | Δ | 30 s | |
| Extensión | 68°C | 30 s | |
| Extensión final | 68°C | 5 min | 1 |
| Espera | 4°C | 5 min | 1 |

Nota: Δ = rango de temperatura entre 57°C hasta 63°C para todos los sistemas

Estandarización los sistemas de PCR en tiempo real

Estandarización de RT-qPCR en la línea celular caco-2

Se realizó la estandarización de los sistemas de RT-qPCR para los genes target (ZO1, OCLN, PIGR y TNF) y para el gen de referencia GAPDH. Para estos ensayos se utilizó el kit *Power SYBR® Green RNA-to-CT™ 1-Step Kit* de Applied Biosystems, ARN

de células caco-2, primers específicos para cada gen y el equipo *QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System* de Applied Biosystems.

Se prepararon las reacciones a un volumen final de 20 μL siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se realizaron dupletas del control positivo y se incluyó un control negativo sin ARN. Los componentes, concentraciones y volúmenes utilizados en la estandarización de los sistemas de RT-qPCR para los genes ZO1, OCLN, PIGR, TNF y GAPDH se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

Master Mix de reacción para los ensayos de RT-qPCR con Power SYBR Green RNA-to-CT™ 1-Step Kit

| Componente | C_{stock} | C_{final} | 1X (μL) | 3X (μL) |
|---|--------------------------|--------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Power SYBR® Green RT-PCR Mix | 2X | 1X | 5 | 15 |
| Primer Forward | 10 μM | 0.4 μM | 0.4 | 1.2 |
| Primer Reverse | 10 μM | 0.4 μM | 0.4 | 1.2 |
| RT Enzyme Mix | 125X | 1X | 0.08 | 0.24 |
| ARN* | 20 ng/ μL | 2 ng/ μL | 1 | --- |
| Agua DEPC | -- | -- | 3.12 | 9.36 |
| Volumen Total (μL) | | | 20 | 27 |

Nota: *Componentes no añadidos al Master Mix. A partir del Master Mix se ensamblaron los controles positivos añadiendo ARN y los controles negativos añadiendo agua DEPC hasta alcanzar el volumen final de reacción (10 μL).

Para la programación de RT-PCR, fue añadida una etapa para realizar el análisis de las curvas de melting (curvas de disociación) de los productos amplificados, con el fin de detectar productos inespecíficos. La programación del termociclador en el equipo *QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System* se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4

Programación del QuantStudio™ 3 para los ensayos RT-qPCR

| Proceso | Temperatura | Tiempo | Ciclos |
|----------------------|--------------------|---------------|--|
| Síntesis de ADNc | 48°C | 30 min | 1 |
| Denaturación inicial | 95°C | 10 min | 1 |
| Denaturación | 95°C | 15 s | 35 |
| Annealing | Δ | 30 s | |
| Extensión | 60°C | 30 s | |
| Denaturación | 95°C | 15 s | Fase de Disociación (Curvas de Melting) |
| Annealing | 60°C | 1 min | |
| Denaturación | 95°C | 15 s | |
| Annealing | 60°C | 15 s | |

Nota: Δ = 60°C para los genes OCLN, PIGR y GAPDH; mientras que 50°C para ZO1

Estandarización de qPCR en la línea celular THP-1

Síntesis de ADNc a partir de ARN de células THP-1. Se realizó la estandarización de los sistemas de RT-qPCR para los genes target (ICAM3, PPM1A, RUNX3 y TNF) y para el gen de referencia HPRT1 en dos pasos. Para ello se realizó la síntesis de ADNc con el kit *Transcriptor First Strand ADNc Synthesis Kit* de Roche, ARN de células THP-1 y primers anchored-oligo(dT)18 del mismo kit. Se prepararon las reacciones a un volumen final de 20 μL siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los componentes, concentraciones y volúmenes utilizados para la síntesis de ADNc a partir de ARN de células THP-1 se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5*Master Mix de reacción para la síntesis de ADNc*

| Componente | C _{stock} | C _{final} | 1X (µL) |
|--|--------------------|--------------------|---------|
| ARN | 50 | 20 | 8 |
| Primer Oligo (dT)18 (vial 5) | 50 µM | 2.5 µM | 2 |
| Agua grado PCR (vial 7) | -- | -- | 3 |
| Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer (vial 2) | 5X | 1X | 4 |

| Componente | C _{stock} | C _{final} | 1X (µL) |
|---|--------------------|--------------------|-----------|
| Protector RNase Inhibitor (vial 3) | 40 U/µL | 20 U | 0.5 |
| Deoxynucleotide Mix (vial 4) | 10 mM | 1 mM | 2 |
| Transcriptor Reverse Transcriptase (vial 1) | 20 U/µL | 10 U | 0.5 |
| Volumen Total (µL) | | | 20 |

La programación del termociclador para la síntesis de ADNc se aplicó según las recomendaciones del fabricante y se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6*Programación del termociclador para la síntesis de ADNc*

| Proceso | Temperatura | Tiempo | Ciclos |
|------------------|-------------|--------|--------|
| Denaturación | 65°C | 10 min | 1 |
| Síntesis de ADNc | 50°C | 60 min | 1 |
| Inactivación | 85°C | 5 min | 1 |

Ensayos de qPCR a partir de ADNc de células THP-1. Se realizó la estandarización de los sistemas de qPCR para los genes target (ICAM3, PPM1A, RUNX3 y TNF) y para el gen de referencia HPRT1. Para estos ensayos se utilizó el kit *PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix* de Applied Biosystems, ADNc de células THP-1, primers específicos para cada gen y el equipo *LightCycler® 96 Instrument* de Roche Life Science.

Se prepararon las reacciones a un volumen final de 20 μL siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se realizaron dupletas del control positivo y se incluyó un control negativo sin ARN. Los componentes, concentraciones y volúmenes utilizados en la estandarización de los sistemas de qPCR para los genes ICAM3, PPM1A, RUNX3, TNF y HPRT1 se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7

Master Mix de reacción para los ensayos de qPCR con PowerUp™ SYBR Green

| Componente | C _{stock} | C _{final} | 1X (μL) | 3X (μL) |
|---|----------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix | 2X | 1X | 10 | 30 |
| Primer Forward | 10 μM | 0.4 μM | 0.8 | 2.4 |
| Primer Reverse | 10 μM | 0.4 μM | 0.8 | 2.4 |
| ADNc* | 20 ng/ μL | 2 ng/ μL | 2 | --- |
| Agua DEPC | -- | -- | 6.4 | 19.2 |
| Volumen Total (μL) | | | 20 | 54 |

Nota: *Componentes no añadidos al Master Mix. A partir del Master Mix se ensamblaron los controles positivos añadiendo ADNc y los controles negativos añadiendo agua DEPC hasta alcanzar el volumen final de reacción (20 μL).

Para la programación de qPCR, fue añadida una etapa para realizar el análisis de las curvas de melting (curvas de disociación) de los productos amplificados, con el fin de detectar productos inespecíficos. La programación del termociclador en el equipo *LightCycler® 96 Instrument* se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8

Programación del LightCycler® 96 Instrument para los ensayos qPCR

| Proceso | Temperatura | Tiempo | Ciclos |
|----------------|-------------|--------|--------|
| Activación UDG | 50°C | 2 min | 1 |

| | | | |
|-------------------|------|-------|---------------------|
| Activación enzima | 95°C | 2 min | 1 |
| Denaturación | 95°C | 15 s | |
| Annealing | 60°C | 15 s | 40 |
| Extensión | 72°C | 1 min | |
| Denaturación | 95°C | 15 s | |
| Annealing | 60°C | 1 min | Fase de Disociación |
| Denaturación | 95°C | 15 s | (Curvas de Melting) |
| Annealing | 60°C | 15 s | |

Estabilidad de genes de referencia

Los genes de referencia candidatos fueron: hipoxantina fosforribosiltransferasa 1 (HPRT1), beta actina (ACTB) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Para esta etapa, se realizó la extracción de ARN de células caco-2 y THP-1. Las células fueron tratadas previamente con LPS en presencia o ausencia de butirato. Se realizaron los respectivos ensayos de RT-qPCR para ambas líneas celulares con los tres genes de referencia candidatos. A partir de los resultados obtenidos (valores de Ct), se utilizó el software NormFinder para identificar el gen de normalización óptimo.

Sensibilidad analítica y eficiencia de amplificación

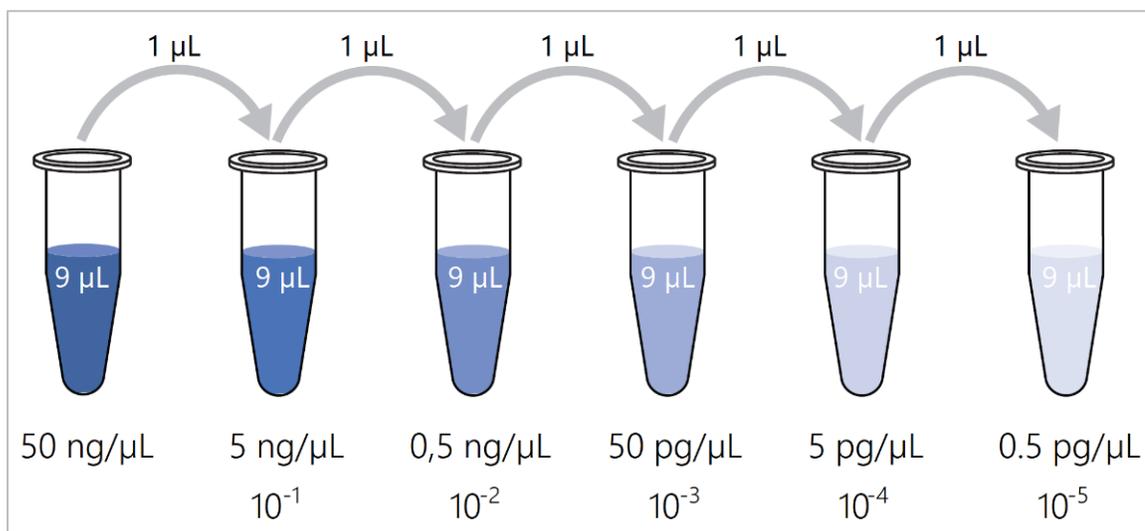
Sensibilidad analítica de sistemas en la línea celular caco-2

Se realizaron ensayos de sensibilidad analítica con el fin de determinar el límite inferior de detección de ARN de cada uno de los sistemas de células caco-2. Se realizaron diluciones seriadas 1:10 empezando con una concentración inicial de ARN de 50 ng/μL. Para esto, se colocaron 9 μL de agua DEPC en microtubos estériles y se añadió 1 μL de la solución de ARN (50 ng/μL). Se homogenizó la solución y se repitió dicho proceso añadiendo 1 μL de la dilución de ARN que le precedía hasta alcanzar concentraciones de 0.5 pg/μL, para todos los sistemas. En la Figura 3, se muestra el

procedimiento empleado para la preparación de las soluciones de ARN a las diferentes concentraciones requeridas.

Figura 3

Diluciones seriadas de ácido nucleico para los ensayos de sensibilidad analítica



Nota: Se realizaron diluciones con concentraciones desde 50 ng/µL hasta 0.5 pg/µL en proporciones 1:10

Posteriormente, se realizaron ensayos de qPCR para cada uno de los sistemas previamente estandarizados. Se realizaron dupletas de los controles positivos con las diluciones de ARN y se incluyó un control negativo sin ARN por cada ensayo.

Sensibilidad analítica de sistemas en la línea celular THP-1

Se realizó el ensayo de sensibilidad analítica con el mismo procedimiento de dilución del apartado anterior. En este caso se utilizó ADNc de células THP-1 sintetizado previamente. Para los sistemas ICAM3 y PPM1A se realizaron diluciones con concentraciones desde 50 ng/µL hasta 0.5 pg/µL en proporciones 1:10, mientras que para los sistemas RUNX3 y TNF se partió de 78 ng/µL hasta 0.125 ng/µL en proporciones 1:5; y finalmente para HPRT1, partiendo de 78 ng/µL hasta 0.3 ng/µL en

proporciones 1:4. Se realizaron los ensayos de qPCR correspondientes previamente estandarizados. Para todos los sistemas, se realizaron dupletas de los controles positivos con las diluciones de ADNc y un control negativo sin ADNc por cada ensayo.

Eficiencia de amplificación

Se utilizó el software del equipo *LightCycler® 96 Instrument* para obtener la gráfica de la curva estándar para cada sistema, a partir de los resultados de Ct obtenidos en los ensayos de sensibilidad analítica. Además, dicho software determina los valores de la pendiente de la recta, la eficiencia de amplificación (EA) y el coeficiente de determinación (R^2). El porcentaje de eficiencia de amplificación (PEA) se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Ecuación 1.} \quad \text{PEA (\%)} = (EA - 1) \times 100$$

Cultivo de células caco-2 y exposición a los tratamientos

La línea celular caco-2 fue cultivada en medio MEM suplementado con 10% de SFB y a partir del cuarto día de cultivo fueron tratadas con 1.5 mM de butirato de sodio. En los días 7, 14 y 21, en el sistema dual, fueron tratadas desde su lado apical con 450 ng/mL de LPS por 24 h. Los tratamientos a los que estuvieron expuestas las células fueron con: (a) butirato de sodio y LPS, (b) butirato de sodio, (c) LPS y (d) sin tratamiento.

Extracción, purificación, cuantificación y evaluación de la integridad del ARN extraído de células caco-2 expuestas a los tratamientos

En los días 8, 15 y 22 del cultivo, es decir 24 horas después de la exposición al LPS, se extrajo ARN de células caco-2 tratadas con butirato de sodio. Para ello se utilizó

el kit *PureLink® RNA Mini Kit*, y se purificó con el kit *PureLink® DNase*. Posteriormente se cuantificó y se evaluó la integridad del ARN.

Evaluación de los niveles de expresión de ICAM3, PPM1A, RUNX3 y TNF en células THP-1 expuestas a butirato y a lipopolisacárido

Para evaluar de manera indirecta la exposición de las células intestinales, tanto al LPS como al butirato, se determinó la diferenciación de monocitos subepiteliales (THP-1) en macrófagos, mediante la cuantificación de aquellos que se encontraron adheridos a la placa de cultivo. Para ello, se evaluó la expresión de las proteínas: (i) molécula de adhesión intercelular 3 (ICAM3), (ii) proteína fosfatasa 1A dependiente de Mg^{2+}/Mn^{2+} (PPM1A), (iii) factor de transcripción relacionado a Runt 3 (RUNX3) y (iv) factor de necrosis tumoral (TNF).

Cultivo de células THP-1 y exposición a los tratamientos

La línea celular THP-1 fue cultivada en medio RPMI-146. Posteriormente, se empleó el sistema de cultivo celular dual con el uso de los insertos transwell. Mientras en la parte superior, sobre la membrana porosa se cultivaron células caco-2, los monocitos indiferenciados fueron colocados en el lado laterobasal del epitelio, es decir por debajo de la membrana del inserto transwell. Los tratamientos a los que fueron expuestas las células en el cultivo dual fueron los mismos descritos previamente.

Extracción, purificación, cuantificación y evaluación de la integridad del ARN extraído de células THP-1 expuestas a los tratamientos

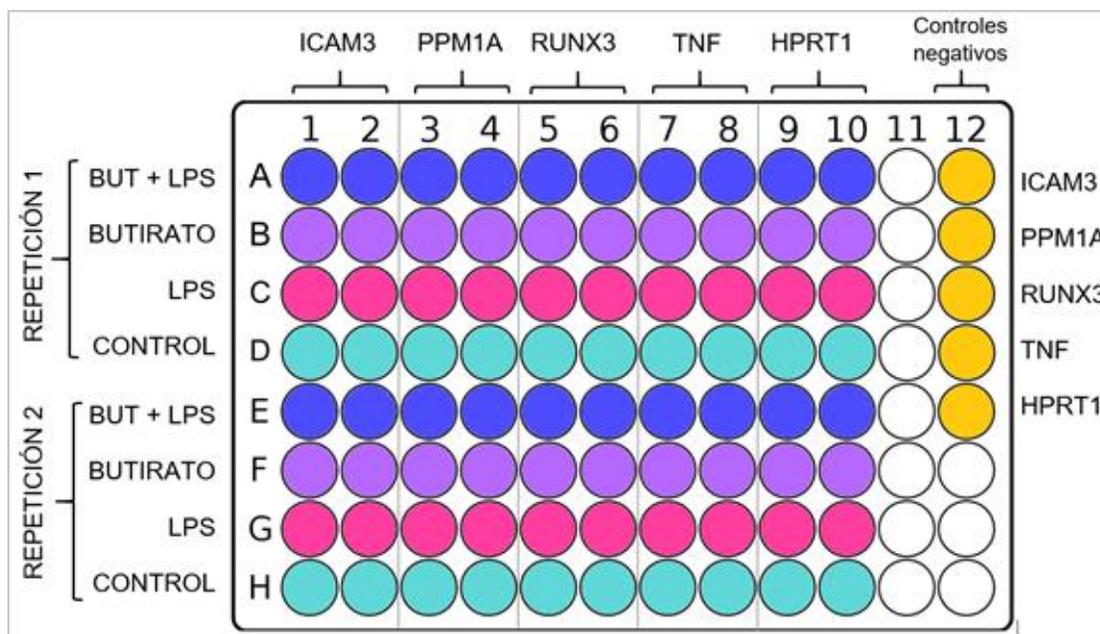
De esta línea celular se realizó la extracción del ARN en los días 8, 15 y 22 de cultivo, también se realizó la purificación y cuantificación de ARN, y del cual se evaluó su integridad, mediante los protocolos descritos anteriormente.

Ensayos de qPCR con SYBR® Green

Se realizaron los ensayos de qPCR para la amplificación de los genes target (ICAM3, PPM1A, RUNX3 y TNF) y del gen de referencia (HPRT1). Para ello, se utilizó el kit *PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix* de Applied Biosystems, ADNc de células THP-1 expuestas a LPS en presencia o ausencia de butirato, y el equipo *LightCycler® 96 Instrument* de Roche Life Science. La placa cuenta con 96 pocillos por lo que se diseñó cada ensayo de la siguiente manera, se incluyeron dos repeticiones de cada tratamiento, en dupletas y un control negativo (sin ADNc) para cada sistema como se muestra en la Figura 4 a continuación.

Figura 4

Diseño de placa de los ensayos de qPCR con ADNc de células THP-1 cultivadas en el sistema dual en presencia y ausencia de butirato



Nota: Pocillos vacíos en color blanco

Se utilizó una placa para las muestras de cada día de cultivo en el que fueron expuestos a los tratamientos, es decir, una placa para las muestras del día 7, otra para el día 14 y una tercera para el día 21. Estos ensayos se realizaron según el procedimiento y condiciones descritas previamente en la metodología para la estandarización, con la variación de que la concentración final de ADNc por reacción fue de 4 ng/μL.

Análisis estadístico y expresión génica de ICAM3, PPM1A, RUNX3 y TNF

Se realizó el análisis descriptivo de los valores de Ct obtenidos en los ensayos de qPCR mediante el programa GraphPad en donde se obtuvo el valor del coeficiente de variación para determinar la variabilidad intraensayo.

El nivel de expresión de los genes ICAM3, PPM1A, RUNX3 y TNF en células THP-1 expuestas a los diferentes tratamientos fue determinado mediante el modelo matemático elaborado por Pfaffl (2001). Para el análisis, se tomó como gen de referencia a HPRT1, muestras de ADNc de células THP-1 no tratadas como calibrador y el valor de la eficiencia de amplificación (EA) de cada gen. Los radios de expresión de los genes target fueron calculados mediante las siguientes ecuaciones:

Ecuación 2.

$$\Delta Ct_{gen\ target\ (calibrador-muestra)} = (Ct_{gen\ target})_{calibrador} - (Ct_{gen\ target})_{muestra}$$

Ecuación 3.

$$\Delta Ct_{gen\ ref\ (calibrador-muestra)} = (Ct_{gen\ ref})_{calibrador} - (Ct_{gen\ ref})_{muestra}$$

Ecuación 4.

$$\text{Radio de expresión} = \frac{EA_{gen\ target}^{\Delta Ct_{gen\ target\ (calibrador-muestra)}}}{EA_{gen\ ref}^{\Delta Ct_{gen\ ref\ (calibrador-muestra)}}$$

Los radios de expresión se transformaron posteriormente a escala logarítmica en base 2 para equiparar las proporciones entre los genes que se expresan y los que se inhiben. Finalmente, se hizo un análisis de varianza ANOVA para comparar múltiples medias aplicando la prueba no paramétrica de Dunn, con ello se determinó si existen diferencias estadísticamente significativas entre la expresión de los diferentes tratamientos aplicados y en los diferentes días medidos, para ello se verificaron las hipótesis con un nivel de significancia del 5% ($\alpha = 0.05$).

Capítulo 3: Resultados

Sistema de cultivo celular dual

Se utilizó el sistema dual para el cultivo de las líneas celulares caco-2 y THP-1. Mediante visualización bajo el microscopio invertido, se observó la monocapa formada por las células caco-2 (Figura 5), así como las células THP-1 luego de haber sido expuestas a los diferentes tratamientos en los días 7, 14 y 21 del cultivo (

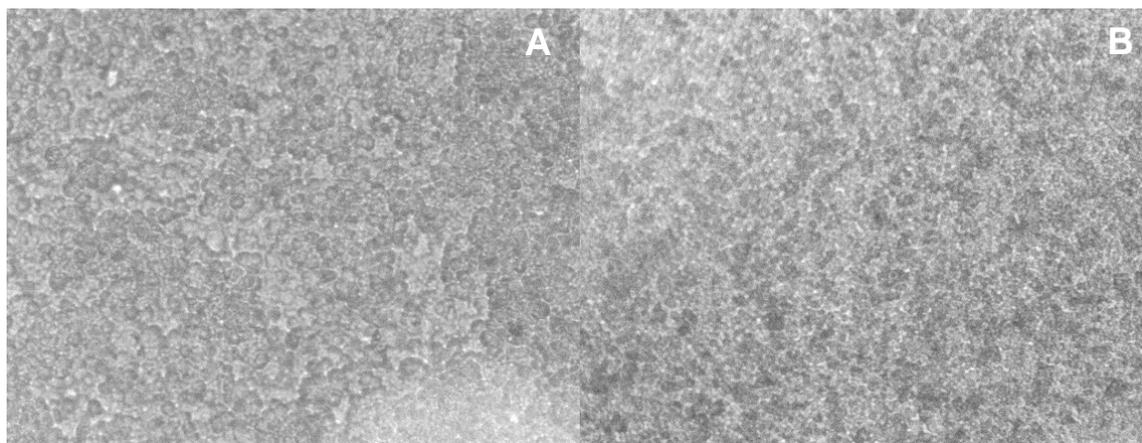
Figura 6).

Extracción de ARN

Para la estandarización de los ensayos de RT-PCR y qPCR se realizó la extracción de ARN a partir de células caco-2 sin tratamiento y de células THP-1 sin tratamiento. A continuación, se cuantificó el ARN extraído de ambas líneas celulares mediante el equipo Cytation 5. Los valores de concentración y de pureza (260/280 y 260/230) para cada muestra de ARN, se muestran en la Tabla 9.

Figura 5

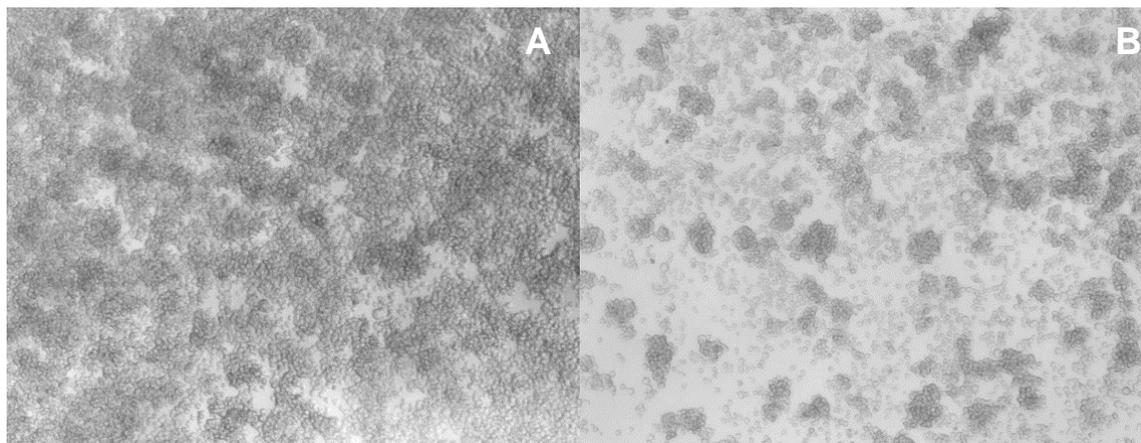
Monocapa formada por células caco-2 visualizadas bajo el microscopio invertido (4X)



Nota: Células luego de 14 días de cultivo. A: Células tratadas con butirato de sodio y LPS, B: células sin tratamiento

Figura 6

Células THP-1 cultivadas en la parte inferior del sistema dual visualizadas bajo el microscopio invertido (4x)



Nota: A: Células tratadas con butirato de sodio y LPS, B: células sin tratamiento

Tabla 9

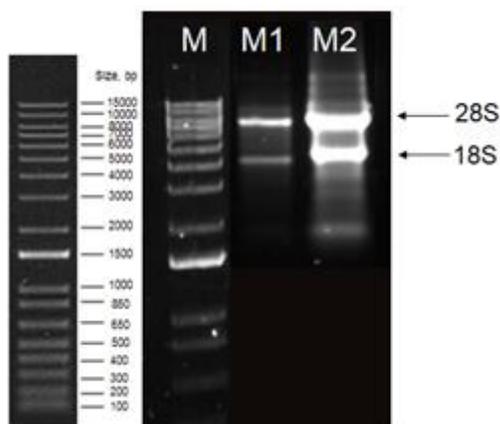
Cuantificación de ARN extraído a partir de células caco-2 y THP-1

| Línea celular | Concentración (ng/μL) | | | 260/280 | 260/230 |
|---------------|-----------------------|------------|----------|---------|---------|
| | Medición 1 | Medición 2 | Promedio | | |
| Caco-2 | 209.713 | 214.233 | 211.973 | 2.119 | 2.129 |
| THP-1 | 1306.270 | 1297.536 | 1301.906 | 2.035 | 2.136 |

Posteriormente, se evaluó la integridad del ARN mediante electroforesis con gel de agarosa al 1% como se observa en la Figura 7. Las muestras de ARN extraídas de ambas líneas celulares se encuentran íntegras, no hay degradación y presentan las bandas que corresponden a las subunidades ribosómicas 28S y 18S.

Figura 7

Evaluación cualitativa de ARN



Nota: Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con SYBR safe. (M): Marcador de peso molecular 1kb Plus (Invitrogen); (M1): ARN de células caco-2 y (M2): ARN de células THP-1.

Características de los primers utilizados

Se realizaron los alineamientos de los primers utilizados con sus respectivas secuencias utilizando el software Primer-BLAST, con ello se obtuvo la longitud en pares de bases (pb) de los productos amplificados. Estos datos, así como el porcentaje de GC y temperatura de melting se detallan en la Tabla 10.

Tabla 10

Características de los primers utilizados

| Número de acceso | Gen | | Secuencia 5' - 3' | Longitud (bases) | T _m (°C) | % GC | Longitud amplicon (pb) |
|------------------|------|---|-------------------------|------------------|---------------------|-------|------------------------|
| NM_003257.5 | ZO1 | F | CGGGACTGTTGGTATTGGCTAGA | 23 | 62.00 | 52.17 | 184 |
| | | R | GGCCAGGGCCATAGTAAAGTTTG | 23 | 61.75 | 52.17 | |
| NM_002538.4 | OCLN | F | TCCTATAAATCCACGCCGGTTC | 22 | 60.22 | 50.00 | 105 |
| | | R | CTCAAAGTTACCACCGCTGCTG | 22 | 62.01 | 54.55 | |
| NM_002644.4 | PIGR | F | GCTACGTCTCCAGCAAATATGC | 22 | 59.78 | 50.00 | 139 |

| | | | | | | | |
|----------------|-------|---|--------------------------|----|-------|-------|-----|
| | | R | CCTCGGCTATTGATGCCAG | 20 | 60.60 | 60.00 | |
| NM_000594.3 | TNF | F | CGAGTGACAAGCCTGTAGC | 19 | 58.26 | 57.89 | 215 |
| | | R | GGTGTGGGTGAGGAGCACAT | 20 | 62.13 | 60.00 | |
| | | | | | | | |
| NM_002162.5 | ICAM3 | F | CGAGTTCTTGACAGGAACA | 20 | 58.42 | 50.00 | 385 |
| | | R | CCTGAAGACGTACATTAAGGCC | 22 | 58.80 | 50.00 | |
| NM_021003.5 | PPM1A | F | ACTGATGACCTTGAGAAAGTTTGC | 24 | 59.72 | 41.67 | 198 |
| | | R | GCCTTCCCCCTGCTTCTTTA | 20 | 59.67 | 55.00 | |
| NM_001031680.2 | RUNX3 | F | AGCACCACAAGCCACTTCAG | 20 | 61.99 | 55.00 | 101 |
| | | R | GGGAAGGAGCGGTCAAACCTG | 20 | 57.53 | 60.00 | |
| NM_002046.7 | GAPDH | F | GAGTCAACGGATTTGGTCGT | 20 | 58.21 | 50.00 | 457 |
| | | R | GGTGCTAAGCAGTTGGTGGT | 20 | 60.54 | 55.00 | |
| NM_000194.3 | HPRT1 | F | CATTATGCTGAGGATTTGGAAAGG | 24 | 58.16 | 41.67 | 129 |
| | | R | CTTGAGCACACAGAGGGCTACA | 22 | 62.25 | 54.55 | |
| X00351.1 | ACTB | F | GCTCGTCGTCGACAACGGCTC | 21 | 66.03 | 66.67 | 353 |
| | | R | CAAACATGATCTGGGTCATCTT | 22 | 56.40 | 40.91 | |

Nota: F: Forward, R: Reverse

Estandarización de los sistemas de RT-PCR convencional

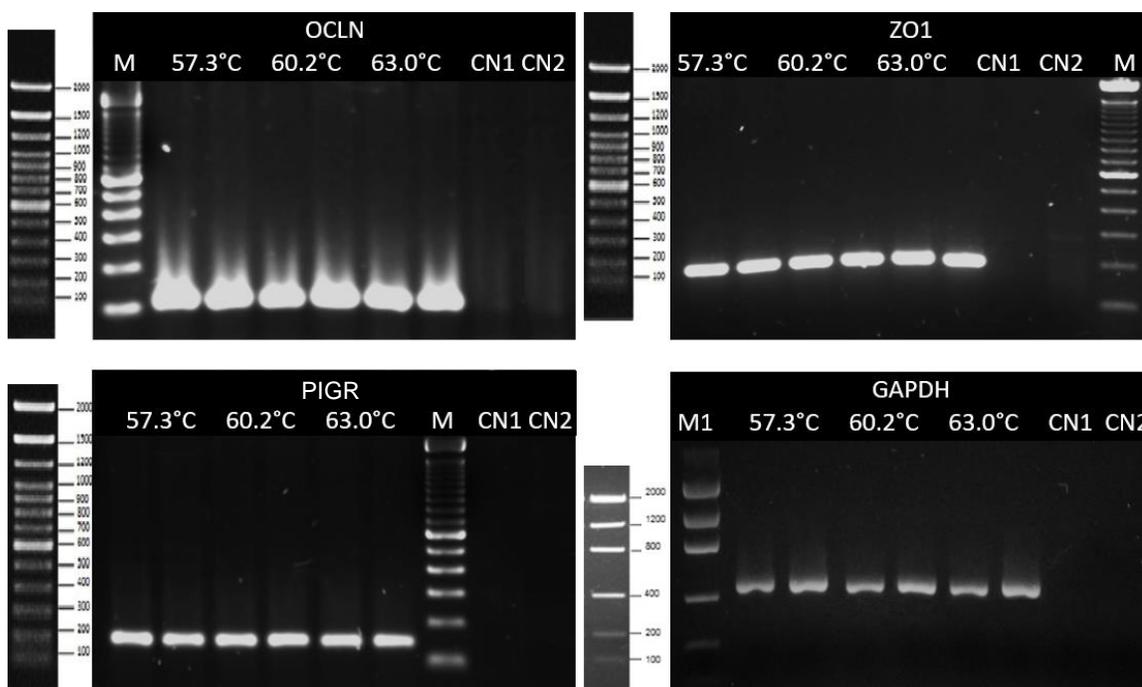
Luego de varios ensayos, se estandarizaron los sistemas de RT-PCR convencional para los genes a evaluar en células caco-2 y THP-1 como se describió anteriormente. En los ensayos realizados con gradiente de temperatura, se determinaron las condiciones óptimas para la amplificación de los genes en estudio como la concentración de primers, concentración de ARN y la temperatura de annealing.

Estandarización de sistemas de RT-PCR punto final en células caco-2

En las Figuras 8, 9, 10 y 11 se presentan los resultados de los ensayos de RT-PCR convencional con gradiente de temperatura para los genes ZO1, OCLN, PIGR y GAPDH. No se obtuvieron productos inespecíficos y los controles negativos (CN1 y CN2) no amplificaron. En los controles positivos se observan los fragmentados de interés de 105 pb, 184 pb, 139 pb y 457 pb para OCLN, ZO1, PIGR, y GAPDH, respectivamente.

Figura 8

Productos de RT-PCR convencional de los sistemas evaluados en células caco-2



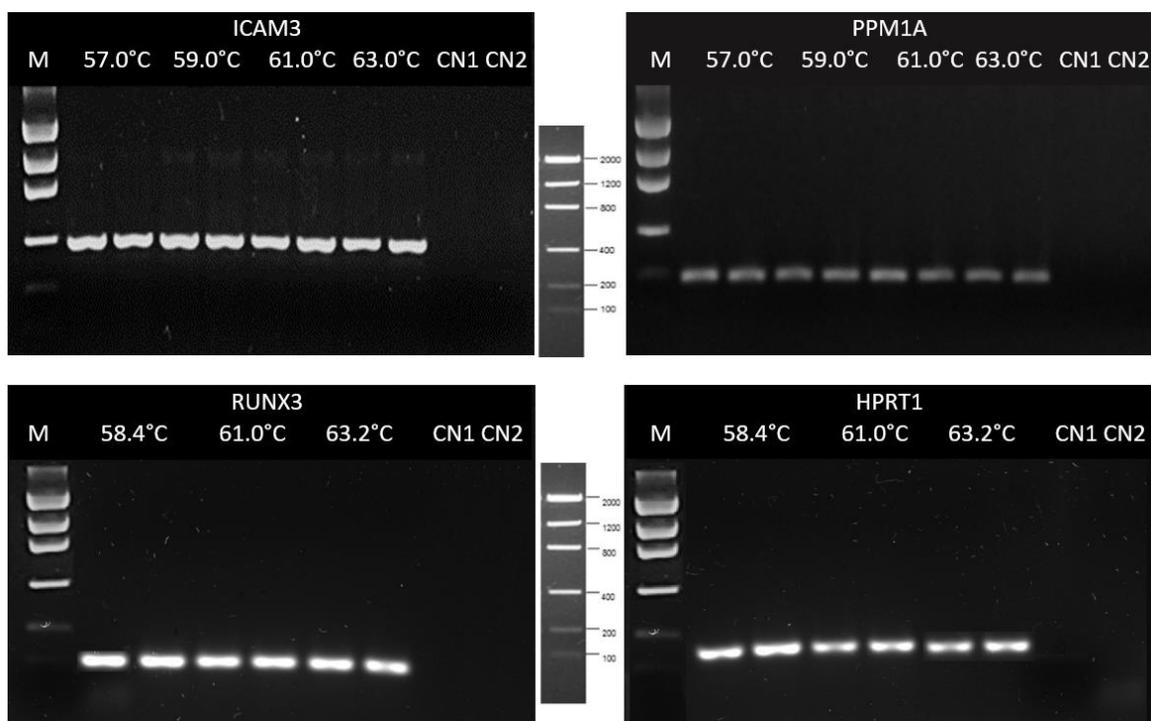
Nota: Electroforesis en gel de agarosa al 2%. OCLN: 105 pb, ZO1: 184 pb, PIGR: 139 pb y GAPDH: 457 pb. M: marcador de peso molecular TrackIt™ 100 bp DNA Ladder (Invitrogen); M1: marcador de peso molecular Low DNA Mass (Invitrogen). C1: control negativo sin ARN; C2: control negativo sin enzima retro transcriptasa.

Estandarización de sistemas de RT-PCR punto final en células THP-1

En las figuras 12, 13, 14 y 15 se muestran los resultados de los ensayos de RT-PCR convencional con gradiente de temperatura para los genes ICAM3, PPM1A, RUNX3 y HPRT1. No amplificaron los controles negativos (CN1 y CN2) y no se obtuvieron productos inespecíficos. Para los controles positivos se obtuvieron los fragmentos esperados de 385 pb, 198 pb, 101 pb y 129 pb para los sistemas ICAM3, PPM1A, RUNX3, y HPRT1, respectivamente.

Figura 9

Productos de RT-PCR convencional de los sistemas evaluados en células THP-1



Nota: Electroforesis en gel de agarosa al 2%. ICAM3: 385 pb, PPM1A: 198 pb, RUNX3: 101 pb y HPRT1: 129 pb M: marcador de peso molecular Low DNA Mass (Invitrogen); C1: control negativo sin ARN; C2: control negativo sin enzima retro transcriptasa.

Estandarización de PCR en tiempo real con SYBR® Green

En base a los resultados de los ensayos de RT-PCR convencional, en donde se determinaron las condiciones óptimas de amplificación, se estandarizaron los ensayos de RT-qPCR para cada uno de los genes en estudio en las líneas celulares caco-2 y THP-1.

Estandarización de sistemas de RT-qPCR en la línea celular caco-2

Las concentraciones de los reactivos utilizados y la programación del termociclador se especifican en las Tablas 3 y 4, respectivamente. Los valores de ciclo umbral Ct y las temperaturas de melting de los amplicones formados se detallan en la Tabla 11. A continuación, se muestran las figuras con las curvas de amplificación y de disociación obtenidas de los ensayos de cada sistema, en ellas se muestran los controles positivos en dupletas y un control negativo, el cual no presenta amplificación; además, las curvas y temperaturas de melting evidenciaron la ausencia de productos inespecíficos en todos los sistemas.

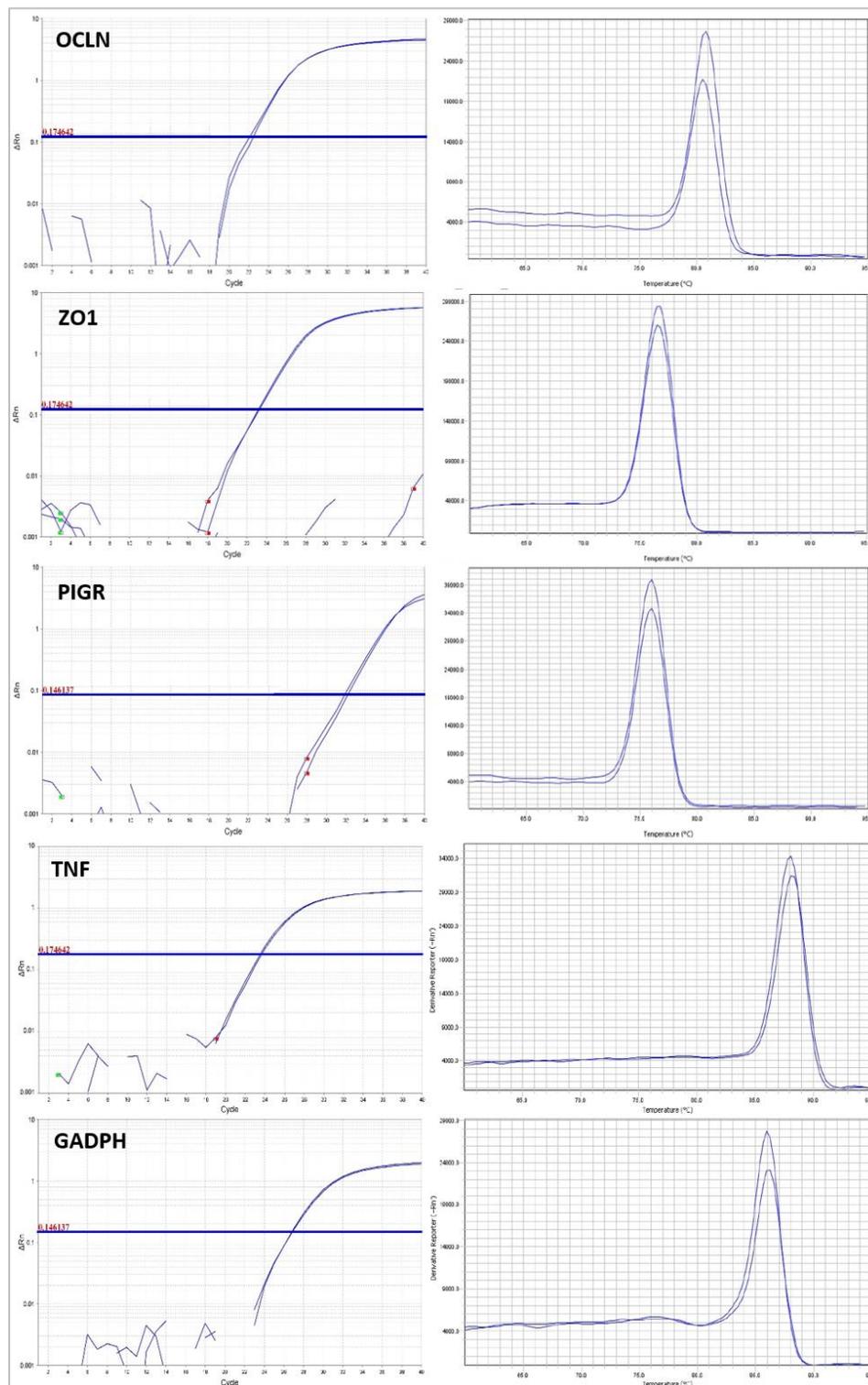
Tabla 11

Valores Ct y Tm para los sistemas ZO1, OCLN, PIGR, TNF y GAPDH

| Sistema | Ct | Ct | Ct promedio | Tm (°C) |
|----------------|-----------|-----------|--------------------|----------------|
| ZO1 | 23.34 | 23.43 | 23.39 | 76.61 |
| OCLN | 23.95 | 24.02 | 23.99 | 80.6 |
| PIGR | 34.95 | 34.45 | 34.70 | 77.81 |
| TNF | 23.42 | 23.60 | 23.51 | 88.22 |
| GAPDH | 26.83 | 26.77 | 26.80 | 86.08 |

Figura 10

Curvas de amplificación (izquierda) y de disociación (derecha) de los ensayos de qPCR de los sistemas evaluados en células caco-2



Estandarización de sistemas de RT-qPCR en la línea celular THP-1

Las concentraciones de los reactivos utilizados y la programación del termociclador se especifican en las Tablas 7 y 8, respectivamente. En la Tabla 12 se detallan los valores de Ct y las temperaturas de melting de los amplicones formados. Posteriormente, se muestran las figuras con las curvas de amplificación y de disociación de cada sistema, en las cuales se muestran los controles positivos en dupletas y un control negativo, el cual no presenta amplificación. Además, las curvas y temperaturas de melting evidenciaron la ausencia de productos inespecíficos en todos los sistemas.

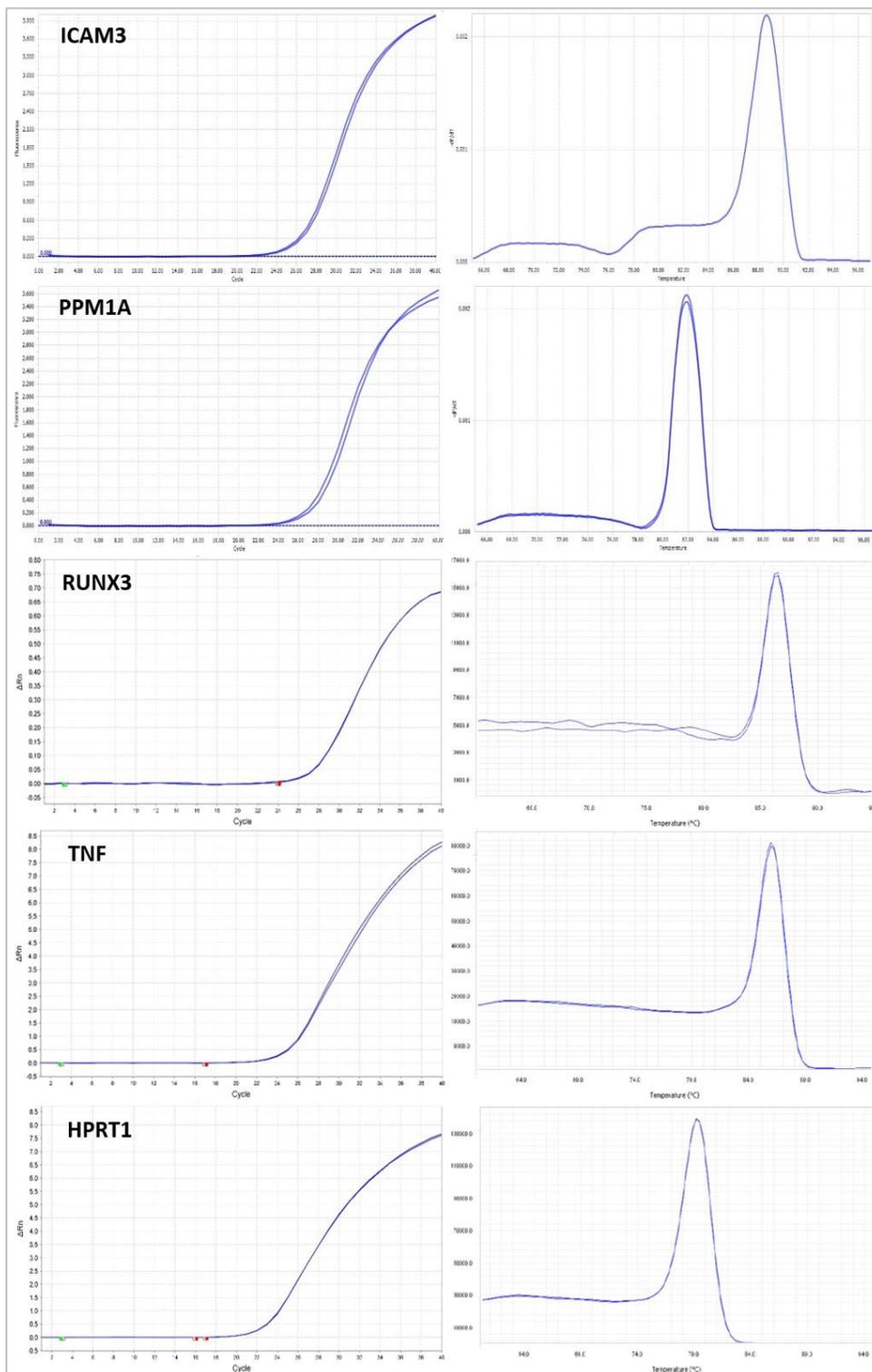
Tabla 12

Valores Ct y Tm para los sistemas ICAM3, PPM1A, RUNX3, TNF y HPRT1

| Sistema | Ct | Ct | Ct promedio | Tm (°C) |
|----------------|-----------|-----------|--------------------|----------------|
| ICAM3 | 24.91 | 24.6 | 24.76 | 88.75 |
| PPM1A | 25.69 | 25.37 | 25.53 | 81.71 |
| RUNX3 | 27.93 | 27.89 | 27.91 | 86.19 |
| TNF | 27.41 | 27.55 | 27.48 | 88.53 |
| HPRT1 | 25.32 | 23.28 | 24.30 | 80.71 |

Figura 11

Curvas de amplificación (izquierda) y de disociación (derecha) de los ensayos de qPCR de los sistemas evaluados en células THP-1



Estabilidad de genes de referencia

Se llevaron a cabo los ensayos de estabilidad de genes de referencia con el fin de identificar el gen de normalización óptimo que permita evaluar los sistemas de cada línea celular. Para ello, se aplicaron los procedimientos como se indica en el apartado descrito en materiales y métodos y los resultados obtenidos se analizaron con el software NormFinder. En las Tablas 13 y 14 se muestran los valores de Ct obtenidos de los ensayos de RT-qPCR realizados en la línea celular caco-2 y THP-1, respectivamente. Los ensayos se realizaron con controles positivos en triplicata (número de muestra), para cada tratamiento (grupo) al que fueron sometidos las células de las cuales se extrajo el ARN: 1) butirato y LPS, 2) LPS y 3) sin tratamiento.

Tabla 13

Valores de Ct de los genes de referencia candidatos en la línea celular caco-2

| Número de muestra | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 |
|-------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| ACTB | 28.547 | 27.949 | 27.830 | 28.369 | 28.072 | 28.748 | 28.349 | 28.060 | 27.952 |
| GAPDH | 35.506 | 35.757 | 35.478 | 35.378 | 34.677 | 35.183 | 33.280 | 33.517 | 33.322 |
| HPRT1 | 39.405 | 39.506 | 39.458 | 38.326 | 38.682 | 38.465 | 37.042 | 38.273 | 38.612 |
| Grupo | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 |

Tabla 14

Valores de Ct de los genes de referencia candidatos en la línea celular THP-1

| Número de muestra | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 |
|-------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| ACTB | 24.573 | 24.460 | 24.273 | 23.506 | 23.724 | 23.924 | 26.508 | 26.731 | 26.836 |
| GAPDH | 28.517 | 28.420 | 28.578 | 24.580 | 24.148 | 24.288 | 28.075 | 28.060 | 28.229 |
| HPRT1 | 29.232 | 28.794 | 29.253 | 27.228 | 27.163 | 27.112 | 31.273 | 31.398 | 31.236 |
| Grupo | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 |

En las tablas 15 y 16 se muestran los valores de variación intergrupala, error estándar y valor de estabilidad obtenidos por el software, lo cual determinó que el gen óptimo en la línea celular caco-2 es GAPDH, mientras que en células THP-1 es HPRT1.

Tabla 15

Resultados de NormFinder de los ensayos realizados en células caco-2

| Group identifier | Intergroup variation | | | Standard error | Stability value |
|------------------------|----------------------|--------|--------|----------------|-----------------|
| | 1 | 2 | 3 | | |
| ACTB | -0.042 | -0.021 | 0.046 | 0.031 | 0.027 |
| GAPDH | 0.016 | -0.004 | 0.012 | 0.014 | 0.016 |
| HPRT1 | -0.046 | 0.021 | -0.018 | 0.012 | 0.035 |
| Best gene | | | | | GAPDH |
| Stability value | | | | | 0.016 |

Tabla 16

Resultados de NormFinder de los ensayos realizados en células THP-1

| Group identifier | Intergroup variation | | | Standard error | Stability value |
|------------------------|----------------------|--------|--------|----------------|-----------------|
| | 1 | 2 | 3 | | |
| ACTB | -0.032 | 0.024 | 0.007 | 0.031 | 0.028 |
| GAPDH | 0.045 | -0.027 | -0.018 | 0.051 | 0.034 |
| HPRT1 | -0.014 | 0.003 | 0.010 | 0.009 | 0.014 |
| Best gene | | | | | HPRT1 |
| Stability value | | | | | 0.014 |

Sensibilidad analítica y eficiencia de amplificación

Sensibilidad analítica y eficiencia de amplificación de sistemas en la línea celular caco-2

Los ensayos de sensibilidad analítica de los sistemas de RT-qPCR de la línea celular caco-2, se realizaron conforme a lo detallado en la sección 0 de Materiales y métodos. En los sistemas de OCLN, ZO1 y PIGR las amplificaciones no fueron

consistentes y además presentaron amplificación en los controles negativos, por lo que no se continuaron con estos ensayos y se decidió optar por la adquisición de un nuevo stock de primers para cada gen mencionado. Para GAPDH se pudo determinar que es capaz de detectar y amplificar hasta una concentración de ARN de 0,005 ng/μL (5 pg/μL), correspondiente a la dilución 10^{-4} respecto a la concentración inicial de ARN. Las tablas y figuras de los resultados de GAPDH se muestran a continuación.

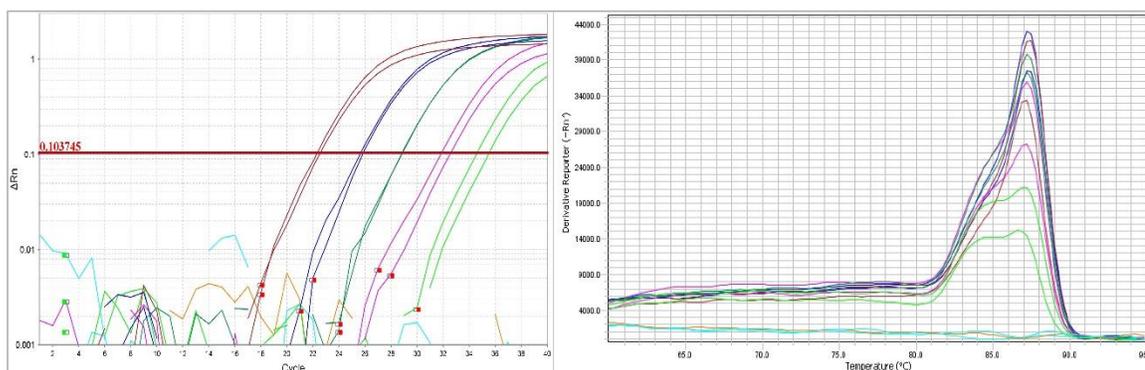
Tabla 17

Valores de Ct para el gen GAPDH

| Concentración de ARN (ng/μL) | Ct | Ct | Ct promedio |
|------------------------------|--------|--------|-------------|
| 50 | 22.560 | 22.314 | 22.437 |
| 5 | 25.869 | 25.684 | 25.777 |
| 0.5 | 28.880 | 28.847 | 28.863 |
| 0.05 | 31.897 | 32.579 | 32.238 |
| 0.005 | 35.499 | 34.610 | 35.054 |

Figura 12

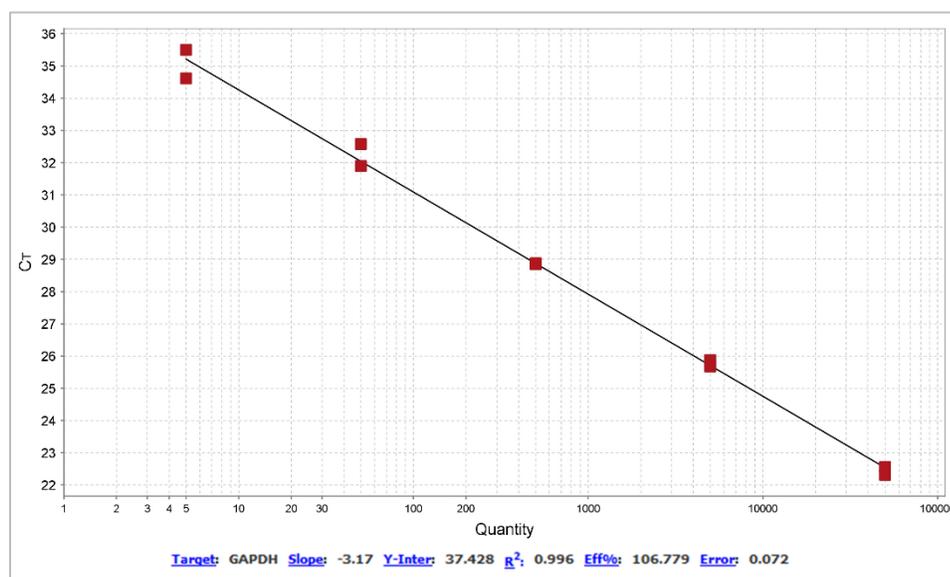
Curvas de amplificación (izquierda) y de disociación (derecha) del ensayo de sensibilidad analítica para el gen GAPDH.



La curva estándar y la eficiencia de amplificación de GAPDH se determinaron en base al ensayo de sensibilidad analítica, como se describe en la sección 0. La curva estándar se construyó en base a la concentración inicial (logaritmo en base 10 de la concentración de ARN) vs los valores de Ct. La eficiencia de amplificación (EA) se calculó a partir de la ecuación 3, para ello se utilizó el valor de la pendiente de la recta. A continuación, se presenta la gráfica de la curva estándar, con los valores de EA, el PEA y el coeficiente de determinación (R^2) para los sistemas GAPDH.

Figura 13

Curva estándar de la concentración de ARN inicial vs el valor de Ct promedio del gen GAPDH.



En la Tabla 18 se presentan los valores de EA, el PEA y el coeficiente de determinación (R^2) para GAPDH.

Tabla 18

EA y PEA para GAPDH

| Gen | Pendiente | R^2 | EA | PEA |
|-------|-----------|-------|-------|------|
| GAPDH | -3.17 | 0.996 | 2.067 | 106% |

Sensibilidad analítica y eficiencia de amplificación de sistemas en la línea celular

THP-1

De igual manera, se llevaron a cabo los ensayos de sensibilidad analítica para los sistemas de RT-qPCR de la línea celular. Se determinó que los sistemas ICAM3, PPM1A pueden detectar y amplificar hasta una concentración de ADNc de 5 pg/ μ L, RUNX3 y TNF hasta una concentración de ADNc de 0.125 ng/ μ L y HPRT1 hasta una concentración de ADNc de 0.3 ng/ μ L. A continuación, se presentan para cada sistema los valores de los Ct obtenidos y los gráficos de las curvas de amplificación, de disociación, así como de la curva estándar para determinar la pendiente de la recta de logaritmo en base 10 de la concentración de ADNc vs los valores de Ct.

Tabla 19

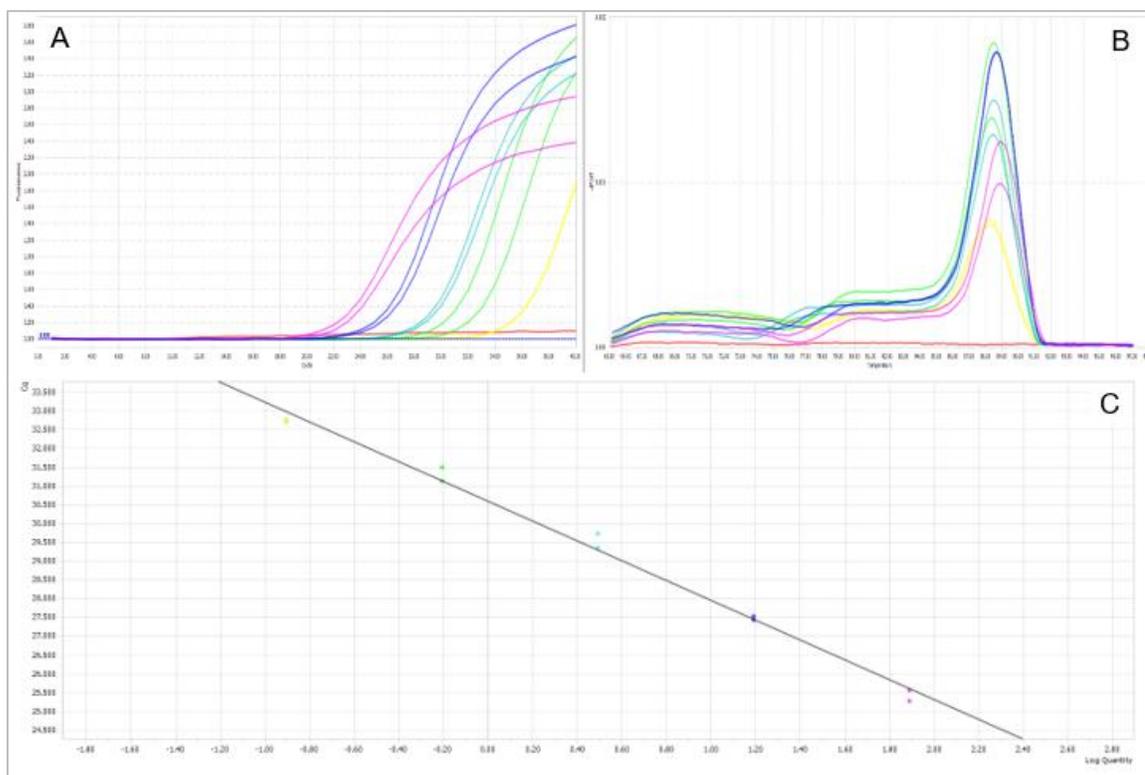
Valores de Ct para el gen ICAM3

| Concentración de ARN (ng/μL) | ICAM3 | | | PPM1A | | |
|--|--------------|-----------|--------------------|--------------|-----------|--------------------|
| | Ct | Ct | Ct promedio | Ct | Ct | Ct promedio |
| 50 | 22.95 | 22.29 | 22.62 | 25.48 | 23.90 | 24.69 |
| 5 | 25.00 | 25.48 | 25.24 | 27.08 | 26.69 | 26.89 |
| 0.5 | 28.48 | 28.79 | 28.64 | 30.63 | 30.47 | 30.55 |
| 0.05 | 31.99 | 31.99 | 31.08 | 33.11 | 33.67 | 33.39 |
| 0.005 | 35.15 | 25.17 | 30.16 | 37.11 | 37.15 | 37.13 |

Nota: Diluciones seriadas 1:10

Figura 14

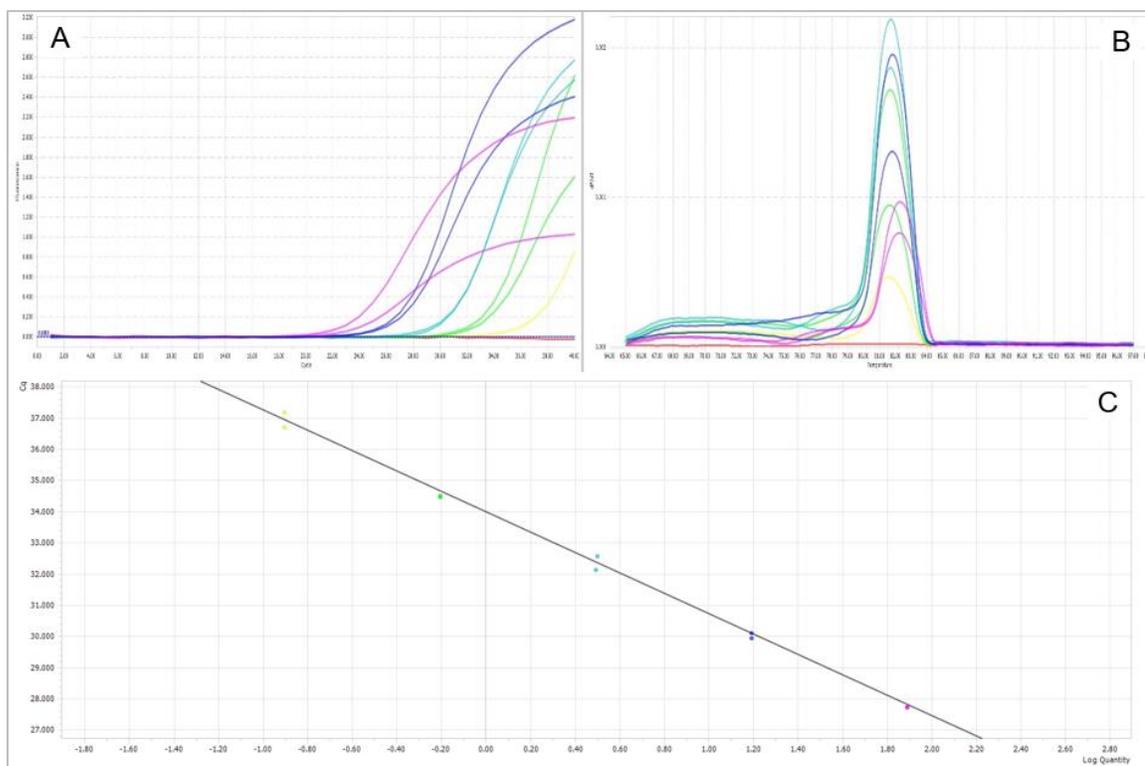
Ensayo de sensibilidad analítica del sistema ICAM3



Nota: A: Curvas de amplificación, B: curvas de disociación, C: gráfico de la recta Log 10 [ADNc] vs. Ct.

Figura 15

Ensayo de sensibilidad analítica del sistema PPM1A



Nota: A: Curvas de amplificación, B: curvas de disociación, C: gráfico de la recta Log 10 [ADNc] vs. Ct.

Tabla 20

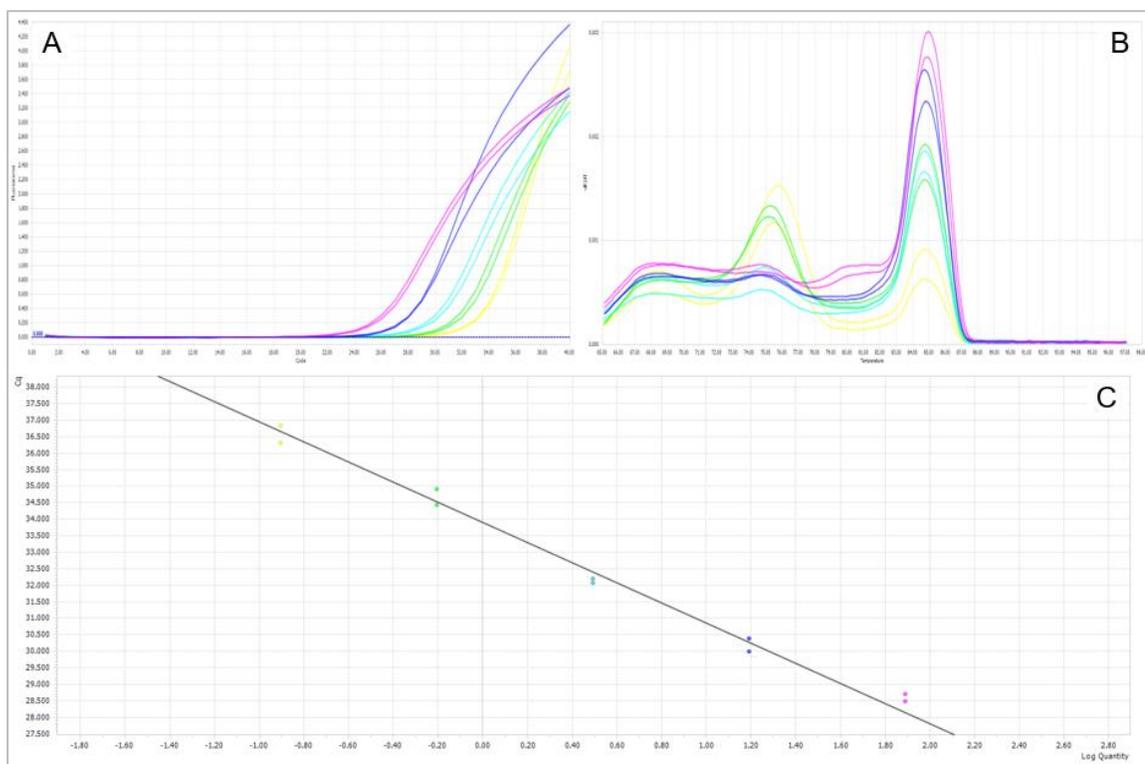
Valores de Ct para el gen RUNX3 y TNF

| Concentración de ARN (ng/μL) | RUNX3 | | | TNF | | |
|---------------------------------|-------|-------|-------------|-------|-------|-------------|
| | Ct | Ct | Ct promedio | Ct | Ct | Ct promedio |
| 78 | 28.69 | 28.47 | 28.58 | 27.73 | 27.73 | 27.73 |
| 15.6 | 30.37 | 29.77 | 29.93 | 29.94 | 30.10 | 30.02 |
| 3.12 | 32.19 | 32.05 | 35.02 | 32.13 | 31.55 | 31.84 |
| 0.624 | 34.91 | 34.67 | 36.75 | 36.17 | 36.22 | 36.19 |
| 0.125 | 36.80 | 37.31 | 39.77 | 37.17 | 36.08 | 36.62 |

Nota: Diluciones seriadas 1:5

Figura 16

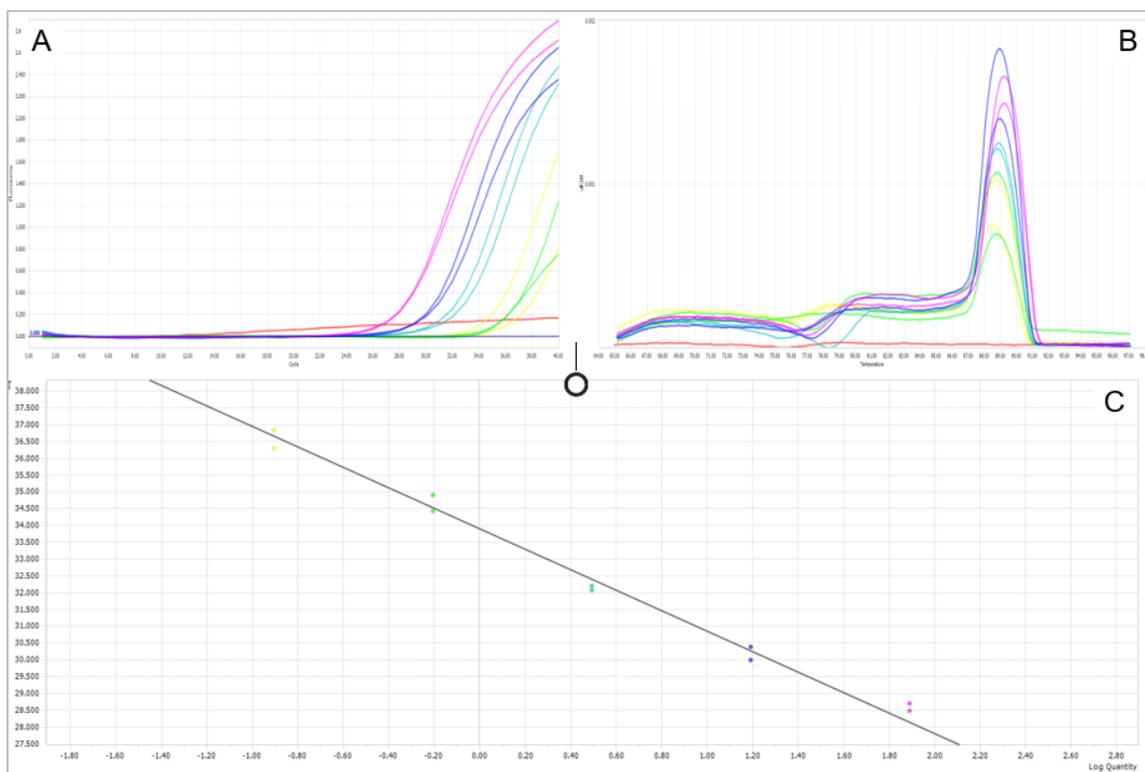
Ensayo de sensibilidad analítica del sistema RUNX3



Nota: A: Curvas de amplificación, B: curvas de disociación, C: gráfico de la recta \log_{10} [ADNc] vs. C_t .

Figura 17

Ensayo de sensibilidad analítica del sistema TNF



Nota: A: Curvas de amplificación, B: curvas de disociación, C: gráfico de la recta Log 10 [ADNc] vs. Ct.

Tabla 21

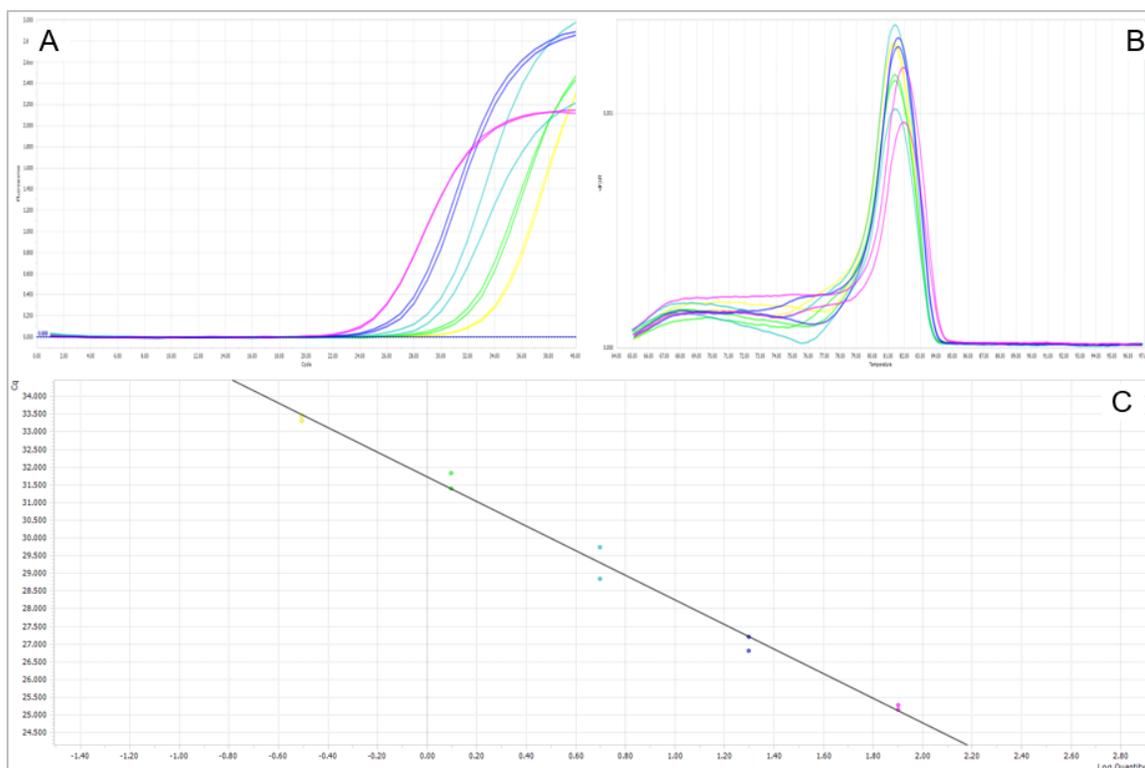
Valores de Ct para el gen HPRT1

| Concentración de ARN (ng/μL) | Ct | Ct | Ct promedio |
|------------------------------|---------|---------|-------------|
| 78 | 25.2600 | 25.1500 | 25.205 |
| 19.5 | 27.1900 | 26.8000 | 26.995 |
| 4.875 | 28.8400 | 29.7300 | 29.285 |
| 1.218 | 31.3900 | 31.8300 | 31.610 |
| 0.304 | 33.3000 | 33.4400 | 33.370 |

Nota: Diluciones seriadas 1:4

Figura 18

Ensayo de sensibilidad analítica del sistema HPRT1



Nota: A: Curvas de amplificación, B: curvas de disociación, C: gráfico de la recta Log 10 [ADNc] vs. Ct.

A continuación, se resume en la Tabla 22, los valores de EA, el PEA y el coeficiente de determinación (R^2) para todos los sistemas evaluados en células THP-1.

Tabla 22

EA y PEA para los sistemas ICAM3, PPM1A, RUNX3, TNF y HPRT1

| Gen | Pendiente | R^2 | EA | PEA | LOD |
|-------|-----------|-------|------|------|-------------------|
| ICAM3 | -3.18 | 0.98 | 2.06 | 106% | 0.005 ng/ μ L |
| PPM1A | -3.21 | 0.98 | 2.05 | 105% | 0.005 ng/ μ L |
| RUNX3 | -3.17 | 0.99 | 2.07 | 107% | 0.125 ng/ μ L |
| TNF | -3.42 | 0.98 | 1.96 | 96% | 0.125 ng/ μ L |
| HPRT1 | -3.47 | 0.99 | 1.94 | 94% | 0.300 ng/ μ L |

Extracción de ARN de células caco-2 expuestas a butirato y a lipopolisacárido

Se realizaron las extracciones de ARN a partir de células caco-2 tratadas con LPS en los días 7, 14 y 21 de cultivo, en presencia o ausencia de butirato. La cuantificación y evaluación de la calidad del ARN extraído se presentan en la Tabla 23 y Figura 19, respectivamente.

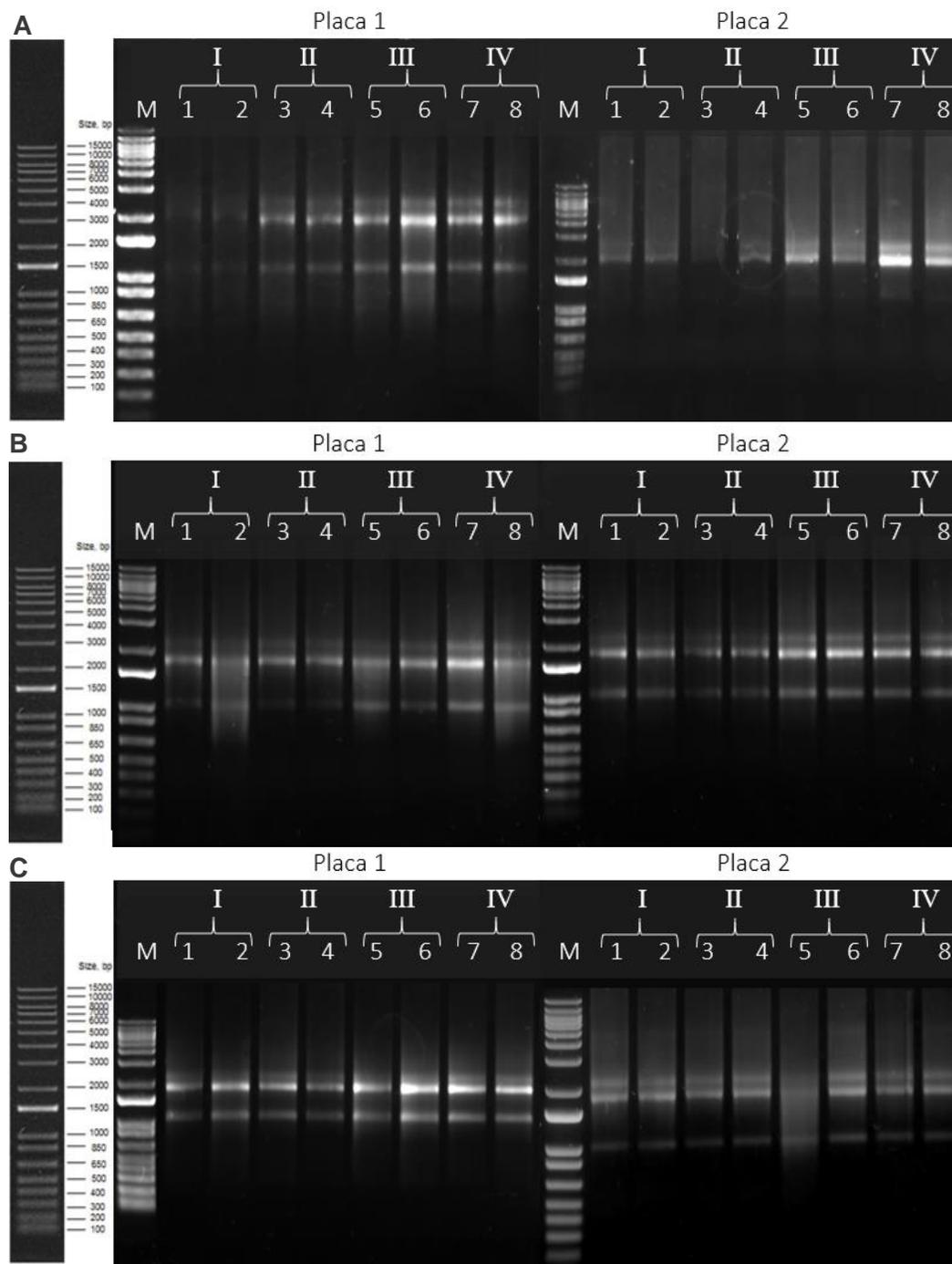
Tabla 23

Cuantificación de ARN extraído de células caco-2

| Día | Muestra | Tratamiento | Réplica 1 | | Réplica 2 | |
|--------|---------|----------------|--------------------------|---------|--------------------------|---------|
| | | | Concentración (ng/μL) | 260/280 | Concentración (ng/μL) | 260/280 |
| Día 7 | 1 | Butirato + LPS | 24.952 | 1.767 | 61.73 | 1.887 |
| Día 7 | 2 | Butirato + LPS | 35.58 | 1.801 | 73.97 | 1.889 |
| Día 7 | 3 | Butirato | 58.585 | 2.029 | 35.036 | 1.745 |
| Día 7 | 4 | Butirato | 47.186 | 2.017 | 41.965 | 1.77 |
| Día 7 | 5 | LPS | 55.668 | 1.939 | 75.129 | 1.838 |
| Día 7 | 6 | LPS | 61.58 | 1.99 | 67.893 | 1.847 |
| Día 7 | 7 | Control | 54.046 | 2.026 | 70.654 | 1.864 |
| Día 7 | 8 | Control | 48.23 | 1.984 | 91.054 | 1.848 |
| Día 14 | 1 | Butirato + LPS | 82.396 | 1.917 | 64.952 | 1.913 |
| Día 14 | 2 | Butirato + LPS | 118.868 | 1.97 | 105.121 | 1.944 |
| Día 14 | 3 | Butirato | 75.737 | 1.917 | 68.298 | 1.918 |
| Día 14 | 4 | Butirato | 75.846 | 1.909 | 50.28 | 1.935 |
| Día 14 | 5 | LPS | 105.028 | 1.93 | 116.383 | 2.019 |
| Día 14 | 6 | LPS | 77.885 | 1.947 | 102.866 | 1.959 |
| Día 14 | 7 | Control | 118.196 | 1.958 | 98.413 | 2.199 |
| Día 14 | 8 | Control | 137.884 | 1.949 | 88.059 | 2.152 |
| Día 21 | 1 | Butirato + LPS | 63.337 | 2.041 | 70.379 | 2.039 |
| Día 21 | 2 | Butirato + LPS | 76.203 | 1.957 | 53.177 | 2.037 |
| Día 21 | 3 | Butirato | 64.945 | 2.028 | 56.62 | 2.023 |
| Día 21 | 4 | Butirato | 54.96 | 1.902 | 76.078 | 2.106 |
| Día 21 | 5 | LPS | 105.716 | 2.077 | 91.875 | 2.093 |
| Día 21 | 6 | LPS | 103.369 | 2.027 | 85.631 | 1.999 |
| Día 21 | 7 | Control | 88.54 | 2.059 | 104.026 | 2.033 |
| Día 21 | 8 | Control | 94.321 | 2.199 | 99.533 | 1.993 |

Figura 19

Evaluación de la integridad de ARN de células *caco-2*



Nota: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de muestras extraídas 24 h después de la exposición a los tratamientos I) butirato + LPS, II) butirato, III) LPS y IV) control. (M): Marcador de peso molecular 1kb Plus (Invitrogen). A: día 7, B: día 14 y C: día 21.

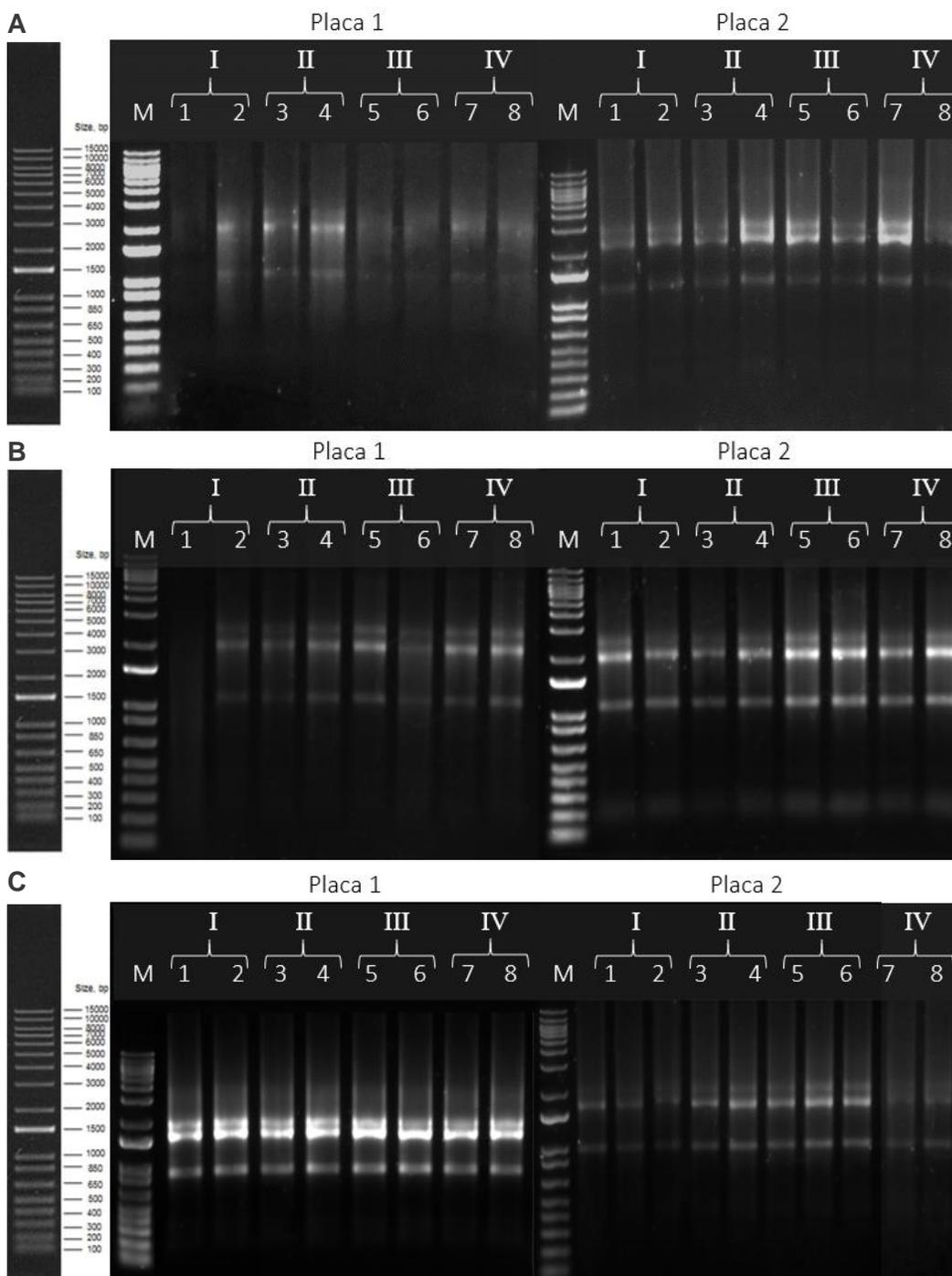
Evaluación de los niveles de expresión de ICAM3, PPM1A, RUNX3 y TNF en células THP-1 expuestas a butirato y a lipopolisacárido

Células THP-1 fueron cultivadas en el sistema de cultivo dual, debajo de las células caco-2 que fueron tratadas con LPS en los días 7, 14 y 21 de cultivo. La cuantificación y evaluación de la calidad del ARN extraído se presentan a continuación.

Tabla 24

Cuantificación de ARN extraído de células THP-1

| Día | Muestra | Tratamiento | Réplica 1 | | Réplica 2 | |
|--------|---------|----------------|--------------------------|---------|--------------------------|---------|
| | | | Concentración (ng/μL) | 260/280 | Concentración (ng/μL) | 260/280 |
| Día 7 | 1 | Butirato + LPS | 23.421 | 1.724 | 70.264 | 1.814 |
| Día 7 | 2 | Butirato + LPS | 73.854 | 1.871 | 65.460 | 1.860 |
| Día 7 | 3 | Butirato | 47.10 | 1.924 | 64.752 | 1.822 |
| Día 7 | 4 | Butirato | 55.308 | 1.889 | 81.996 | 1.840 |
| Día 7 | 5 | LPS | 40.298 | 1.927 | 70.656 | 1.837 |
| Día 7 | 6 | LPS | 43.145 | 1.782 | 52.517 | 1.775 |
| Día 7 | 7 | Control | 35.463 | 1.645 | 70.306 | 1.876 |
| Día 7 | 8 | Control | 37.34 | 1.781 | 46.752 | 1.866 |
| Día 14 | 1 | Butirato + LPS | 88.996 | 1.865 | 112.782 | 1.953 |
| Día 14 | 2 | Butirato + LPS | 123.104 | 1.925 | 113.246 | 1.889 |
| Día 14 | 3 | Butirato | 130.777 | 1.888 | 74.581 | 1.895 |
| Día 14 | 4 | Butirato | 134.171 | 1.872 | 71.746 | 1.879 |
| Día 14 | 5 | LPS | 114.127 | 1.935 | 115.198 | 1.953 |
| Día 14 | 6 | LPS | 156.352 | 1.806 | 105.538 | 1.993 |
| Día 14 | 7 | Control | 107.588 | 1.854 | 66.860 | 1.887 |
| Día 14 | 8 | Control | 99.922 | 1.871 | 149.242 | 2.324 |
| Día 21 | 1 | Butirato + LPS | 185.075 | 2.040 | 82.970 | 1.931 |
| Día 21 | 2 | Butirato + LPS | 116.211 | 2.060 | 77.320 | 1.875 |
| Día 21 | 3 | Butirato | 60.590 | 1.963 | 63.750 | 1.848 |
| Día 21 | 4 | Butirato | 79.366 | 2.122 | 85.090 | 1.879 |
| Día 21 | 5 | LPS | 183.674 | 2.028 | 88.396 | 1.922 |
| Día 21 | 6 | LPS | 199.303 | 2.041 | 90.627 | 1.895 |
| Día 21 | 7 | Control | 113.821 | 2.126 | 85.792 | 1.867 |
| Día 21 | 8 | Control | 153.403 | 1.977 | 101.128 | 2.046 |

Figura 20*Evaluación de la integridad de ARN de células THP-1*

Nota: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de muestras extraídas 24 h después de la exposición a los tratamientos I) butirato + LPS, II) butirato, III) LPS y IV) control. (M): Marcador de peso molecular 1kb Plus (Invitrogen). A: día 7, B: día 14 y C: día 21.

Ensayos de qPCR con SYBR® Green

Una vez extraídas las muestras de ARN de células THP-1, se sintetizó ADNc. Para la evaluación de los sistemas de qPCR se seleccionaron 2 muestras, por cada tratamiento y para cada día de exposición a los tratamientos, es decir, 8 muestras, del día 7, 14 y 21 de cultivo, por lo que en total se realizaron 3 ensayos. Algunas de los dupletas no amplificaron por lo que tuvo que repetirse la corrida para esas muestras, por ello se observan 5 puntos. Los valores de Ct obtenidos se muestran en la Tabla 25, mientras que las curvas de amplificación y disociación se muestran en las Figuras 21, 22 y 23.

Tabla 25

Valores de Ct de los ensayos de qPCR de sistemas evaluados en células THP-1

| Día | Tratamiento | Repetición | ICAM3 | PPM1A | RUNX3 | TNF | HPRT1 |
|---------|----------------|------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Día 7 | Butirato + LPS | 1 | 31.22 | 28.3 | 28.58 | 26.73 | 26.16 |
| | | 2 | 31.11 | 28.66 | 28.58 | 26.67 | 26.22 |
| | | 1 | 30.91 | 27.61 | 29.25 | 26.18 | 25.71 |
| | | 2 | 30.82 | 27.91 | 28.54 | 25.79 | 25.91 |
| | | 3 | | | 28.55 | | |
| | Butirato | 1 | 24.54 | 25.75 | 27.5 | 28.89 | 23.78 |
| | | 2 | 24.43 | 25.7 | 28.06 | 29.54 | 23.83 |
| | | 1 | 24.4 | 25.77 | 28.81 | 29.33 | 23.7 |
| | | 2 | 24.26 | 25.88 | 28.9 | 29.49 | 23.89 |
| | | 3 | 24.41 | | | | |
| | LPS | 1 | 25.43 | 26.06 | 26.87 | 24.78 | 23.37 |
| | | 2 | 25.77 | 26.23 | 26.95 | 24.9 | 23.48 |
| | | 1 | 25.17 | 26.37 | 26.87 | 24.92 | 23.38 |
| | | 2 | 25.29 | 26.22 | 26.72 | 24.77 | 23.67 |
| | | 3 | 25.29 | | | | |
| Control | 1 | 24.19 | 25.88 | 28.14 | 29.94 | 23.78 | |
| | 2 | 24.19 | 26.19 | 28.54 | 29.7 | 23.67 | |
| | 1 | 24.28 | 26.34 | 27.89 | 29.85 | 23.96 | |
| | 2 | 24.36 | 26.21 | 28.37 | 29.55 | 23.93 | |

| Día | Tratamiento | Repetición | ICAM3 | PPM1A | RUNX3 | TNF | HPRT1 |
|--------|----------------|------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Día 14 | Butirato + LPS | 1 | 27.27 | 27.82 | 30.04 | 25.68 | 25.44 |
| | | 2 | 27.27 | 27.94 | 29.85 | 25.98 | 25.73 |
| | | 1 | 27.3 | 27.74 | 29.87 | 25.4 | 25.32 |
| | | 2 | 27.22 | 27.85 | 30.2 | 25.83 | 25.27 |
| | | 3 | 26.78 | | | | |
| | Butirato | 1 | 25.46 | 27.1 | 29.22 | 30.25 | 25.43 |
| | | 2 | 25.66 | 27.02 | 29.56 | 30.25 | 25.09 |
| | | 1 | 25.45 | 27.12 | 29.26 | 29.98 | 24.86 |
| | | 2 | 25.89 | 27.19 | 29.61 | 30.36 | 24.87 |
| | LPS | 1 | 25.58 | 26.72 | 28.35 | 26.25 | 23.8 |
| | | 2 | 25.63 | 26.76 | 28.97 | 26.37 | 24 |
| | | 1 | 24.77 | 26.7 | 28.47 | 26.22 | 23.91 |
| | | 2 | 25.83 | 26.81 | 28.58 | 26.51 | 24.05 |
| | Control | 1 | 26.42 | 27.58 | 30.17 | 31.22 | 25.48 |
| | | 2 | 26.67 | 27.97 | 30.67 | 31.42 | 25.37 |
| | | 1 | 26.4 | 27.98 | 30.63 | 31.2 | 25.56 |
| 2 | | 26.69 | 27.93 | 30.22 | 31.36 | 25.59 | |
| Día 21 | Butirato + LPS | 1 | 26.42 | 27.79 | 29.37 | 25.68 | 25.66 |
| | | 2 | 26.34 | 27.1 | 28.78 | 25.32 | 25.07 |
| | | 1 | 26.56 | 27.77 | 29.09 | 25.73 | 25.97 |
| | | 2 | 26.45 | 27.35 | 29.03 | 25.24 | 26.42 |
| | | 3 | 26.78 | | | 25.74 | |
| | Butirato | 1 | 27.73 | 27.11 | 29.4 | 28.81 | 26.25 |
| | | 2 | 27.92 | 26.92 | 29.37 | 29.17 | 26.06 |
| | | 1 | 26.88 | 27.02 | 27.89 | 29.04 | 26.49 |
| | | 2 | 26.99 | 27 | 27.91 | 29.13 | 25.46 |
| | LPS | 1 | 26.88 | 27.73 | 28.7 | 27.55 | 24.44 |
| | | 2 | 26.61 | 27.16 | 28.79 | 27.9 | 24.55 |
| | | 1 | 26.88 | 26.94 | 28.94 | 27.24 | 24.45 |
| | | 2 | 26.55 | 27.32 | 28.81 | 27.55 | 24.75 |
| | Control | 1 | 27.89 | 28.94 | 30.33 | 30.82 | 26.53 |
| | | 2 | 28.11 | 27.98 | 29.84 | 31.74 | 26.48 |
| | | 1 | 28.37 | 27.66 | 29.96 | 31.63 | 26.16 |
| 2 | | 28.11 | 27.71 | 30.03 | 31.32 | 26.41 | |
| | | | | 30.42 | 26.76 | | |

Figura 21

Curvas de amplificación (izquierda) y de disociación (derecha) de los sistemas evaluados en células THP-1, luego de la exposición a LPS en el día 7

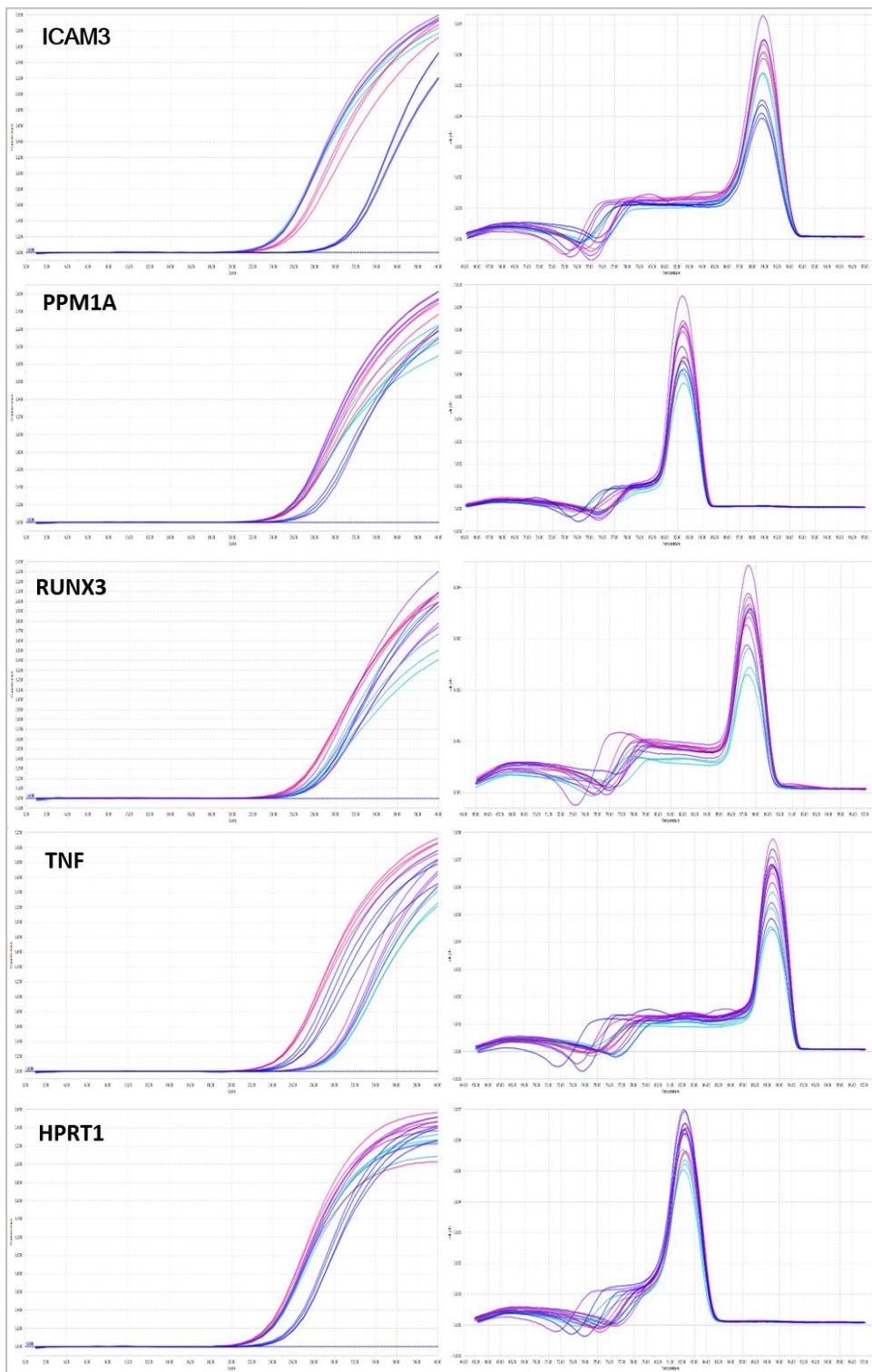


Figura 22

Curvas de amplificación (izquierda) y de disociación (derecha) de los sistemas evaluados en células THP-1 luego de la exposición a LPS en el día 14

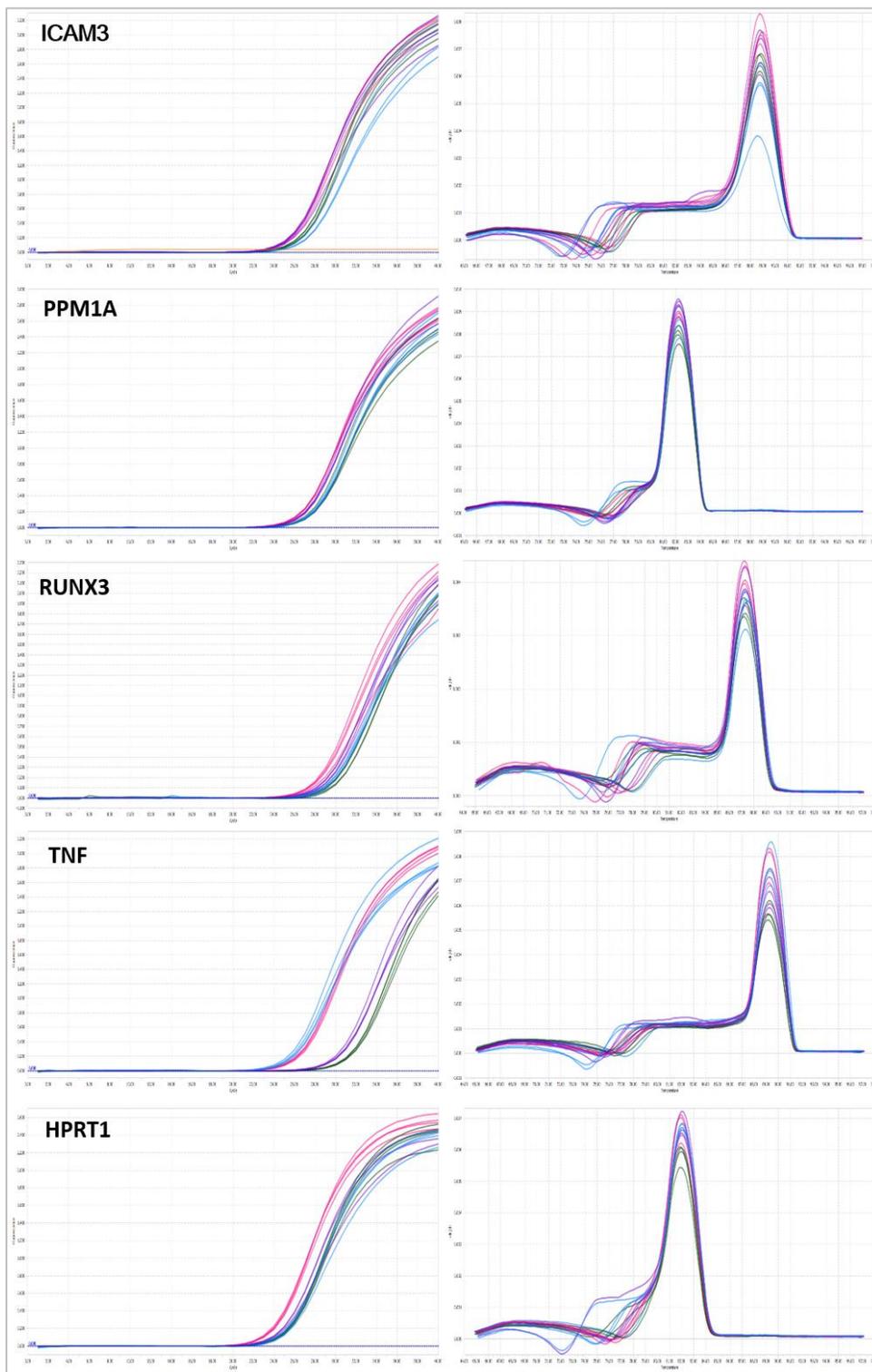
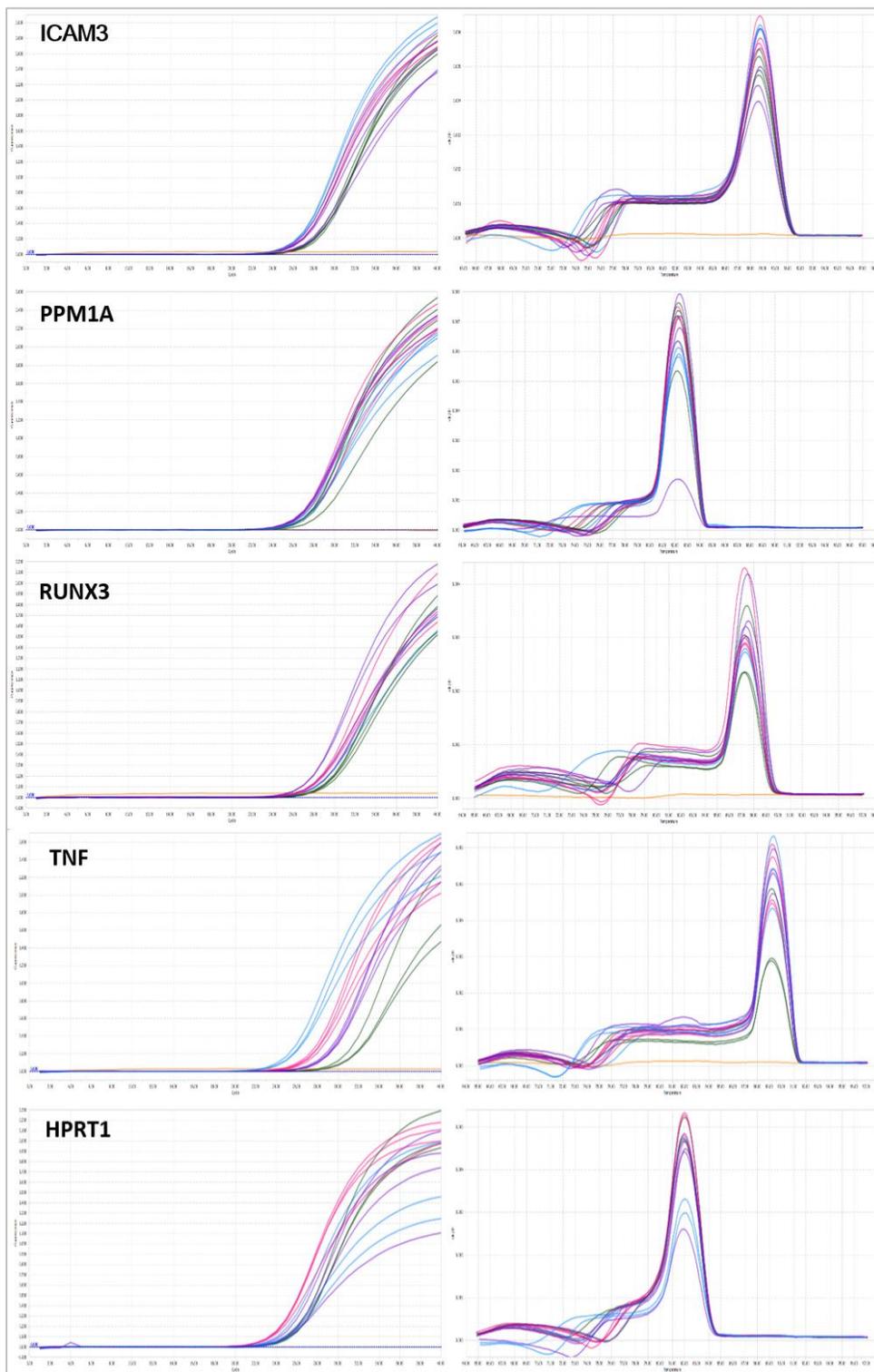


Figura 23

Curvas de amplificación (izquierda) y de disociación (derecha) de los sistemas evaluados en células THP-1 luego de la exposición a LPS en el día 7



Análisis estadístico y expresión génica

La variación intraensayo se calculó mediante el coeficiente de variación entre 4 réplicas correspondientes a cada día y cada tratamiento aplicado. Los CV para cada sistema junto con la estadística descriptiva para cada grupo de muestras se presentan en la Tabla 26. El CV más alto que se detectó entre todos los genes fue del tratamiento con butirato día 21 para RUNX3, con un valor de 2.99%, lo que demuestra la repetibilidad de las reacciones.

Tabla 26

Estadística descriptivos de los valores de Ct obtenidos para cada sistema

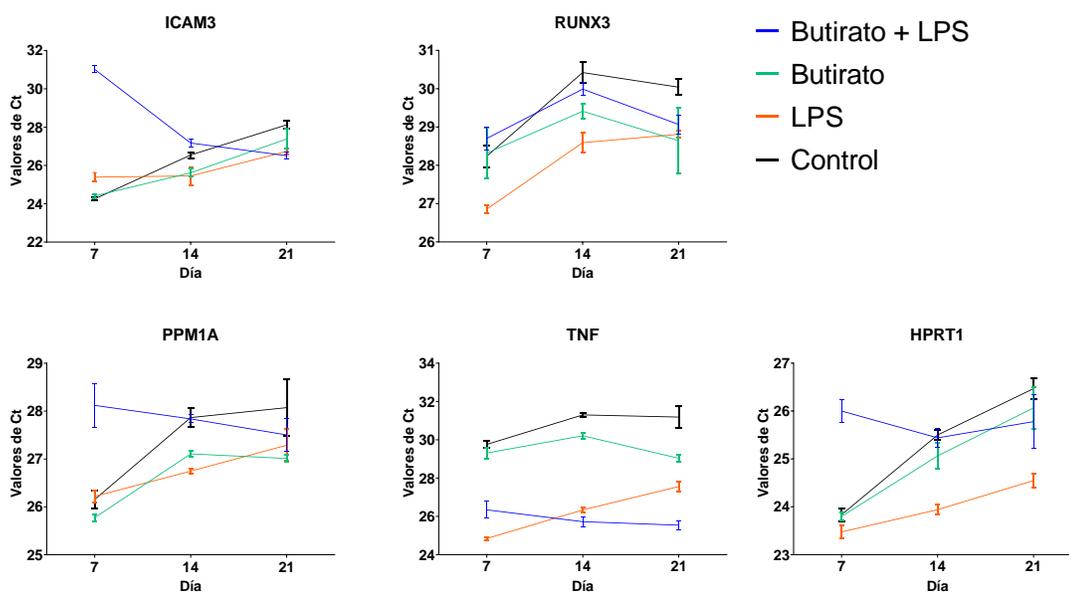
| Día | Tratamiento | Gen | Media | Mediana | DE | CV |
|------------|--------------------|------------|--------------|----------------|-----------|-----------|
| 7 | Butirato + LPS | ICAM3 | 31.02 | 31.01 | 0.18 | 0.59 |
| 14 | Butirato + LPS | ICAM3 | 27.17 | 27.27 | 0.22 | 0.81 |
| 21 | Butirato + LPS | ICAM3 | 26.51 | 26.45 | 0.17 | 0.64 |
| 7 | Butirato | ICAM3 | 24.41 | 24.41 | 0.10 | 0.41 |
| 14 | Butirato | ICAM3 | 25.62 | 25.56 | 0.21 | 0.81 |
| 21 | Butirato | ICAM3 | 27.38 | 27.36 | 0.52 | 1.91 |
| 7 | LPS | ICAM3 | 25.39 | 25.29 | 0.23 | 0.91 |
| 14 | LPS | ICAM3 | 25.45 | 25.61 | 0.47 | 1.84 |
| 21 | LPS | ICAM3 | 26.73 | 26.75 | 0.17 | 0.65 |
| 7 | Control | ICAM3 | 24.26 | 24.24 | 0.08 | 0.34 |
| 14 | Control | ICAM3 | 26.55 | 26.55 | 0.16 | 0.59 |
| 21 | Control | ICAM3 | 28.12 | 28.11 | 0.20 | 0.70 |
| 7 | Butirato + LPS | PPM1A | 28.12 | 28.11 | 0.46 | 1.63 |
| 14 | Butirato + LPS | PPM1A | 27.84 | 27.84 | 0.08 | 0.30 |
| 21 | Butirato + LPS | PPM1A | 27.50 | 27.56 | 0.34 | 1.22 |
| 7 | Butirato | PPM1A | 25.78 | 25.76 | 0.08 | 0.29 |
| 14 | Butirato | PPM1A | 27.11 | 27.11 | 0.07 | 0.26 |
| 21 | Butirato | PPM1A | 27.01 | 27.01 | 0.08 | 0.29 |
| 7 | LPS | PPM1A | 26.22 | 26.23 | 0.13 | 0.48 |
| 14 | LPS | PPM1A | 26.75 | 26.74 | 0.05 | 0.18 |
| 21 | LPS | PPM1A | 27.29 | 27.24 | 0.33 | 1.22 |
| 7 | Control | PPM1A | 26.16 | 26.20 | 0.20 | 0.75 |
| 14 | Control | PPM1A | 27.87 | 27.95 | 0.19 | 0.69 |

| Día | Tratamiento | Gen | Media | Mediana | DE | CV |
|------------|--------------------|------------|--------------|----------------|-----------|-----------|
| 21 | Control | PPM1A | 28.07 | 27.85 | 0.60 | 2.12 |
| 7 | Butirato + LPS | RUNX3 | 28.70 | 28.58 | 0.31 | 1.07 |
| 14 | Butirato + LPS | RUNX3 | 29.99 | 29.96 | 0.16 | 0.55 |
| 21 | Butirato + LPS | RUNX3 | 29.07 | 29.06 | 0.24 | 0.83 |
| 7 | Butirato | RUNX3 | 28.32 | 28.44 | 0.66 | 2.34 |
| 14 | Butirato | RUNX3 | 29.41 | 29.41 | 0.20 | 0.68 |
| 21 | Butirato | RUNX3 | 28.64 | 28.64 | 0.86 | 2.99 |
| 7 | LPS | RUNX3 | 26.85 | 26.87 | 0.10 | 0.36 |
| 14 | LPS | RUNX3 | 28.59 | 28.53 | 0.27 | 0.94 |
| 21 | LPS | RUNX3 | 28.81 | 28.80 | 0.10 | 0.34 |
| 7 | Control | RUNX3 | 28.24 | 28.26 | 0.28 | 1.00 |
| 14 | Control | RUNX3 | 30.42 | 30.43 | 0.26 | 0.87 |
| 21 | Control | RUNX3 | 30.04 | 30.00 | 0.21 | 0.69 |
| 7 | Butirato + LPS | TNF | 26.34 | 26.43 | 0.44 | 1.68 |
| 14 | Butirato + LPS | TNF | 25.72 | 25.76 | 0.25 | 0.96 |
| 21 | Butirato + LPS | TNF | 25.54 | 25.68 | 0.24 | 0.95 |
| 7 | Butirato | TNF | 29.31 | 29.41 | 0.30 | 1.01 |
| 14 | Butirato | TNF | 30.21 | 30.25 | 0.16 | 0.54 |
| 21 | Butirato | TNF | 29.04 | 29.09 | 0.16 | 0.55 |
| 7 | LPS | TNF | 24.84 | 24.84 | 0.08 | 0.32 |
| 14 | LPS | TNF | 26.34 | 26.31 | 0.13 | 0.50 |
| 21 | LPS | TNF | 27.56 | 27.55 | 0.27 | 0.98 |
| 7 | Control | TNF | 29.76 | 29.78 | 0.17 | 0.58 |
| 14 | Control | TNF | 31.30 | 31.29 | 0.11 | 0.34 |
| 21 | Control | TNF | 31.19 | 31.32 | 0.56 | 1.79 |
| 7 | Butirato + LPS | HPRT1 | 26.00 | 26.04 | 0.24 | 0.91 |
| 14 | Butirato + LPS | HPRT1 | 25.44 | 25.38 | 0.21 | 0.81 |
| 21 | Butirato + LPS | HPRT1 | 25.78 | 25.82 | 0.57 | 2.20 |
| 7 | Butirato | HPRT1 | 23.80 | 23.81 | 0.08 | 0.34 |
| 14 | Butirato | HPRT1 | 25.06 | 24.98 | 0.27 | 1.07 |
| 21 | Butirato | HPRT1 | 26.07 | 26.16 | 0.44 | 1.69 |
| 7 | LPS | HPRT1 | 23.48 | 23.43 | 0.14 | 0.59 |
| 14 | LPS | HPRT1 | 23.94 | 23.96 | 0.11 | 0.46 |
| 21 | LPS | HPRT1 | 24.55 | 24.50 | 0.14 | 0.59 |
| 7 | Control | HPRT1 | 23.84 | 23.86 | 0.14 | 0.57 |
| 14 | Control | HPRT1 | 25.50 | 25.52 | 0.10 | 0.39 |
| 21 | Control | HPRT1 | 26.47 | 26.48 | 0.22 | 0.82 |

A continuación, se muestran las gráficas con la distribución de los valores de Ct con respecto a la media, obtenidos para los diferentes genes, acompañados con la desviación estándar, para identificar comprobar que no existen posibles asimetrías o valores atípicos entre cada día y cada tratamiento (Figura 24).

Figura 24

Distribución de los valores de Ct obtenidos en los ensayos de qPCR



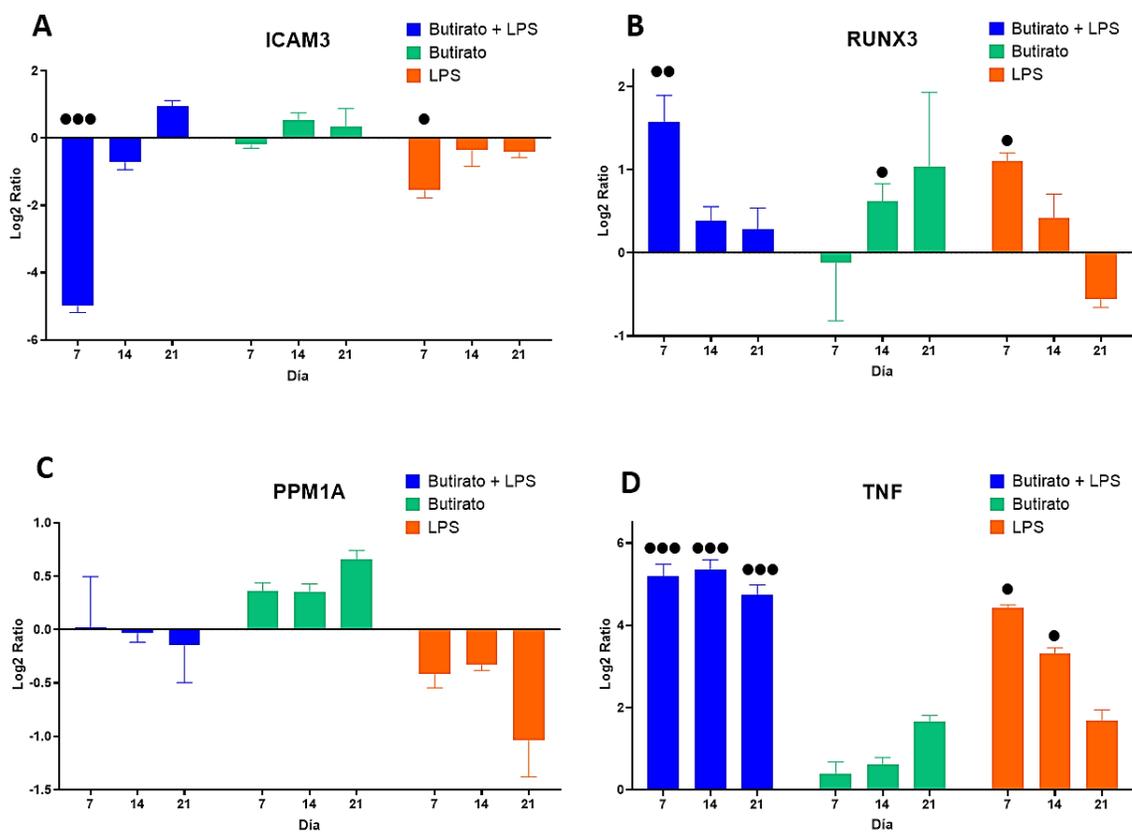
Se procedió a calcular los radios de expresión de los genes ICAM3, PPM1A, RUNX3 y TNF, normalizados con respecto a HPRT1, mediante el modelo de Pfaffl aplicando las ecuaciones descritas previamente en el apartado de materiales y métodos (Anexo2). Los radios luego fueron calculados en base logarítmica para corregir la proporción entre los genes que se expresan o se inhiben en relación con el control. En las Tabla 27 se muestran los radios de expresión calculados mientras que en la Figura 25 se observa la expresión diferencial de los genes target representada en escala logarítmica en base 2.

Tabla 27*Radios de expresión para los diferentes tratamientos*

| Día | Tratamiento | Gen | Radio | Log2 radio |
|------------|--------------------|------------|--------------|-------------------|
| 7 | Butirato + LPS | ICAM3 | 0.03 | -4.98 |
| 14 | Butirato + LPS | ICAM3 | 0.61 | -0.71 |
| 21 | Butirato + LPS | ICAM3 | 2.03 | 1.02 |
| 7 | Butirato | ICAM3 | 0.87 | -0.19 |
| 14 | Butirato | ICAM3 | 1.47 | 0.55 |
| 21 | Butirato | ICAM3 | 1.31 | 0.39 |
| 7 | LPS | ICAM3 | 0.35 | -1.53 |
| 14 | LPS | ICAM3 | 0.78 | -0.35 |
| 21 | LPS | ICAM3 | 0.76 | -0.39 |
| 7 | Butirato + LPS | PPM1A | 1.02 | 0.03 |
| 14 | Butirato + LPS | PPM1A | 0.98 | -0.03 |
| 21 | Butirato + LPS | PPM1A | 0.95 | -0.07 |
| 7 | Butirato | PPM1A | 1.28 | 0.36 |
| 14 | Butirato | PPM1A | 1.29 | 0.37 |
| 21 | Butirato | PPM1A | 1.64 | 0.71 |
| 7 | LPS | PPM1A | 0.75 | -0.41 |
| 14 | LPS | PPM1A | 0.79 | -0.33 |
| 21 | LPS | PPM1A | 0.49 | -1.02 |
| 7 | Butirato + LPS | RUNX3 | 2.99 | 1.58 |
| 14 | Butirato + LPS | RUNX3 | 1.32 | 0.40 |
| 21 | Butirato + LPS | RUNX3 | 1.29 | 0.36 |
| 7 | Butirato | RUNX3 | 0.92 | -0.12 |
| 14 | Butirato | RUNX3 | 1.56 | 0.64 |
| 21 | Butirato | RUNX3 | 2.12 | 1.08 |
| 7 | LPS | RUNX3 | 2.15 | 1.11 |
| 14 | LPS | RUNX3 | 1.35 | 0.43 |
| 21 | LPS | RUNX3 | 0.69 | -0.55 |
| 7 | Butirato + LPS | TNF | 41.87 | 5.39 |
| 14 | Butirato + LPS | TNF | 41.00 | 5.36 |
| 21 | Butirato + LPS | TNF | 28.28 | 4.82 |
| 7 | Butirato | TNF | 1.32 | 0.40 |
| 14 | Butirato | TNF | 1.56 | 0.64 |
| 21 | Butirato | TNF | 3.25 | 1.70 |
| 7 | LPS | TNF | 21.56 | 4.43 |
| 14 | LPS | TNF | 10.03 | 3.33 |
| 21 | LPS | TNF | 3.21 | 1.68 |

Figura 25

Radios de expresión en base log₂ de los genes evaluados en células THP-1



Nota: Radios normalizados con respecto al control y al gen de referencia HPRT1. Barras de error correspondientes al intervalo de confianza respecto a la media al 95%. Expresión significativa con respecto al control marcadas con •. Genes de maduración A: ICAM3, B: RUNX3, C: PPM1A y citocina inflamatoria D: TNF.

Se aplicó un análisis ANOVA de dos vías para determinar si existen diferencias significativas en los radios de expresión entre el día 7, 14 y 21 para cada tratamiento; y diferencias significativas entre tratamientos para cada día. Se utilizó la prueba de Dunn con intervalo de confianza al 95%. Los resultados de estas pruebas, incluyendo los

valores P ajustado para cada interacción se muestran en las Tabla 28 y 29, mientras que en la Figura 26 se representan las interacciones entre días y tratamientos y se señalan aquellas que muestran diferencias significativas en los radios de expresión.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los análisis con las pruebas de Dunn, para los genes ICAM3 y RUNX3 existe una diferencia significativa si se compara la expresión entre el día 7 y día 21: en células tratadas con butirato + LPS ($p=0.0021$ y $p=0.0219$) y en células tratadas con LPS ($p=0.378$ y $p=0.0073$), además para ICAM3 en células con LPS entre los días 7 y 14 ($p=0.378$) y para RUNX3 en células tratadas con butirato + LPS ($p=0.0215$) entre el día 7 y día 21.

Para PPM1A se determinó diferencias significativas en los radios de expresión entre los días 14 y 21 en las células tratadas con butirato ($p=0.0427$) y con LPS ($p=0.018$). Se detectó una disminución significativa en la expresión de TNF en células tratadas con butirato + LPS en el día 21 comparado con el día 14 ($p=0.0203$), un aumento significativo en células tratadas con butirato en el día 21 frente al día 7 ($p=0.0132$), mientras que una disminución comparando esos mismo días en células tratadas con LPS ($p=0.005$).

Al comparar la expresión entre tratamientos se encontró que ICAM3 presenta diferencias significativas entre las muestras tratadas con butirato + LPS en los días 7, 14 y 21 ($p=0.0111$, $p=0.0021$ y $p=0.0021$), mientras que la expresión de RUNX3 en muestras tratadas con butirato varía significativamente con respecto a las células tratadas con butirato + LPS y con LPS en el día 7 ($p=0.004$ y $p=0.0445$) y en el día 21 entre butirato y LPS ($p=0.0052$). PPM1A varía su expresión de manera significativa en muestras tratadas con butirato vs LPS en los 3 días ($p=0.0085$, $p=0.0014$ y $p=0.0014$).

También son significativas las diferencias de expresión de TNF entre tratadas con butirato + LPS vs butirato en todos los días ($p=0.0233$, $p=0.0111$ y $p=0.0375$).

Los radios de expresión que son significativos respecto al control corresponden a ICAM3 y RUNX3 en células tratadas en el día 7 con butirato + LPS ($p=0.0001$ y $p=0.002$), con LPS ($p=0.0046$ y $p=0.0341$), RUNX3 en células tratadas en el día 14 con butirato ($p=0.0131$), TNF en células tratadas en los días 7, 14 y 21 con butirato + LPS ($p=0.0002$ para los tres casos) y con LPS para los días 7 y 14 ($p=0.0111$, $p=0.011$), ninguna muestra para PPM1A presenta un radio de expresión significativo con respecto al control. Las muestras que representan una expresión o inhibición significativa con respecto al control se señalaron en la Figura 25.

Tabla 28

ANOVA no paramétrico entre días de aplicación de tratamientos

| Multiple comparisons test | | Mean rank diff. | Significant? | Summary | Adjusted P Value | |
|---------------------------|-----|-------------------|--------------|---------|------------------|---------|
| ICAM3 | B+L | Día 7 vs. Día 14 | -4.500 | No | ns | 0.3253 |
| | | Día 7 vs. Día 21 | -9.500 | Yes | ** | 0.0021 |
| | | Día 14 vs. Día 21 | -5.000 | No | ns | 0.1755 |
| | B | Día 7 vs. Día 14 | -5.700 | No | ns | 0.0874 |
| | | Día 7 vs. Día 21 | -4.700 | No | ns | 0.2160 |
| | | Día 14 vs. Día 21 | 1.000 | No | ns | >0.9999 |
| | L | Día 7 vs. Día 14 | -6.500 | Yes | * | 0.0378 |
| | | Día 7 vs. Día 21 | -6.500 | Yes | * | 0.0378 |
| | | Día 14 vs. Día 21 | 0.000 | No | ns | >0.9999 |
| RUNX3 | B+L | Día 7 vs. Día 14 | 6.000 | Yes | * | 0.0215 |
| | | Día 7 vs. Día 21 | 7.000 | Yes | ** | 0.0073 |
| | | Día 14 vs. Día 21 | 1.000 | No | ns | 0.7161 |
| | B | Día 7 vs. Día 14 | -4.500 | No | ns | 0.2327 |
| | | Día 7 vs. Día 21 | -4.500 | No | ns | 0.2327 |
| | | Día 14 vs. Día 21 | 0.000 | No | ns | >0.9999 |

| Multiple comparisons test | | Mean rank diff. | Significant? | Summary | Adjusted P Value |
|---------------------------|-------------------|-----------------|--------------|---------|------------------|
| L | Día 7 vs. Día 14 | 4.000 | No | ns | 0.3481 |
| | Día 7 vs. Día 21 | 8.000 | Yes | ** | 0.0050 |
| | Día 14 vs. Día 21 | 4.000 | No | ns | 0.3481 |
| B+L | Día 7 vs. Día 14 | 0.000 | No | ns | >0.9999 |
| | Día 7 vs. Día 21 | 0.7500 | No | ns | >0.9999 |
| | Día 14 vs. Día 21 | 0.7500 | No | ns | >0.9999 |
| B | Día 7 vs. Día 14 | 0.5000 | No | ns | >0.9999 |
| | Día 7 vs. Día 21 | -5.750 | No | ns | 0.0723 |
| | Día 14 vs. Día 21 | -6.250 | Yes | * | 0.0427 |
| L | Día 7 vs. Día 14 | -2.000 | No | ns | >0.9999 |
| | Día 7 vs. Día 21 | 5.000 | No | ns | 0.1496 |
| | Día 14 vs. Día 21 | 7.000 | Yes | * | 0.0181 |
| B+L | Día 7 vs. Día 14 | -0.7500 | No | ns | >0.9999 |
| | Día 7 vs. Día 21 | 5.800 | No | ns | 0.2695 |
| | Día 14 vs. Día 21 | 6.550 | Yes | * | 0.0203 |
| B | Día 7 vs. Día 14 | -2.500 | No | ns | 0.9779 |
| | Día 7 vs. Día 21 | -7.250 | Yes | * | 0.0132 |
| | Día 14 vs. Día 21 | -4.750 | No | ns | 0.1860 |
| L | Día 7 vs. Día 14 | 4.000 | No | ns | 0.3481 |
| | Día 7 vs. Día 21 | 8.000 | Yes | ** | 0.0050 |
| | Día 14 vs. Día 21 | 4.000 | No | ns | 0.3481 |

Tabla 29

ANOVA no paramétrico entre tratamientos para cada día

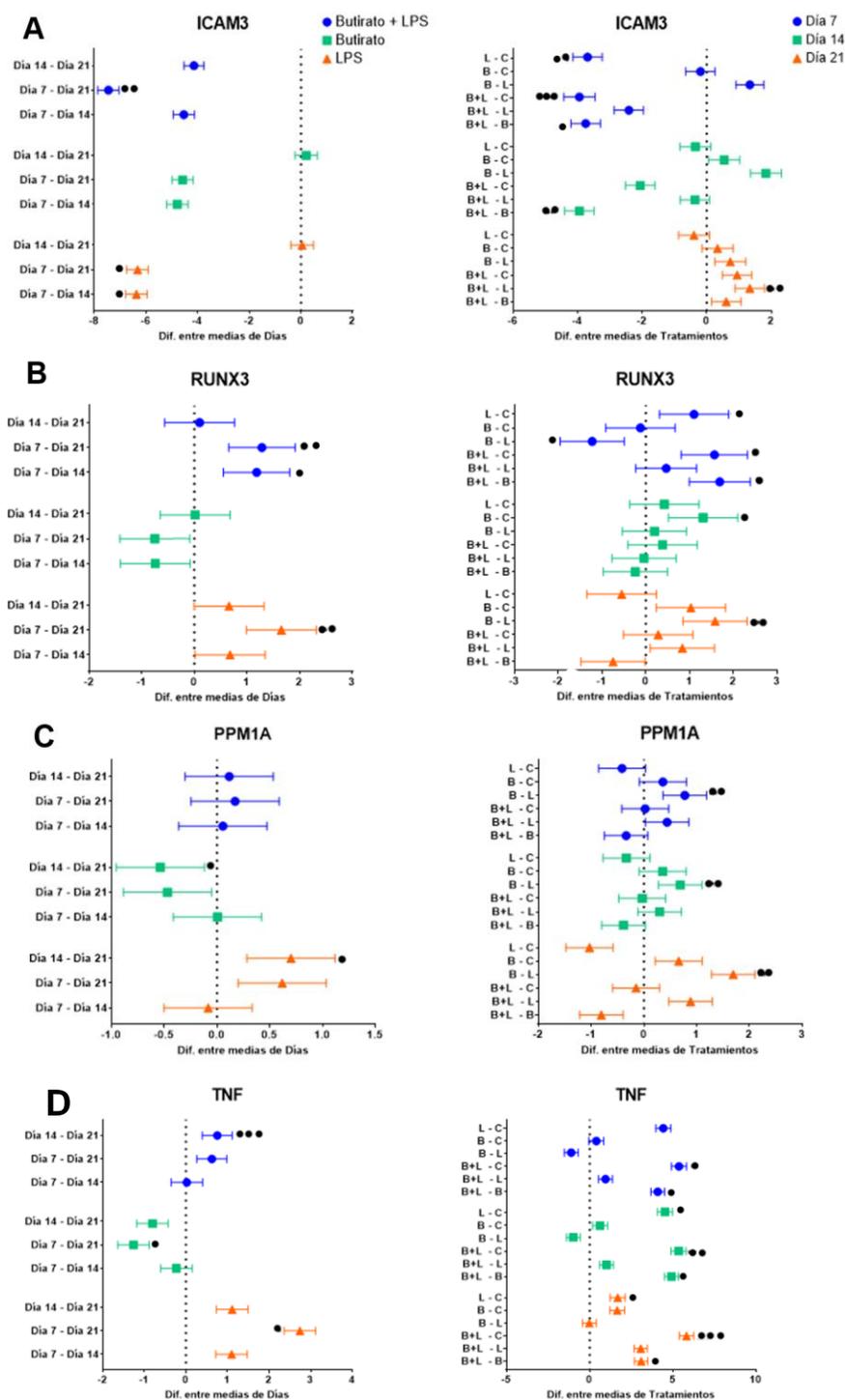
| Multiple comparisons test | | Mean rank diff. | Significant? | Summary | Adjusted P Value |
|---------------------------|-----------------|-----------------|--------------|---------|------------------|
| ICAM3 | Día 7 B+L vs. B | -9.500 | Yes | * | 0.0111 |
| | B+L vs. L | -4.500 | No | ns | 0.2289 |
| | B+L vs. C | -14.50 | Yes | *** | 0.0001 |
| | B vs. L | 5.000 | No | ns | 0.1562 |
| | B vs. C | -5.000 | No | ns | 0.1562 |
| | L vs. C | -10.00 | Yes | * | 0.0046 |

| Multiple comparisons test | | Mean rank diff. | Significant? | Summary | Adjusted P Value | |
|---------------------------|-----------|-----------------|--------------|---------|------------------|---------|
| RUNX3 | Día 14 | B+L vs. B | -12.65 | Yes | ** | 0.0021 |
| | | B+L vs. L | -4.650 | No | ns | >0.9999 |
| | | B+L vs. C | -7.400 | No | ns | 0.1602 |
| | | B vs. L | 8.000 | No | ns | 0.1929 |
| | | B vs. C | 5.250 | No | ns | 0.8298 |
| | | L vs. C | -2.750 | No | ns | >0.9999 |
| | Día 21 | B+L vs. B | -4.65 | No | ns | >0.9999 |
| | | B+L vs. L | -12.65 | Yes | ** | 0.0021 |
| | | B+L vs. C | -7.400 | No | ns | 0.1602 |
| | | B vs. L | 8.000 | No | ns | 0.1929 |
| | | B vs. C | 5.250 | No | ns | 0.8298 |
| | | L vs. C | -2.750 | No | ns | >0.9999 |
| RUNX3 | Día 7 | B+L vs. B | 10.20 | Yes | ** | 0.0040 |
| | | B+L vs. L | 2.700 | No | ns | 0.4457 |
| | | B+L vs. C | 10.20 | Yes | ** | 0.0022 |
| | | B vs. L | -7.500 | Yes | * | 0.0445 |
| | | B vs. C | 0.000 | No | ns | >0.9999 |
| | | L vs. C | 7.500 | Yes | * | 0.0341 |
| | Día 14 | B+L vs. B | -3.250 | No | ns | >0.9999 |
| | | B+L vs. L | -1.250 | No | ns | >0.9999 |
| | | B+L vs. C | 7.000 | No | ns | 0.2185 |
| | | B vs. L | 2.000 | No | ns | >0.9999 |
| | | B vs. C | 10.25 | Yes | * | 0.0131 |
| | | L vs. C | 8.250 | No | ns | 0.0820 |
| Día 21 | B+L vs. B | -2.750 | No | ns | >0.9999 | |
| | B+L vs. L | 9.000 | No | ns | 0.0643 | |
| | B+L vs. C | 3.500 | No | ns | >0.9999 | |
| | B vs. L | 11.75 | Yes | ** | 0.0052 | |
| | B vs. C | 6.250 | No | ns | 0.3705 | |
| | L vs. C | -5.500 | No | ns | 0.6012 | |
| PPM1A | Día 7 | B+L vs. B | -5.250 | No | ns | 0.8195 |
| | | B+L vs. L | 6.000 | No | ns | 0.5333 |
| | | B+L vs. C | 0.2500 | No | ns | >0.9999 |
| | | B vs. L | 11.25 | Yes | ** | 0.0085 |

| Multiple comparisons test | | Mean rank diff. | Significant? | Summary | Adjusted P Value | | |
|---------------------------|-----------|-----------------|--------------|---------|------------------|---------|--------|
| TNF | Día 14 | B vs. C | 5.500 | No | ns | 0.6012 | |
| | | L vs. C | -5.750 | No | ns | 0.5141 | |
| | | B+L vs. B | -7.750 | No | ns | 0.1679 | |
| | | B+L vs. L | 5.250 | No | ns | 0.8195 | |
| | | B+L vs. C | -2.250 | No | ns | >0.9999 | |
| | | B vs. L | 13.00 | Yes | ** | 0.0014 | |
| | Día 21 | B vs. C | 5.500 | No | ns | 0.6012 | |
| | | L vs. C | -7.500 | No | ns | 0.1499 | |
| | | B+L vs. B | -6.5 | No | ns | 0.3919 | |
| | | B+L vs. L | 6.500 | No | ns | 0.3919 | |
| | | B+L vs. C | 0.000 | No | ns | >0.9999 | |
| | | B vs. L | 13.00 | Yes | ** | 0.0014 | |
| | Día 7 | Día 14 | B vs. C | 6.500 | No | ns | 0.3123 |
| | | | L vs. C | -6.500 | No | ns | 0.3123 |
| B+L vs. B | | | 8.000 | Yes | * | 0.0233 | |
| B+L vs. L | | | 4.000 | No | ns | 0.2567 | |
| B+L vs. C | | | 12.50 | Yes | *** | 0.0002 | |
| B vs. L | | | -4.000 | No | ns | 0.2567 | |
| Día 14 | | B vs. C | 4.500 | No | ns | 0.1786 | |
| | | L vs. C | 8.500 | Yes | * | 0.0111 | |
| | | B+L vs. B | 8.000 | Yes | * | 0.0232 | |
| | | B+L vs. L | 4.000 | No | ns | 0.2564 | |
| | | B+L vs. C | 12.50 | Yes | *** | 0.0002 | |
| | | B vs. L | -4.000 | No | ns | 0.2564 | |
| Día 21 | | B vs. C | 4.500 | No | ns | 0.1783 | |
| | | L vs. C | 8.500 | Yes | * | 0.0110 | |
| | B+L vs. B | 7.000 | Yes | * | 0.0375 | | |
| | B+L vs. L | 6.000 | No | ns | 0.0745 | | |
| | B+L vs. C | 13.00 | Yes | *** | 0.0002 | | |
| | B vs. L | -1.000 | No | ns | 0.7780 | | |
| Día 21 | B vs. C | 6.000 | No | ns | 0.1210 | | |
| | L vs. C | 7.000 | No | ns | 0.0668 | | |

Figura 26

Comparaciones de medias entre días (izquierda) y entre tratamientos (derecha)



Nota: interacciones significativas marcadas con ●, intervalo de confianza al 95% (Dunn).

Genes de maduración A: ICAM3, B: RUNX3, C: PPM1A y citocina inflamatoria D: TNF.

Capítulo 4: Discusión

En la actualidad, el sistema de cultivo dual de células caco-2 se utiliza en diversos laboratorios y en ensayos preclínicos como una herramienta para el descubrimiento y desarrollo de fármacos, pues este modelo *in vitro* mimetiza la mucosa del intestino delgado humano, lo que permite estudiar sus mecanismos de transporte, predecir la absorción de sustancias químicas administrados por vía oral, evaluar la capacidad de los fármacos para atravesar la barrera intestinal así como las interacciones con otras líneas celulares y microorganismos (De Angelis & Turco, 2011; Ingels et al., 2004). En el presente estudio, el modelo de células caco-2 en conjunto con monocitos humanos THP1 han permitido analizar el efecto del butirato de sodio sobre la diferenciación de las células de epitelio intestinal y sobre la permeabilidad de la monocapa que forman. Para ello se ha hecho una evaluación indirecta, al medir la expresión de genes de maduración de monocitos (ICAM3, PPM1A y RUNX3), así como de una citoquina proinflamatoria (TNF), luego de haber expuesto a las células caco-2 a tratamiento con LPS.

Extracción de ARN

La obtención de ARN de alta calidad es la consideración más importante previo a la realización de ensayos de RT-PCR en tiempo real. La calidad del ARN se ve comprometida una vez extraído, pues es menos estable que el ADN debido a la naturaleza ubicua y la estabilidad de las RNasas, enzimas que escinden el ARN. La presencia de inhibidores como detergentes y sales que son transferidos durante la extracción también pueden afectar su calidad. Además, ARN contaminado con ADN genómico altera el desempeño de la qPCR generando resultados falsos positivos (Fraga, Meulia, & Fenster, 2014; Thermo Fisher Scientific, 2016). Para el presente

trabajo de investigación, las extracciones de ARN se realizaron bajo las directrices de los kits empleados, así como el posterior procedimiento de purificación con DNAsas para evitar la contaminación con ADNg. Se evaluó la integridad de las muestras de ARN obtenidas mediante electroforesis en gel de agarosa, en el cual se pudieron visualizar las bandas esperadas 28S y 18S de forma nítida como se muestra en la Figura 7.

Dado que los ARNr 28S y 18S de mamíferos tienen un tamaño aproximadamente de 5 kb y 2 kb, la relación teórica 28S: 18S es 2,7: 1; aunque la proporción de 2:1 se considera un indicador de que el ARN está intacto (Thermo Fisher Scientific, 2016). En las Figuras 19B, 19C, 20B y 20C se visualizan tres bandas nítidas correspondientes a las bandas 28S, 18S y 5S respectivamente, demostrando que el ARN total aislado no se degradó y no se detectó contaminación de ADNg de alto peso molecular, sin embargo, en las figuras 19A y 20A, algunos carriles muestran un aspecto manchado y no se distinguen las bandas ni su intensidad, lo que indica la degradación del ARN.

Además, se realizó la cuantificación de las muestras de ARN aisladas en donde se evaluó su pureza mediante los ratios de absorbancia A260/A280 y A260/A230. Una relación A260/A280 entre 1.8 y 2.1 indica ARN altamente purificado; un valor por debajo de este rango indica la presencia de proteínas u otros contaminantes que absorben fuertemente a 280 nm. Por otro lado, los valores esperados de 260/230 se encuentran comúnmente entre 2.0 y 2.2; si la relación está por debajo de lo esperado, puede indicar la presencia de contaminantes que absorben a 230 nm como fenol o alcohol (Wilfinger, Mackey, & Chomczynski, 1997). Tanto las muestras de ARN que fueron utilizadas para las estandarizaciones de RT-PCR (Tabla 9), como aquellas que se utilizaron en los ensayos de cuantificación relativa (Tabla 23 y Tabla 24) presentan ratios dentro de los

rangos aceptables lo que indica que no existen problemas de contaminación con proteínas ni otros compuestos.

Síntesis de cDNA

El primer paso en la reacción de RT-PCR es convertir selectivamente las moléculas de ARNm, que son las secuencias que codifican proteínas, en ADN complementario. Los ensayos de qPCR para las muestras de monocitos se realizaron en dos pasos, es decir, los procesos de retro transcripción y de amplificación se hicieron por separado, por lo que la fase inicial fue sintetizar el ADNc. Para asegurar la selección del ARNm a partir de ARN celular total de las células THP1, se utilizaron cebadores oligodesoxinucleotídicos (dT), ya que estos se hibridan en el extremo 5' de la cola poli (A) del ARNm, lo que permite que la retrotranscriptasa (RT) extienda el cebador produciendo ADNc que representa solo secuencias de genes transcritas (Fraga et al., 2014).

Características de los primers utilizados

Un diseño adecuado de primers es necesario a fin de garantizar la eficacia de amplificación, la especificidad y la fluorescencia en los ensayos de qPCR. Para ello, los primers deben ser específicos para el gen que se desea cuantificar, no deben formar dímeros ni amplificar secuencias no deseadas, su longitud puede oscilar entre 18 y 24 bases, contener entre 40 y 60% de G/C, y la temperatura de melting (T_m) variar entre 50 y 60 °C (Lustbader, 2015). Los primers forward y reverse del gen PPM1A fueron diseñados bajo todas estas consideraciones, mientras que el resto de los pares de primers utilizados en este estudio fueron obtenidos de investigaciones previas donde no se reportaron inconvenientes de especificidad y eficiencia. Además, todos los primers fueron evaluados en el software PrimerBlast para verificar que se hibriden únicamente

con sus secuencias respectivas y que cumplan dichos parámetros, los cuales se encuentran detallados en la Tabla 10.

Estandarización de sistemas de RT-PCR punto final

La PCR se ha convertido en una técnica indispensable en los laboratorios de investigación médica y biológica, pues permite detectar y crear millones de copias de una secuencia de ADN. Por su parte, la RT-PCR es una técnica más sensible para la detección y cuantificación de ARNm (Dharmaraj, 2017; Saiki et al., 1988). Para esta investigación se estandarizaron los ensayos de RT-PCR punto final, para amplificar fragmentos de los genes de las proteínas de las uniones ocluyentes de células caco-2 y de los genes de maduración de monocitos.

Luego de diseñar o elegir los primers apropiados para cada sistema, se deben optimizar sus temperaturas de hibridación empleando un análisis de gradiente de temperatura para determinar la temperatura óptima de annealing. Este tipo de análisis aprovecha la característica que se encuentra en la mayoría de los termocicladores que permite realizar varias reacciones de PCR a diferentes temperaturas simultáneamente (Fraga et al., 2014). Es así que en los ensayos de RT-PCR se probó un rango de temperaturas de annealing entre 57°C y 63°C.

Con el fin de verificar la especificidad de la reacción se debe evaluar los productos de PCR en un gel de agarosa donde se visibiliza una única banda en el tamaño esperado (Fraga et al., 2014). Para todas las temperaturas probadas en el rango mencionado, se observaron las bandas del tamaño esperado correspondientes a los productos específicos de cada gen (Figura 8 y Figura 9).

Estandarización de sistemas de qPCR con SYBR® Green

La PCR cuantitativa en tiempo real o simplemente qPCR, ofrece a los investigadores una poderosa herramienta para la cuantificación de ácidos nucleicos debido a su alta sensibilidad y especificidad de secuencia, su precisión y rapidez y que no requiere procesamiento posterior a la amplificación (Wong & Medrano, 2005). Antes de utilizar la qPCR para cuantificar un gen de interés, se debe tener cuidado de optimizar las condiciones de reacción de la PCR a fin de realizar mediciones precisas y confiables (Fraga et al., 2014). En el presente trabajo, luego de haber verificado la especificidad de cada sistema mediante los ensayos de RT-PCR punto final, se procedió a la estandarización de los ensayos de qPCR con SYBR® Green para la medición de expresión de genes de interés en células caco-2 y monocitos humanos tratados en presencia y ausencia de butirato y LPS, siguiendo las recomendaciones del fabricante de los kits empleados.

Ya que el fabricante sugiere trabajar con una temperatura de annealing de 60°C (Applied Biosystems, 2010), a la cual se obtuvo una óptima amplificación durante los ensayos de gradiente de temperatura, se decidió ajustar al fase de annealing a dicha temperatura en los ensayos de qPCR. Respecto a la concentración final de primers, también se aconseja usar entre 0,3 y 0,8 μM para cada primer. Considerando que las concentraciones que son demasiado altas pueden contribuir a la amplificación de productos inespecíficos, como los dímeros (Fraga et al., 2014), se estandarizaron los sistemas con cantidades equimolares de primers a 0,4 μM .

Cuando se utilizan colorantes intercalantes como el SYBR® Green, se debe verificar nuevamente que la amplificación de PCR sea específica en las condiciones reales de qPCR. Esto se realiza mediante la función de análisis de la curva de fusión. Un ensayo

completamente optimizado contendrá un pico de fusión homogéneo o curva de melting específica para el fragmento amplificado que se está buscando (Bustin & Nolan, 2008; Fraga et al., 2014), como se observa en las Figura 10 y Figura 11, mientras que en las Tabla 11 y Tabla 12 se muestran las T_m respectivas de cada gen. También se aconseja evaluar la muestra del control negativo para detectar la presencia de artefactos de PCR como dímeros de primers o productos mal cebados, los cuales suelen tener temperaturas de fusión más bajas que el amplicón objetivo y se observan como shoulders o picos más pequeños, sin embargo, es aceptable observar una pequeña cantidad de formación de dímero de primers en los controles negativos, más no un pico igual al de la muestra (Stratagene, 2004). En la Figura 16 se observan ligeros shoulders en las muestras correspondientes a las últimas diluciones, un pico de dímero de primer es mucho más común cuando el templado está ausente o como en este caso, al estar la muestra más diluida la cantidad de templado es menor (Applied Biosystems, 2014).

Luego de haber establecido la concentración óptima para los primers, es importante examinar la calidad o rendimiento general del ensayo qPCR en términos de eficiencia, precisión y sensibilidad. La curva estándar es una herramienta que permite evaluar estos parámetros mediante los datos generados a partir de una dilución en serie de una templado de control positivo. La pendiente de la curva estándar, que se refiere a la pendiente del gráfico del valor C_t frente al logaritmo de la cantidad de templado, se usa para determinar la eficiencia de la reacción. Una pendiente considerada aceptable se encuentra entre $-3,6$ y $-3,1$ y corresponde a una eficiencia entre 90% y 110% (Bustin & Nolan, 2008; Fraga et al., 2014; Stratagene, 2004). En las Tabla 18 y Tabla 22 se detallan los valores de las pendientes que se ubican dentro del rango establecido, así como de las eficiencias y porcentajes de eficiencias de amplificación que se consideran

aceptables. Para GAPDH, la pendiente es igual a -3.17 y su eficiencia es 106%, mientras que los genes evaluados en monocitos tienen pendientes entre -3.47 y -3.17 , consecuentemente, las eficiencias varían entre 94% y 107%.

En cuanto al parámetro de precisión, se determina mediante el coeficiente de correlación R^2 que es una medida de qué tan bien se ajustan los datos a la curva estándar. Los factores que influyen sobre este valor son la precisión de las diluciones en serie, reproducibilidad de pipeteo para cada punto de datos, detección de contaminación o fluorescencia inespecífica, falta de uniformidad en el bloque térmico. Ya que el valor de R^2 refleja la linealidad de la curva estándar, este idealmente debe ser igual a 1, aunque un coeficiente mayor a 0,98 es aceptable para la mayoría de los ensayos (Applied Biosystems, 2014; Bustin & Nolan, 2008). Los valores de R^2 de los sistemas antes mencionados son óptimos, puesto que son iguales o mayores a 0,98 (Tabla 18 y 22).

Finalmente, sobre el último parámetro, la sensibilidad analítica se expresa como el límite de detección (LOD), que se refiere al número mínimo de copias en una muestra que se puede medir con precisión con un ensayo (Applied Biosystems, 2014). En el presente estudio se determinaron los límites de detección de los diferentes genes en los ensayos de sensibilidad analítica, los cuales señalan que GAPDH puede detectar y amplificar consistentemente hasta $0,5 \text{ pg}/\mu\text{L}$ de ARN. Por otro lado, para los sistemas evaluados en monocitos, ICAM3 y PPM1A pueden detectar y amplificar hasta una concentración de $5 \text{ pg}/\mu\text{L}$, RUNX3 y TNF hasta una concentración de $0.125 \text{ ng}/\mu\text{L}$ y HPRT1 hasta una concentración de $0.3 \text{ ng}/\mu\text{L}$ de ADNc. No se determinaron los límites de detección en los sistemas ZO1, OCLN y PIGR, los valores de las pendientes, de R^2 ni las eficiencias, pues los ensayos de sensibilidad analítica presentaron amplificación

en los controles negativos, evidenciando la contaminación del stock de primers, por lo que los datos obtenidos y los valores de Ct no se consideran confiables.

Cuando las eficiencias entre el gen objetivo y el gen de referencia no son relativamente equivalentes, se recomienda aplicar un modelo matemático que corrija estas diferencias, ya que en este estudio las eficiencias de los genes varían entre 94% y 107%, para el cálculo de los radios de expresión se utilizó el modelo desarrollado por Pfaffl que combina la cuantificación y normalización de genes utilizando únicamente las eficiencias de amplificación y las diferencias de Ct (M. W. Pfaffl, 2001).

Ensayos de estabilidad de genes de referencia

Para lograr un perfil de expresión preciso y reproducible de genes seleccionados mediante qPCR, es fundamental para la fiabilidad de todo el ensayo que el gen de referencia sea estable. Idealmente, un gen de referencia debería expresarse sin mostrar cambios bajo las diferentes condiciones experimentales, sin embargo, los genes de referencia generalmente muestran variabilidad en los niveles de expresión en diferentes tejidos, enfatizando la importancia de los estudios de evaluación para identificar aquel más estable antes iniciar cualquier estudio de qPCR (Applied Biosystems, 2014; Rebouças et al., 2013; Sigma-Aldrich, 2013; Vandesompele et al., 2002).

Los genes más comúnmente utilizados son gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), β -actina, β -tubulina, fosfoglicerato quinasa (PGK), ubiquitina (UBQ), ribosoma proteína 19 (RPL-19), hipoxantina fosforribosiltransferasa (HPRT1) y ARN ribosómico 18S (ARNr 18S) (Rebouças et al., 2013).

Para este estudio se seleccionaron y se evaluaron tres candidatos a genes de referencia: GAPDH, ACTB y HPRT1, tanto para las células caco-2 como para los

monocitos. Luego de seguir los protocolos respectivos, se recogieron los datos de los valores de Ct obtenidos (Tabla 13 y Tabla 14) y se sometieron al análisis mediante el software Normfinder. El algoritmo que utiliza este software proporciona un valor de estabilidad para cada gen, que es una medida directa de la variación de expresión estimada que permite evaluar el error sistemático introducido cuando se usa el gen para la normalización, es así que se selecciona el mejor gen, que es aquel con el valor de estabilidad más bajo, correspondiente a una menor variación de expresión general de los genes y menor variación entre grupos de muestras (Andersen, Jensen, & Ørntoft, 2004). En las Tabla 15 y Tabla 16 se observan los resultados obtenidos con NormFinder, donde los valores de estabilidad más bajos fueron de 0.016 para GAPDH en células caco y 0.014 para HPRT1 en monocitos, los cuales se seleccionaron como los genes de referencia para los posteriores ensayos de cuantificación relativa.

Expresión de ICAM3, PPM1A, RUNX3 y TNF en células THP-1 expuestas a butirato y a lipopolisacárido

En la presente investigación se evaluó la expresión de genes de maduración de monocitos, así como una citoquina proinflamatoria con el fin de determinar si el butirato contrarresta el aumento de permeabilidad de las células epiteliales estimuladas con LPS inhibiendo la diferenciación de monocitos subepiteliales hacia macrófagos. Para ello, se extrajo el ARN de células THP-1, se sintetizó cDNA y se realizaron los ensayos de qPCR como se estandarizaron previamente. Así, se analizó la expresión de los genes ICAM3, PPM1A, RUNX3 y TNF, mientras que HPRT1 se utilizó como gen de referencia.

En los ensayos de qPCR, la precisión puede tener diferentes significados, según el nivel de variabilidad que se considera. La repetibilidad hace referencia a la variabilidad intra-ensayo, expresa la cercanía de los resultados obtenidos con la misma

muestra, utilizando las mismas condiciones de repetibilidad: procedimiento, operador, sistema de medición, programación del equipo, etc. Se espera que la repetibilidad dé la menor variación posible en los resultados, la cual se expresa como la desviación estándar (DE) o coeficiente de variación (CV) y (Bustin & Nolan, 2008; Rebane, 2016). En este estudio, se determinó la repetibilidad utilizando la variación intra-ensayo, la cual se evaluó usando 4 réplicas para cada tratamiento aplicado a las células, de cada día. Los CV para cada sistema, ICAM3, PPM1A, RUNX3, TNF y HPRT1, en ningún caso fueron superiores al 2.99% lo que demuestra la repetibilidad de las reacciones.

En adultos, los fagocitos mononucleares surgen de células hematopoyéticas de la médula ósea que al ser estimulados por el factor estimulante de colonias de monocitos (M-CSF) y el factor estimulante de colonias de macrófagos granulocitos (GM-CSF) maduran en monocitos que circulan en la sangre y se transportan hasta los tejidos donde se diferencian en macrófagos, principalmente durante eventos inflamatorios (Abbas, 2015; Duque Correa & Rojas López, 2007).

Los macrófagos se activan mediante dos vías, la activación clásica que se produce por estímulos microbianos como LPS o citocinas como IFN- γ , TNF y GM-CSF dando lugar a macrófagos pro-inflamatorios M1, se caracterizan por la producción de citocinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF, IL-6), la liberación de interleucinas y altos niveles de intermediarios reactivos de oxígeno (ROI) y óxido nítrico (NO). Por el contrario, los macrófagos antiinflamatorios M2 se activan por la vía alternativa que resultan de la exposición celular a IL-4, IL-13, IL-10, M-CSF, entre otros (Mantovani, Sica, & Locati, 2005; Saqib et al., 2018).

Los macrófagos expresan en su superficie una gran variedad y cantidad de receptores que reconocen un amplio espectro de microbios, entre estos se encuentran

los receptores tipo toll (TLR). El LPS interactúa específicamente con el receptor TLR4, que da paso a la activación de varias vías de transmisión de señales y posteriormente a factores de transcripción que inducen la expresión de genes que codifican moléculas requeridas para las respuestas inflamatorias. Estas moléculas incluyen citocinas como el TNF, moléculas de adhesión endotelial, entre otras (Abbas, 2015). Como se detalla en el Capítulo 2 correspondiente a la metodología de este trabajo, se añadió LPS al cultivo celular dual. En los pocillos de la placa, donde las células caco-2 aún no ha formado la monocapa, el LPS atraviesa la membrana del inserto transwell sobre la cual crecen las células caco-2, se une a los receptores de los monocitos que se encuentran debajo y estimula la activación de los monocitos clásicos M1.

RUNX3 es un gen que codifica una proteína de la familia de factores de transcripción que contiene el dominio Runt. Un heterodímero de esta proteína y una subunidad beta forman un complejo que se unen a varios potenciadores y promotores, y puede activar o suprimir los procesos de transcripción (Levanon, Eisenstein, & Groner, 1998). Por otro lado, ICAM3 codifica una proteína de la familia de moléculas de adhesión intercelular. Esta proteína es expresada de manera constitutiva y abundante por todos los leucocitos y funciona no solo como una molécula de adhesión, sino también como una potente molécula de señalización (de Fougerolles & Springer, 1992).

En investigaciones realizadas por Estechea y colaboradores (2012) demostraron que los factores de la familia RUNX, como RUNX3 regulan la actividad del promotor ICAM3. Para ello interrumpieron los sitios de unión a RUNX dentro del promotor de ICAM3 y observaron un aumento significativo en la actividad de dicho promotor. En otro ensayo, evaluaron el nivel de expresión de ICAM3 en ARNm de células THP-1 a las cuales se introdujeron ARN de interferencia pequeños (ARNip) específicos para RUNX3, al silenciar este gen se observó una disminución de su expresión en más del

50% mientras que los niveles de ICAM3 aumentaron. También analizaron la expresión de ICAM3 en ARNm de monocitos y en macrófagos diferenciados en fenotipos M1 y M2, detectando que la expresión de ICAM3 disminuyó considerablemente en ambos tipos de macrófagos, lo que indica que la regulación negativa de ICAM3 está vinculada a diferenciación de monocitos a macrófagos. La proteína RUNX3 se examinó en paralelo en los macrófagos M2, y se observó que su nivel de expresión aumentó. Con todos estos resultados concluyeron que la expresión de RUNX3 e ICAM3 están inversamente correlacionadas (Esteche et al., 2012; Puig-Kröger et al., 2010). Resultados similares se encontraron en el presente estudio, pues al observar los radios de ambos genes, se evidencia que, para todos los tratamientos, mientras la expresión de ICAM3 se inhibe con respecto al control, el nivel de expresión de RUNX3 aumenta (Figura 25 A y B).

Analizando cada tratamiento de manera individual, en células tratadas con butirato + LPS, las pruebas estadísticas confirman que RUNX3 se expresa de manera significativa en el día 7, un indicador de que los monocitos se encontraban diferenciándose hacia macrófagos, mientras que la expresión en los días 14 y 21 con respecto al control es menor y no significativa (Figuras 25B y 26B, Tabla 28 y 29), esto quiere decir que, aunque las células recibieron LPS, el butirato contribuyó a la formación de la monocapa en las células caco-2 impidiendo que el LPS atravesase la membrana y que estimule a los monocitos. Analizando para el mismo tratamiento, la inhibición de ICAM3 en el día 7 es significativa, en el día 14 y 21 aumentan, siendo significativa la diferencia entre los días 7 y 21 (Figuras 25A y 26A, Tabla 28 y 29), esto va en concordancia con lo encontrado en RUNX3, mientras en el día 7 las células THP-1 no expresaban niveles altos de ICAM3 porque se encontraban en proceso de maduración, en el día 21 ya no se encontraban diferenciándose.

En el tratamiento solo con butirato se encontró que la expresión de RUNX3 en el día 7 fue significativamente menor con respecto al butirato + LPS, y menor aunque no significativo con respecto al control, mientras que la expresión en los días 14 y 21 aumentaron, en este caso al no haber la estimulación con LPS las células no expresaron niveles significativos de RUNX3. De igual forma, el nivel de expresión en ICAM3 en células tratadas con butirato en el día 7 es menor con respecto a las no tratadas, mientras que en los días 14 y 21 aumentaron. Esto quiere decir que, aunque se observan mayor expresión con butirato no hacen una diferencia con respecto al control. Sin embargo, al comparar la expresión entre tratamientos en los 3 días, hay una expresión significativa en las tratadas con butirato respecto a las tratadas con butirato + LPS (Figuras 25A y 26A, Tabla 28 y 29), lo que quiere decir que el butirato si hizo una diferencia.

En el tratamiento solo con LPS ocurre lo mismo que en el tratamiento con butirato + LPS, aquí cabe destacar que tanto la expresión en el día 7 para RUNX3 con respecto al control, como la diferencia entre el día 7 y 21 son significativas (Figuras 25B y 26B, Tabla 28 y 29), en este caso la formación de monocapa de células intestinales ya se ha formado, lo que impiden el paso de LPS, al no estimular los monocitos disminuye la expresión de RUNX3. La inhibición de ICAM3 en el día 7 con respecto al control es significativo, al igual que la diferencia de expresión en el día 7 vs días 14 y 21, en los cuales sus radios aumentan (Figuras 25A y 26A, Tabla 28 y 29),, corroborando lo anteriormente mencionado.

El gen PPM1A codifica en humanos la proteína fosfatasa dependiente de Mg^{2+}/Mn^{2+} 1A. Esta enzima pertenece a la familia PP2C de proteínas fosfatasas Ser/Thr que se caracteriza por ser un regulador negativo de las vías de respuesta al

estrés celular, puede desfosforilar quinasas dependientes de ciclina y, por tanto, puede participar en el control del ciclo celular (Mann, Campbell, McGowan, & Cohen, 1992).

Experimentos de manipulación genética realizados por Smith y colaboradores (2018) demostraron que la sobreexpresión de PPM1A atenuó el programa de diferenciación de macrófagos, alterando la adherencia celular, además de que reduce la expresión de marcadores inflamatorios específicos de macrófagos M1 e inhibe la producción de citocinas como TNF. En células THP-1, los niveles de proteína PPM1A aumentaron hasta 8 veces en el transcurso de un período de diferenciación de 9 días inducido por forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), lo mismo ocurrió cuando fue inducida con LPS, la producción de TNF fue 10 veces menor en los macrófagos que sobreexpresan PPM1A estimulados con LPS en comparación con los células THP-1 no modificadas. Por otro lado, la eliminación de la expresión de PPM1A aceleró la capacidad de los monocitos para diferenciarse en macrófagos y en monocitos THP-1 aumentó notablemente la producción de TNF después de la diferenciación inducida por PMA. Con estos resultados concluyeron que PPM1A es una fosfatasa clave que funciona como un regulador para controlar la diferenciación de monocitos a macrófagos y sirve como un punto de control molecular para prevenir la polarización excesiva de macrófagos de tipo M1 y así limitar la respuesta inflamatoria (Smith et al., 2018). Un comportamiento similar mostraron las muestras de ARNm analizadas en esta investigación, en las Figura 25C y 25D se observa que los radios de expresión de TNF son aproximadamente 5 veces mayor a la expresión de PPM1A en las muestras que fueron estimuladas con LPS, con o sin butirato.

Los mecanismos de activación de la transcripción del gen TNF han sido objeto de intensa investigación *in vivo* e *in vitro*, en donde se ha demostrado que el TNF no se secreta a partir de las reservas intracelulares, sino que se sintetiza *de novo* y es

secretado por macrófagos en respuesta a un estímulo eficaz, como el LPS bacteriano (Drouet, Shakhov, & Jongeneel, 1991; Takashiba et al., 1999).

En la Figura 25D se observa que en efecto, los monocitos respondieron ante el estímulo de LPS, pues su expresión en los tratamientos con butirato + LPS, aumentaron significativamente, alrededor de 5 veces con respecto al control en los 3 días de tratamiento, mientras que en el tratamiento con LPS la expresión aumento aproximadamente 4 y 3 veces con respecto al control en los días 7 y 14, respectivamente (

Tabla 29). El nivel de expresión de TNF en las células tratadas con butirato + LPS es significativamente mayor que las tratadas con butirato solamente, para los 3 días. Aunque las tratadas con LPS también son mayores que las tratadas con butirato, estas no son significativas. En las células tratadas con butirato + LPS y con LPS, hay una mayor expresión significativa en el día 14 vs el 21, en cambio en las tratadas con butirato en cambio muestran una menor expresión que es considerable frente al día 21 (Figuras 25D y 26D, Tabla 28 y 29). Estos resultados sugieren que los monocitos secretan TNF como respuesta al LPS y que sin su estímulo su expresión es significativamente menor.

En concordancia con los resultados de Smith y colaboradores, el nivel de expresión de PPM1A fue menor cuando el nivel de expresión de TNF era alto, además en ningún caso la expresión de PPM1A fue significativo con respecto al control en los 3 días, tanto con butirato + LPS, como con LPS solamente fue menor al control mientras que con butirato fue mayor. Hubo una expresión mayor en el día 21 frente al 14 en las muestras tratadas con butirato y en las tratadas con LPS, las diferencias en las expresión entre butirato y LPS en todos los días, además de ser contrarias son significativas (

Tabla 29). Estos resultados quieren decir que el butirato solo aplicado a las células caco-2, favorece su diferenciación, lo que impiden que el LPS atraviese la membrana permitiendo la expresión de PPM1A e inhibiendo la expresión de TNF.

Se debe considerar que en aquellos casos donde la expresión de los genes fue la esperada en el día 21 de manera significativa, se debe a que las células caco-2 luego de alcanzar la confluencia, comienzan a diferenciarse de manera espontánea y luego de un periodo de 18 a 21 días presentan microvellosidades en el lado apical, formando la monocapa de células que simula el epitelio intestinal (Lea, 2015). Por lo tanto, independientemente de la exposición al butirato, las células mostraron una menor expresión de RUNX3 y TNF en el último día de tratamiento, ya que la formación espontánea de la monocapa de enterocitos impidió la translocación y consecuente estimulación con LPS en células THP-1.

Expresión de las proteínas de las uniones ocluyentes

Las células epiteliales tienen la capacidad para organizarse a través de la adhesión célula-célula en un epitelio funcional que cumple el propósito de una barrera protectora. Los contactos entre células adyacentes se componen de uniones estrechas (TJ) cuyas proteínas como la ZO1 y ocludina, están involucradas en la regulación de varias funciones celulares, incluida la proliferación, diferenciación y migración (Bhat et al., 2019). El receptor de inmunoglobulina polimérico (pIgR) es otra proteína transmembrana que se encuentra principalmente en el revestimiento epitelial del tracto gastrointestinal y facilita el transporte de isoformas poliméricas solubles de la inmunoglobulina A y los inmunocomplejos (Kaetzel, 2005). Uno de los objetivos de esta investigación era medir el nivel de expresión de los genes que codifican estas proteínas, ZO1, OCLN y PIGR, respectivamente. Sin embargo, por problemas de contaminación en los primers y por razones técnicas no se pudo completar la estandarización de los ensayos de qPCR ni la cuantificación relativa de estos sistemas.

Varios estudios han demostrado que la expresión de PIGR está sometida a una fuerte regulación de citocinas, hormonas y estímulos patógenos (Asano & Komiyama, 2011; Kaetzel, 2005), al igual que las proteínas de la TJ, que se encuentran bajo la amenaza moléculas proinflamatorias, virus y bacterias patógenos que desencadena la inflamación y el desarrollo de enfermedades, lo que se traduce en la pérdida de la función de barrera de las uniones ocluyentes y en el aumento de los niveles de citocinas proinflamatorias y desregulación inmunitaria (Bhat et al., 2019; Lea, 2015).

En el estudio realizado por Peng y colaboradores (2009) demostraron que existe una relación entre los AGCC como el butirato de sodio con el desarrollo y mantenimiento de la barrera intestinal, mejorándola, ya que regula el ensamblaje de uniones estrechas. Este proceso dinámico está mediado por la activación de proteína quinasa activada por AMP (AMPK) (Peng, Li, Green, Holzman, & Lin, 2009).

En base a los estudios mencionados y a los resultados obtenidos en la presente investigación en la línea celular de monocitos, se sugiere que los niveles expresión de ZO1, OCLN y PIGR en células caco-2 tratadas con butirato sean significativamente mayores con respecto a células sin exposición, mientras que en las células estimuladas con LPS se inhiban debido a una menor diferenciación de las células.

Capítulo 5: Conclusiones

El sistema de cultivo celular dual constituye un modelo apropiado para evaluar el efecto del butirato sobre células caco-2, ya que permite imitar las condiciones del epitelio intestinal humano, estudiar el transporte y absorción de moléculas y la respuesta de las células con las que son co-cultivadas.

La estandarización de los ensayos de RT-PCR punto final permitieron definir las concentraciones y temperaturas óptimas para la amplificación eficiente de los genes en estudio, además la electroforesis en gel de agarosa permitió evaluar la especificidad de los sistemas evaluados en células caco-2 y THP-1.

Los ensayos de estabilidad de genes de referencia, así como su respectivo análisis estadístico permitieron identificar a GAPDH y HPRT1 como los genes normalizadores óptimos para células caco-2 y THP-1, respectivamente, ya que fueron los que menor valor de variabilidad presentaron.

Los ensayos de sensibilidad analítica permitieron determinar la capacidad de detección de ácido nucleico, así como las eficiencias de los genes GAPDH, ICAM3, RUNX3, TNF y HPRT1, las cuales se encontraban dentro del rango aceptable.

En la estandarización de los sistemas de qPCR evaluados en células caco-2 presentaron amplificación en los controles sin templado, debido a la contaminación de sus respectivos primers, por lo que no fue posible optimizar estos sistemas ni realizar su análisis de expresión cuantitativa.

Los sistemas de qPCR evaluados son precisos y reproducibles pues muestran una variabilidad intra-ensayo aceptable que no supera el 3% en todos los genes.

Los ensayos de qPCR con SYBR Green permitieron evaluar el nivel de expresión de los genes de maduración de monocitos ICAM3, RUNX3, PPM1A y de la citocina TNF en células THP-1 estimuladas con LPS dentro del sistema de cultivo celular dual, en presencia y ausencia de butirato, cuyo análisis constituye una forma indirecta de evaluar el efecto del butirato sobre células epiteliales de intestino.

El análisis estadístico mediante pruebas no paramétricas permitió hacer comparaciones múltiples de medias e identificar los niveles de expresión e inhibición significativos de los genes evaluados en la línea celular monocítica.

Los niveles de expresión de todos los genes evaluados en el presente estudio corresponden a la respuesta biológica que se esperaba, de manera general, a medida que RUNX3 incrementa, ICAM3 se inhibe, mientras que la sobre expresión de TNF concuerda con un nivel bajo en el radio de PPM1A.

El incremento del nivel de expresión de ICAM3 y la disminución de RUNX3 a partir del día 14 en células tratadas con butirato y LPS, la diferencia significativa en la expresión de PPM1A entre muestras tratadas con butirato y las tratadas con LPS en el día 14 y en el día 21, y la diferencia significativa en la expresión de TNF entre células tratadas con butirato más LPS y tratadas con butirato son los resultados que sugieren que el butirato de sodio contrarresta el aumento de la permeabilidad de las células epiteliales inhibiendo la diferenciación de monocitos subepiteliales hacia macrófagos.

Una expresión mayor de ICAM3 y de PPM1A en células tratadas con butirato más LPS con respecto a las muestras sin tratamiento (control), una mayor expresión de PPM1A en comparación con TNF en células tratadas con butirato y una menor expresión de TNF en células tratadas butirato frente a las tratadas con LPS son resultados que también sugieren el favorecedor efecto del butirato de sodio sobre el

mantenimiento de la barrera intestinal, sin embargo, estas variaciones no son significativas.

La disminución en el radio de expresión de TNF en células tratadas con butirato y LPS y de RUNX3 en muestras tratadas con LPS en el día 21 y el aumento de ICAM3 a partir del día 14 en células tratadas con LPS sugieren que las células caco-2 alcanzaron la confluencia y se diferenciaron formando la monocapa epitelial, ya que había transcurrido el periodo necesario para que estas células maduren espontáneamente.

En base a los resultados obtenidos en los monocitos, se presume que el nivel de expresión de las proteínas de las uniones ocluyentes es mayor en las células que fueron tratadas con butirato en comparación con las que fueron tratadas solo con LPS.

Capítulo 6: Recomendaciones

Realizar la caracterización morfológica de la monocapa de células caco-2 mediante técnicas de microscopía electrónica.

Realizar la cuantificación relativa de los genes que codifican las proteínas de las uniones ocluyentes para evaluar de manera directa y corroborar que el butirato de sodio estimula la diferenciación de las células de epitelio intestinal, aumentando la expresión de dichas proteínas, por lo tanto, mejorando la función de barrera intestinal.

Reproducir los ensayos de cuantificación relativa realizados en esta investigación para evaluar el efecto que ejerce el butirato producido por una cepa probiótica de *Saccharomyces boulardii* modificada genéticamente.

Capítulo 7: Bibliografía

- Abbas, A. K. (2015). *Inmunología Celular y Molecular 8º Ed por Abbas, Abul K. - 9788490228944 - Journal*. (Elsevier Castellano, Ed.) (8va ed.). Barcelona.
- Andersen, C. L., Jensen, J. L., & Ørntoft, T. F. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research*, *64*(15), 5245–5250. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496>
- Anderson, J. M., & Van Itallie, C. M. (2009). Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *1*(2), a002584. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002584>
- Ando-Akatsuka, Y., Saitou, M., Hirase, T., Kishi, M., Sakakibara, A., Itoh, M., ... Tsukita, S. (1996). Interspecies diversity of the occludin sequence: CDNA cloning of human, mouse, dog, and rat-kangaroo homologues. *Journal of Cell Biology*, *133*(1), 43–47. <https://doi.org/10.1083/jcb.133.1.43>
- Applied Biosystems. (2010). *Power SYBR® Green RNA-to-CT™ 1-Step Kit*. Retrieved from <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4391003D.pdf>
- Applied Biosystems. (2014). *Real-time PCR handbook*. Carlsbad, CA, USA. Retrieved from <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/real-time-pcr-handbook.pdf>
- Asano, M., & Komiyama, K. (2011). Polymeric immunoglobulin receptor. *Journal of Oral Science*, *53*(2), 147–156. <https://doi.org/10.2334/josnusd.53.147>
- Bhat, A. A., Uppada, S., Achkar, I. W., Hashem, S., Yadav, S. K., Shan mugakonar, M., ... Uddin, S. (2019, January 23). Tight junction proteins and signaling pathways in cancer and inflammation: A functional crosstalk. *Frontiers in Physiology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01942>
- Bischoff, S., Barbara, G., Buurman, W., Ockhuizen, T., Schulzke, J.-D., Serino, M., ... Wells, J. (2014). Intestinal permeability, a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterology*, *14*. <https://doi.org/10.1186/s12876-014-0189-7>
- Boulangé, C. L., Neves, A. L., Chilloux, J., Nicholson, J. K., & Dumas, M.-E. (2016). Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease.

- Genome Medicine*, 8(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0303-2>
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., ... Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Bustin, S. A., & Nolan, T. (2008). *Analysis of mRNA Expression by Real-Time PCR*. Retrieved from <https://www.gene-quantification.de/bustin-nolan-horizonpress-2008.pdf>
- Buts, J.-P. (2005). Ejemplo de un medicamento probiótico: *Saccharomyces boulardii* liofilizada. *Revista de Gastroenterología Del Perú*, 25(2), 176–188. Retrieved from http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1022-51292005000200007
- Cani, P. D., Amar, J., Iglesias, M. A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., ... My Burcelin, R. (2007). Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes*, 56, 1761–1772. <https://doi.org/10.2337/db06-1491>
- Čepin, U. (2017). Real-Time PCR (qPCR) Technology Basics. Retrieved February 11, 2020, from <https://biosistemika.com/blog/qpcr-technology-basics/>
- Corrêa-Oliveira, R., Fachi, J. L., Vieira, A., Sato, F. T., & Vinolo, M. A. R. (2016). Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. *Clinical & Translational Immunology*, 5(4), e73. <https://doi.org/10.1038/cti.2016.17>
- De Angelis, I., & Turco, L. (2011). Caco-2 cells as a model for intestinal absorption. *Current Protocols in Toxicology*, Chapter 20(SUPPL.47). <https://doi.org/10.1002/0471140856.tx2006s47>
- de Fougères, A. R., & Springer, T. A. (1992). Intercellular adhesion molecule 3, a third adhesion counter-receptor for lymphocyte function-associated molecule 1 on resting lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 175(1), 185–190. <https://doi.org/10.1084/jem.175.1.185>
- Dharmaraj, S. (2017). The Basics: RT-PCR - EC. *Thermo Fisher Scientific*. Retrieved from [//www.thermofisher.com/ht/en/home/references/ambion-tech-support/rt-pcr-analysis/general-articles/rt-pcr-the-basics.html](https://www.thermofisher.com/ht/en/home/references/ambion-tech-support/rt-pcr-analysis/general-articles/rt-pcr-the-basics.html)
- Drouet, C., Shakhov, A. N., & Jongeneel, C. V. (1991). Enhancers and transcription

- factors controlling the inducibility of the tumor necrosis factor-alpha promoter in primary macrophages. *The Journal of Immunology*, 147(5).
- Duan, J., Nilsson, L., & Lambert, B. (2004). Structural and functional analysis of mutations at the human hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HPRT1) locus. *Human Mutation*, 23(6), 599–611. <https://doi.org/10.1002/humu.20047>
- Duque Correa, M. A., & Rojas López, M. (2007, April 1). Alternative macrophage activation: The diversity of one cell involved in innate immunity in response to its environmental complexity. *Inmunologia*. Ediciones Ergon SA. [https://doi.org/10.1016/s0213-9626\(07\)70077-x](https://doi.org/10.1016/s0213-9626(07)70077-x)
- Durack, J., & Lynch, S. V. (2019, January 1). The gut microbiome: Relationships with disease and opportunities for therapy. *Journal of Experimental Medicine*. Rockefeller University Press. <https://doi.org/10.1084/jem.20180448>
- Estecha, A., Aguilera-Montilla, N., Sánchez-Mateos, P., & Puig-Kröger, A. (2012). RUNX3 Regulates Intercellular Adhesion Molecule 3 (ICAM-3) Expression during Macrophage Differentiation and Monocyte Extravasation. *PLoS ONE*, 7(3), e33313. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033313>
- Flint, H. J., Duncan, S. H., Scott, K. P., & Louis, P. (2015). Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism. *Proceedings of the Nutrition Society*, 74(1), 13–22. <https://doi.org/10.1017/S0029665114001463>
- Fraga, D., Meulia, T., & Fenster, S. (2014). Real-Time PCR. *Current Protocols in Essential Laboratory Techniques*, 2014, 10.3.1-10.3.40. <https://doi.org/10.1002/9780470089941.et1003s08>
- Fusunyan, R. D., & Sanderson, I. R. (1998). Inflammatory Bowel Disease. In *Encyclopedia of Immunology* (pp. 1375–1381). Elsevier. <https://doi.org/10.1006/rwei.1999.0351>
- Genin, M., Clement, F., Fattaccioli, A., Raes, M., & Michiels, C. (2015). M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer*, 15, 577. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1546-9>
- Hidalgo, I. J., Raub, T. J., & Borchardt, R. T. (1989). *Characterization of the Human Colon Carcinoma Cell Line (Caco-2) as a Model System for Intestinal Epithelial*

- Permeability. GASTROENTEROLOGY* (Vol. 96). Retrieved from [https://www.gastrojournal.org/article/0016-5085\(89\)90897-4/pdf?referrer=https%3A%2F%2Fen.wikipedia.org%2F](https://www.gastrojournal.org/article/0016-5085(89)90897-4/pdf?referrer=https%3A%2F%2Fen.wikipedia.org%2F)
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., ... Sanders, M. E. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Hudson, L. E., McDermott, C. D., Stewart, T. P., Hudson, W. H., Rios, D., Fasken, M. B., ... Lamb, T. J. (2016). Characterization of the Probiotic Yeast *Saccharomyces boulardii* in the Healthy Mucosal Immune System. *PLOS ONE*, 11(4), e0153351. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153351>
- Ingels, F., Beck, B., Oth, M., & Augustijns, P. (2004). Effect of simulated intestinal fluid on drug permeability estimation across Caco-2 monolayers. *International Journal of Pharmaceutics*, 274(1–2), 221–232. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.01.014>
- Jin, J.-O., Zhang, W., Du, J.-Y., & Yu, Q. (2014). BDCA1-Positive Dendritic Cells (DCs) Represent a Unique Human Myeloid DC Subset That Induces Innate and Adaptive Immune Responses to *Staphylococcus aureus* Infection. <https://doi.org/10.1128/IAI.01851-14>
- Jin, X., Bu, Q., Zou, Y., Feng, Y., & Wei, M. (2018). Lewis-antigen-containing ICAM-2/3 on Jurkat leukemia cells interact with DC-SIGN to regulate DC functions. *Glycoconjugate Journal*, 35(3), 287–297. <https://doi.org/10.1007/s10719-018-9822-y>
- Kaetzel, C. S. (2005). The polymeric immunoglobulin receptor: bridging innate and adaptive immune responses at mucosal surfaces. *Immunological Reviews*, 206(1), 83–99. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00278.x>
- Kho, Z. Y., & Lal, S. K. (2018, August 14). The human gut microbiome - A potential controller of wellness and disease. *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01835>
- Kim, J.-A., Bayo, J., Cha, J., Choi, Y. J., Jung, M. Y., Kim, D.-H., & Kim, Y. (2019). Investigating the probiotic characteristics of four microbial strains with potential application in feed industry. *PLOS ONE*, 14(6), e0218922.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218922>

- Lea, T. (2015). Caco-2 cell line. In *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models* (pp. 103–111). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_10
- Lee, S. H. (2015). Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases. *Intestinal Research*, 13(1), 11–18. <https://doi.org/10.5217/ir.2015.13.1.11>
- Lee, Y., & Salminen, S. (2008). *Handbook of Probiotics and Prebiotics*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9780470432624>
- Levanon, D., Eisenstein, M., & Groner, Y. (1998, April 6). Site-directed mutagenesis supports a three-dimensional model of the runt domain. *Journal of Molecular Biology*. Academic Press. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.1633>
- Li, X., Zhang, C., Bian, Q., Gao, N., Zhang, X., Meng, Q., ... Chen, R. (2016). Integrative functional transcriptomic analyses implicate specific molecular pathways in pulmonary toxicity from exposure to aluminum oxide nanoparticles. *Nanotoxicology*, 10(7), 957–969. <https://doi.org/10.3109/17435390.2016.1149632>
- Li, Y. (2011). TTF1-induced apoptosis of HepG-2 cells through a mitochondrial pathway, 26, 651–657. <https://doi.org/10.3892/or.2011.1330>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Louis, P., & Flint, H. J. (2017). Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environmental Microbiology*, 19(1), 29–41. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13589>
- Lustbader, R. (2015). Primer Design: Tips for an Efficient Process. Retrieved September 4, 2020, from <http://www.genomecompiler.com/tips-for-efficient-primer-design/>
- Ma, X., Fan, P. X., Li, L. S., Qiao, S. Y., Zhang, G. L., & Li, D. F. (2012). Butyrate promotes the recovering of intestinal wound healing through its positive effect on the tight junctions. *Journal of Animal Science*, 90(SUPPL4), 266–268. <https://doi.org/10.2527/jas.50965>
- Mann, D. J., Campbell, D. G., McGowan, C. H., & Cohen, P. T. W. (1992). Mammalian

- protein serine/threonine phosphatase 2C: cDNA cloning and comparative analysis of amino acid sequences. *BBA - Gene Structure and Expression*, 1130(1), 100–104. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(92\)90471-B](https://doi.org/10.1016/0167-4781(92)90471-B)
- Mantovani, A., Sica, A., & Locati, M. (2005, October 1). Macrophage polarization comes of age. *Immunity*. Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.10.001>
- Monsuur, H. N., van den Broek, L. J., Koolwijk, P., Niessen, F. B., & Gibbs, S. (2018). Endothelial cells enhance adipose mesenchymal stromal cell-mediated matrix contraction via ALK receptors and reduced follistatin: Potential role of endothelial cells in skin fibrosis. *Journal of Cellular Physiology*, 233(10), 6714–6722. <https://doi.org/10.1002/jcp.26494>
- Morrison, D. J., & Preston, T. (2016). Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes*, 7(3), 189–200. <https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1134082>
- Müller-Esterl, W. (2004). *Biochemie: eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*. Elsevier, Spektrum, Akad. Verl.
- NCBI. (2017). HPRT1 gene. Retrieved February 11, 2020, from <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/HPRT1#normalfunction>
- Olszewski, M. B., Groot, A. J., Dastyk, J., & Knol, E. F. (2007). TNF Trafficking to Human Mast Cell Granules: Mature Chain-Dependent Endocytosis. *The Journal of Immunology*, 178(9), 5701–5709. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.9.5701>
- OMS. (2018). Noncommunicable diseases. Retrieved July 3, 2019, from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>
- Palital, F. (2015). Sodium butyrate in weaning piglets' diets stimulates intestinal health - Palital Feed Additives. Retrieved February 10, 2020, from <https://www.palital.com/en/sodium-butyrate-in-weaning-piglets-diets-stimulates-intestinal-health/>
- Park, H.-Y., Kunitake, Y., Hirasaki, N., Tanaka, M., & Matsui, T. (2015). Theaflavins enhance intestinal barrier of Caco-2 Cell monolayers through the expression of AMP-activated protein kinase-mediated Occludin, Claudin-1, and ZO-1. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 79(1), 130–137. <https://doi.org/10.1080/09168451.2014.951027>

- Peng, L., Li, Z. R., Green, R. S., Holzman, I. R., & Lin, J. (2009). Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. *Journal of Nutrition*, *139*(9), 1619–1625. <https://doi.org/10.3945/jn.109.104638>
- Pfaffl, M., Tichopad, A., Prgomet, C., & Neuvians, T. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, *26*(6), 509–515. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000019559.84305.47>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, *29*(9), 45e – 45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Plöger, S., Stumpff, F., Penner, G. B., Schulzke, J.-D., Gäbel, G., Martens, H., ... Aschenbach, J. R. (2012). Microbial butyrate and its role for barrier function in the gastrointestinal tract. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1258*(1), 52–59. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06553.x>
- Puig-Kröger, A., Aguilera-Montilla, N., Martínez-Nuñez, R., Domínguez-Soto, A., Sánchez-Cabo, F., Martín-Gayo, E., ... Corbí, A. L. (2010). The novel RUNX3/p33 isoform is induced upon monocyte-derived dendritic cell maturation and downregulates IL-8 expression. *Immunobiology*, *215*(9–10), 812–820. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2010.05.018>
- Rebane, R. (2016). Repeatability, intermediate precision and reproducibility. Retrieved September 8, 2020, from https://sisu.ut.ee/lcms_method_validation/41-precision-trueness-accuracy
- Rebouças, E. de L., Costa, J. J. do N., Passos, M. J., Passos, J. R. de S., Hurk, R. van den, & Silva, J. R. V. (2013). Real time PCR and importance of housekeeping genes for normalization and quantification of mRNA expression in different tissues. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *56*(1), 143–154. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132013000100019>
- Richards, J. L., Yap, Y. A., McLeod, K. H., Mackay, C. R., & Mariño, E. (2016). Dietary metabolites and the gut microbiota: an alternative approach to control inflammatory and autoimmune diseases. *Clinical & Translational Immunology*, *5*(5), e82. <https://doi.org/10.1038/cti.2016.29>

- Ríos-Covián, D., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilán, C. G., & Salazar, N. (2016). Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health. *Frontiers in Microbiology*, 7, 185. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00185>
- Said, H. M., & Ghishan, F. K. (2018). *Physiology of the gastrointestinal tract* (6th ed.). Academic Press.
- Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., ... Erlich, H. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487–491. <https://doi.org/10.1126/science.239.4839.487>
- Sánchez-Martín, L., Estecha, A., Samaniego, R., Sánchez-Ramón, S., Vega, M. Á., & Sánchez-Mateos, P. (2011). The chemokine CXCL12 regulates monocyte-macrophage differentiation and RUNX3 expression. *Blood*, 117(1), 88–97. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-12-258186>
- Sánchez de Medina, F., Romero-Calvo, I., Mascaraque, C., & Martínez-Augustin, O. (2014). Intestinal Inflammation and Mucosal Barrier Function. *Inflammatory Bowel Diseases*, 20(12), 2394–2404. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000204>
- Saqib, U., Sarkar, S., Suk, K., Mohammad, O., Baig, M. S., & Savai, R. (2018, April 1). Phytochemicals as modulators of M1-M2 macrophages in inflammation. *Oncotarget*. Impact Journals LLC. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24788>
- Schneeberger, E. E., & Lynch, R. D. (2004). The tight junction: a multifunctional complex. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 286(6), C1213–C1228. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00558.2003>
- Schweitzer, D. (2014). Is qPCR For You? An Introduction to qPCR Methods. Retrieved February 11, 2020, from <https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/features/is-qpcr-for-you/>
- Sigma-Aldrich. (2013). PCR/qPCR Data Analysis. Retrieved September 7, 2020, from <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/data-analysis.html>
- Smith, S. R., Schaaf, K., Rajabalee, N., Wagner, F., Duverger, A., Kutsch, O., & Sun, J. (2018). The phosphatase PPM1A controls monocyte-to-macrophage differentiation.

- Scientific Reports*, 8(1), 902. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18832-7>
- Stratagene. (2004). *Introduction to Quantitative PCR Methods and Application Guide*. California. Retrieved from https://wiki.qcbs.ca/_media/stratagene_introduction_to_quantitative_pcr_methods_and_application_guide.pdf
- Takashiba, S., Van Dyke, T. E., Amar, S., Murayama, Y., Soskolne, A. W., & Shapira, L. (1999). Differentiation of monocytes to macrophages primes cells for lipopolysaccharide stimulation via accumulation of cytoplasmic nuclear factor κ B. *Infection and Immunity*, 67(11), 5573–5578. <https://doi.org/10.1128/iai.67.11.5573-5578.1999>
- Tarze, A., Deniaud, A., Le Bras, M., Maillier, E., Molle, D., Larochette, N., ... Brenner, C. (2007). GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization. *Oncogene*, 26(18), 2606–2620. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210074>
- Thermo Fisher Scientific. (2016). RNA Isolation for qRT-PCR | Thermo Fisher Scientific - EC. Retrieved September 3, 2020, from <https://www.thermofisher.com/ec/en/home/references/ambion-tech-support/rtqpcr-analysis/general-articles/rna-isolation-for-qrt-pcr.html>
- Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., & Tada, K. (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *International Journal of Cancer*, 26(2), 171–176. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910260208>
- Tungland, B. (2018). Dysbiosis of the Microbiota: Therapeutic Strategies Utilizing Dietary Modification, Pro- and Prebiotics and Fecal Transplant Therapies in Promoting Normal Balance and Local GI Functions. In *Human Microbiota in Health and Disease* (pp. 381–419). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814649-1.00009-0>
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7), research0034.1. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>
- Venegas, D. P., De La Fuente, M. K., Landskron, G., González, M. J., Quera, R., Dijkstra, G., ... Hermoso, M. A. (2019, March 11). Short chain fatty acids (SCFAs) mediated

gut epithelial and immune regulation and its relevance for inflammatory bowel diseases. *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00277>

West, C. E., Renz, H., Jenmalm, M. C., Kozyrskyj, A. L., Allen, K. J., Vuillermin, P., ... Tulic, M. (2015). The gut microbiota and inflammatory noncommunicable diseases: Associations and potentials for gut microbiota therapies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 135(1), 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.11.012>

Wilfinger, W. W., Mackey, K., & Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques*, 22(3), 474–481. <https://doi.org/10.2144/97223st01>

Wong, M. L., & Medrano, J. F. (2005, May 30). Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*. Eaton Publishing Company. <https://doi.org/10.2144/05391RV01>

Anexos