



El Sistema de señalización de la Reelina en el cáncer de colon

100 μm

José Manuel Serrano Morales, Sevilla 2018

100 μm



Facultad de Farmacia

EL SISTEMA DE SEÑALIZACIÓN DE LA REELINA EN EL CÁNCER DE COLON

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

José Manuel Serrano Morales

DIRECTORES:

Dra. María José Peral Rubio

Dra. M^a Luisa Calonge Castrillo

Dr. Pablo García Miranda



Departamento de Fisiología

Facultad de Farmacia

Dña. MARÍA JOSÉ PERAL RUBIO, Dña. M^a LUISA CALONGE CASTRILLO, Profesoras Titulares de Universidad y D. PABLO GARCÍA MIRANDA, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Fisiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICAN:

Que D. José Manuel Serrano Morales, Licenciado en Farmacia y Licenciado en Bioquímica, ha realizado, bajo su dirección en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, la Tesis que lleva por título "EL SISTEMA DE SEÑALIZACIÓN DE LA REELINA EN EL CÁNCER DEL COLON" para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Y para que así conste, firman el presente certificado en Sevilla a 10 de junio de 2018.

María José Peral Rubio

M^a Luisa Calonge Castrillo

Pablo García Miranda

Este trabajo ha sido financiado por la Junta de Andalucía, “Proyecto de Investigación de Excelencia” (CTS-5884).

Parte de los resultados mostrados en la presente Memoria han dado lugar a las siguientes publicaciones:

- **JM Serrano-Morales**, MD Vázquez-Carretero, MJ Peral, AA Ilundain, P García-Miranda. Reelin-Dab1 signalling system in human colorectal cancer. *J Bioenerg Biomembr.* 2016 Nov 23. 48:569–579 DOI 10.1007/s10863-016-9689-1.
- **JM Serrano- Morales**, MD Vázquez-Carretero, AE Carvajal, ML Calonge, MJ Peral, AA Ilundáin, P García- Miranda. “Reelin expression in colon cancer progression in mice”. XXXVIII Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas (SECF) Zaragoza, 13-16 de septiembre, 2016. Carácter Internacional. Publicación: *J Physiol Biochem* (2016) 72 (Suppl 1):S104.
- AE Carvajal, **JM Serrano-Morales**, MD Vázquez-Carretero, P García-Miranda, ML Calonge, MJ Peral, AA Ilundain. Reelin protects from colon pathology by maintaining the intestinal barrier integrity and repressing tumorigenic genes. *Biochim Biophys Acta.* 2017 Sep;1863(9):2126-2134. DOI: 10.1016/j.bbadis.2017.05.026.

ABREVIATURAS

AC: Adenocarcinoma.

ACF: Focos de criptas aberrantes.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ADN complementario.

AOM: azoximetano.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNm: ARN mensajero.

DSS: Dextrano Sulfato Sódico.

DTT: ditioneitol.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

FITC: Isotiocianato de fluoresceína.

kb: kilo-base.

kDa: kilo-dalton.

pb: pares de bases.

PBS: tampón de fosfato y NaCl.

PBTW: tampón de PBS con Tween 20.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

RT: transcripción inversa.

SDS: dodecilsulfato sódico.

TBST: Tampón de TRIS-HCl, NaCl y Tween 20.

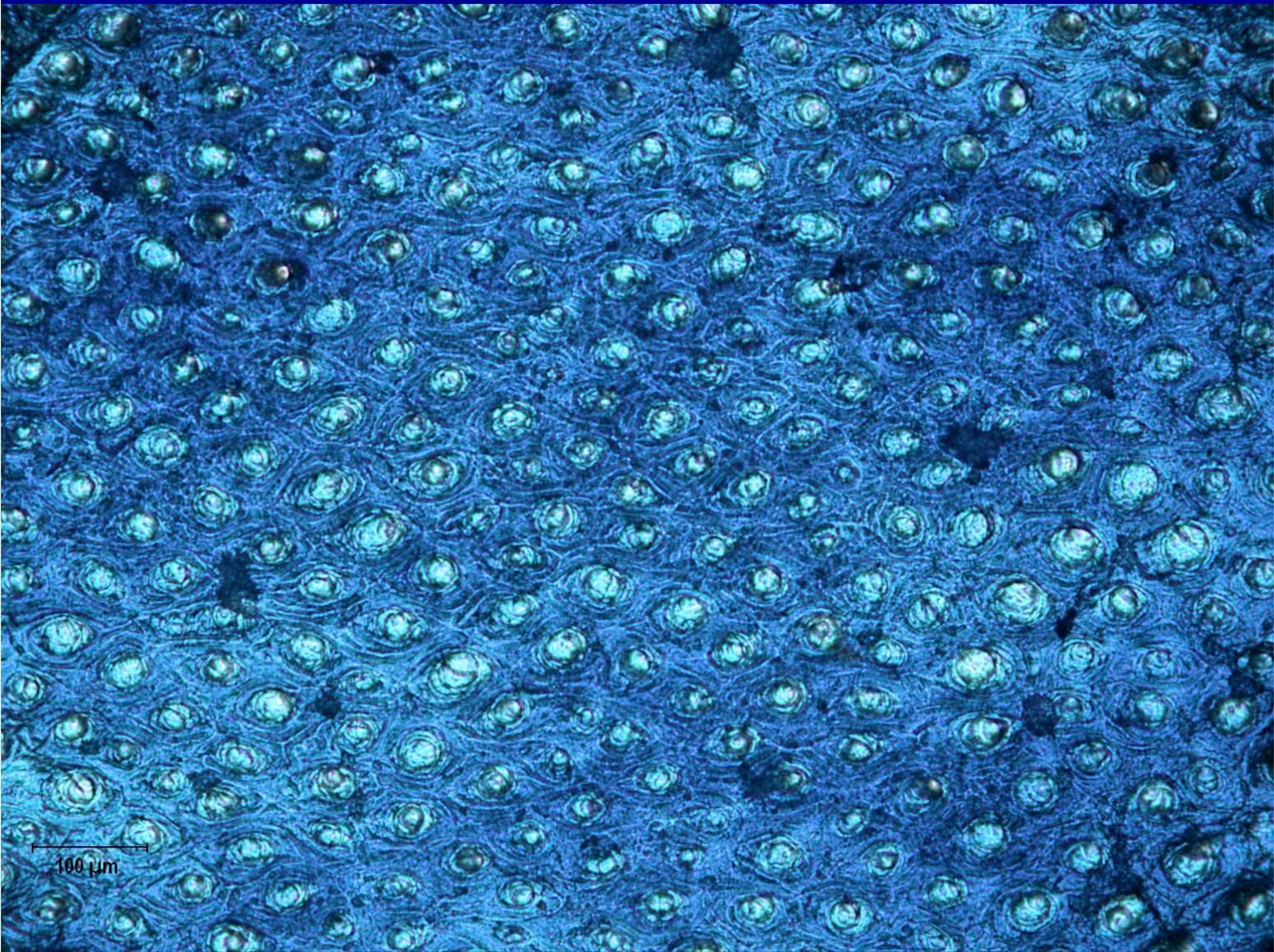
Tris: tris (hidroximetil) aminometano.

ÍNDICE

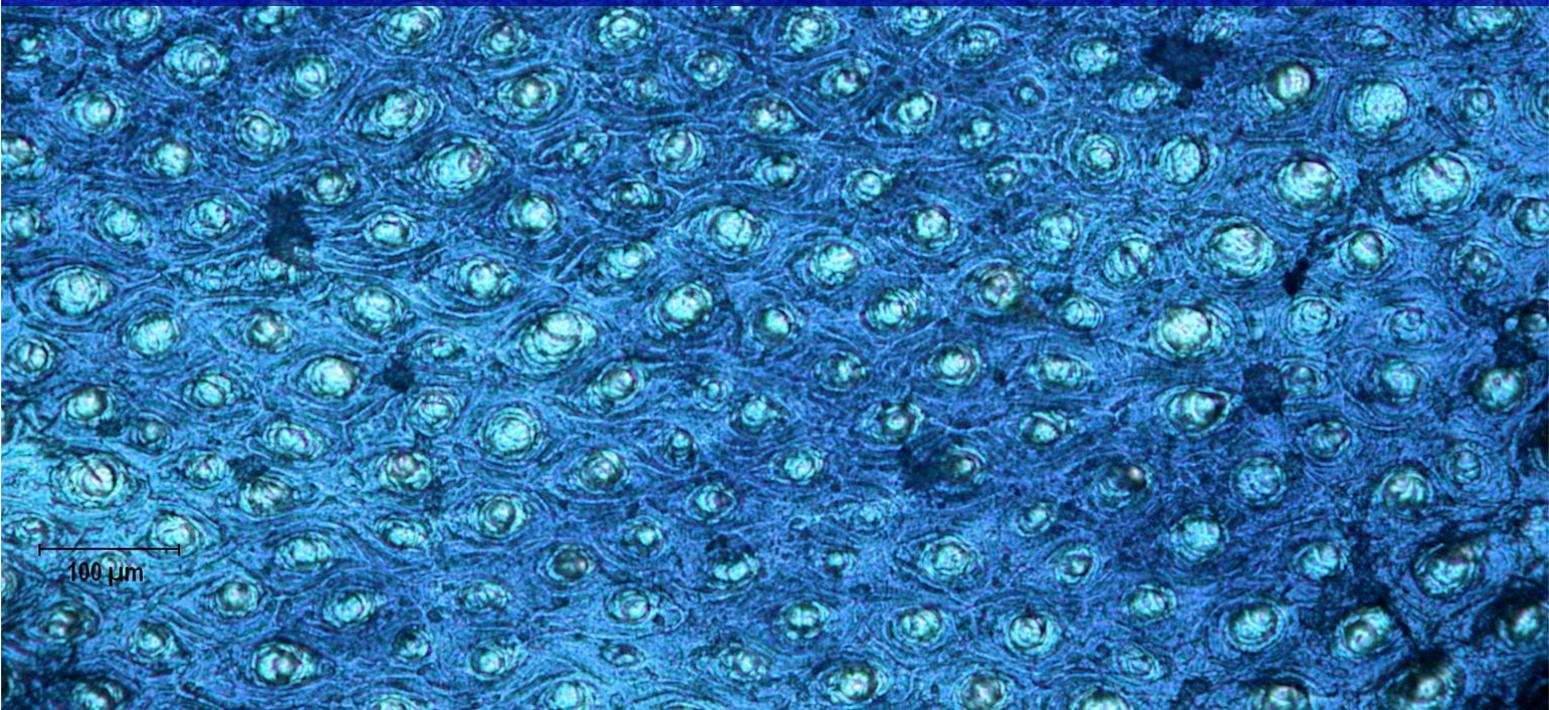
INTRODUCCIÓN.....	1
MORFOLOGÍA DEL COLON.....	1
CÁNCER DE COLON	4
DESARROLLO Y TIPOS DE CÁNCER DE COLON.....	5
MECANISMOS IMPLICADOS EN EL DESARROLLO DEL CÁNCER DE COLON.....	7
MODELOS PARA EL ESTUDIO DEL CÁNCER DE COLON.....	14
SISTEMA DE SEÑALIZACIÓN DE LA REELINA.....	16
La reelina.....	16
Los receptores y las vías de señalización.....	17
Regulación de la expresión de la reelina.....	18
Expresión y función de la reelina.....	20
OBJETIVOS DEL TRABAJO.....	23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
REACTIVOS.....	27
APARATOS.....	28
ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	29
GENOTIPADO DE RATONES.....	30
MATERIAL BIOLÓGICO.....	31
Muestras de tejido de ratón.....	31
Muestras de tejido humano.....	31
PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA SU OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO ÓPTICO.....	32

MODELOS EXPERIMENTALES DE RATÓN.....	33
Inflamación intestinal aguda.....	33
Criptas aberrantes.....	33
Pólipos.....	34
Adenocarcinoma de colon.....	34
Adenocarcinoma de colon asociado a colitis.....	35
EVALUACIÓN DE LOS MODELOS EXPERIMENTALES.....	35
Inflamación intestinal aguda.....	35
Criptas aberrantes.....	35
Pólipos y adenocarcinomas de colon.....	37
Adenocarcinoma de colon asociado a colitis.....	37
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) EN TIEMPO REAL.....	38
INMUNOHISTOQUÍMICA.....	41
Inmunohistoquímica en secciones obtenidas con el criostato.....	41
Inmunohistoquímica en secciones de parafina.....	42
ANÁLISIS DE WESTERN BLOT.....	43
MEDIDA DEL GRADO DE METILACIÓN DEL ADN GENÓMICO.....	45
PRESENTACIÓN DE LOS RESULTADOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	45
RESULTADOS.....	47
CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA DE SEÑALIZACIÓN DE LA REELINA-DAB1 EN EL COLON HUMANO.....	49
Expresión de los genes reelina, VldLR, ApoER2 y Dab1 en el colon humano.....	49
Inmunolocalización de las proteínas reelina, VldLR, ApoER2 y Dab1 en el colon humano.....	50

EL SISTEMA DE SEÑALIZACIÓN DE LA REELINA EN EL CÁNCER DE COLON HUMANO.....	52
Inmunolocalización del sistema de señalización de la reelina-Dab1 en el colon normal humano y en adenocarcinoma de colon.....	52
Expresión de reelina, Dab1, ApoER2, VLDLR y α -SMA en el colon normal humano y adenocarcinoma de colon.....	54
Expresión de E-cadherina, vimentina y N-cadherina en el colon normal y en adenocarcinoma de colon.....	57
Expresión de reelina en la progresión de la enfermedad inflamatoria al cáncer de colon humano.....	58
Regulación de la expresión del gen de la reelina en el cáncer de colon humano.....	60
EFFECTO DE LOS TRATAMIENTOS DE AZOXIMETANO Y/O DSS EN LA EXPRESIÓN DE REELINA.....	63
Efecto de los tratamientos de AOM y de AOM/DSS en el colon de ratón.....	63
Expresión de la reelina en la progresión de la enfermedad inflamatoria al cáncer de colon en ratón.....	68
Expresión de los genes DNMT1, Cask, ApoER2 y TGF- β 1 en la transición y progresión del cáncer de colon en ratón.....	71
EFFECTO DEL TRATAMIENTO DE AOM/DSS EN RATONES CONTROL Y REELER..	73
EFFECTO DE LA AUSENCIA DE REELINA SOBRE LA PROTEÍNA p53 EN EL COLON DE RATÓN.....	76
DISCUSIÓN.....	81
CONCLUSIONES.....	91
BIBLIOGRAFÍA.....	95
CURRICULUM VITAE.....	117
PUBLICACIONES.....	127



Introducción



MORFOLOGÍA DEL COLON

El tracto intestinal de los mamíferos se divide morfológica y funcionalmente en dos regiones bien diferenciadas: intestino delgado y grueso. El intestino grueso está especializado en absorber la mayor parte del agua y sales inorgánicas del quimo, compactándolo para ser eliminado en forma de heces. Anatómicamente se divide en ciego, colon y recto. A su vez, en el colon se distinguen el colon ascendente, transverso, descendente y sigmoideo. La pared del colon está dividida en las siguientes capas (desde la luz hacia la zona basal): mucosa, submucosa, muscular y serosa. La capa mucosa se subdivide en epitelio, lámina propia y capa muscular de la mucosa.

El epitelio del colon es un epitelio cilíndrico simple que está en contacto con la luz del tubo y forma profundas invaginaciones hacia el interior de la lámina propia (tejido conectivo laxo) denominadas criptas de Lieberkühn. Este epitelio está en continua y rápida renovación, de forma que se reemplaza totalmente en 3-4 días aproximadamente mediante una secuencia bien organizada de proliferación, diferenciación, muerte y descamación celular. Estos procesos están muy regulados a fin de mantener la homeostasis del epitelio intestinal. Su renovación celular se produce a partir de las células madre multipotentes localizadas en la base de las criptas que se diferencian, dando lugar a las células absortivas o colonocitos, las células goblet o caliciformes y las células enteroendocrinas (Figura 1). Los tres tipos celulares

se van diferenciando y adquiriendo polaridad, morfología y función propias a medida que migran hacia la superficie epitelial. Cuando llegan a esta zona, las células mueren por anoikis, apoptosis, necrosis o necroptosis (Günther y cols., 2013) y se exfolian a la luz del intestino (ver revisiones van der Flier y Clevers, 2009; Sellers y Morton, 2014). Otros tipos de células que se han identificado más recientemente en el epitelio del intestino delgado y del colon son las células brush, que presentan analogía estructural con las células receptoras de los botones gustativos (ver revisión de Sbarbati y Osculati, 2005) y las células M, que se localizan en las placas de Peyer y en los folículos linfáticos y tienen funciones de defensa (ver revisiones Miller y cols., 2007).

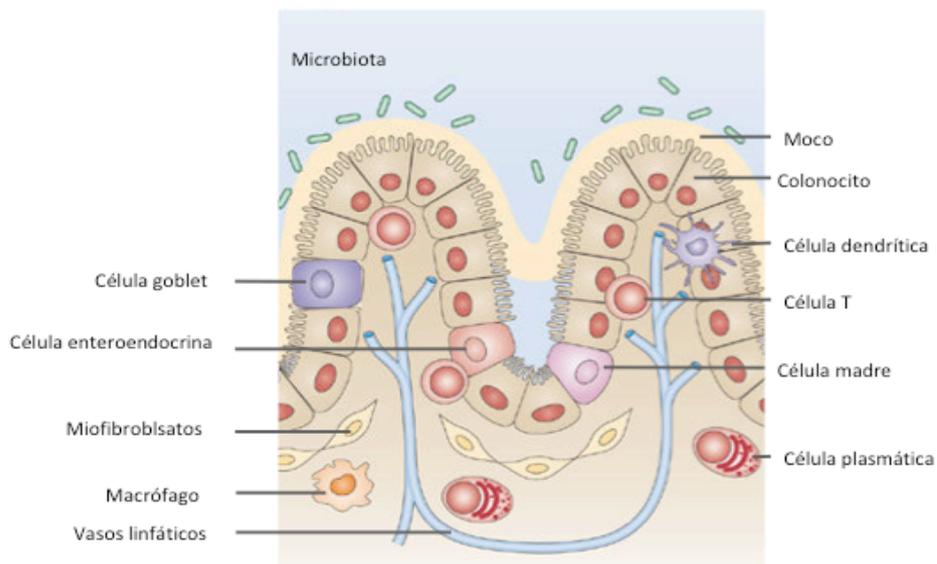


Figura 1. Esquema de la mucosa del colon. Se muestran, entre otros, las distintas células que componen el epitelio, otros componentes de la barrera intestinal y algunas células de la lámina propia, como los miofibroblastos (Adaptado de Abreu, 2010).

Los colonocitos, junto con las células caliciformes, son las más abundantes. En su zona apical presentan microvellosidades cortas e irregulares, que absorben agua y sales minerales fundamentalmente, aunque también pueden absorber algunos hidratos de carbono, proteínas (Nordgaard y cols., 1996) y vitaminas hidrosolubles (ver revisión de Said, 2011). Actúan como una barrera que impide el paso de sustancias nocivas (antígenos, microorganismos y toxinas) al medio interno y como un filtro selectivo, que permite el paso selectivo de sustancias desde la luz a la circulación (ver revisión de Noah y cols., 2011).

Las células goblet o caliciformes, sintetizan y secretan un moco que supone la primera línea de defensa contra los patógenos intestinales (Belley y cols., 1999).

Entre el epitelio y el tejido conectivo subyacente se encuentra, separándolos, la membrana basal. Ésta es rica en matriz extracelular, conteniendo proteínas estructurales, como glicoproteínas o distintos tipos de colágeno; y no estructurales, como factores de crecimiento y prostaglandinas (ver revisión de Simon-Assmann y cols., 1995).

La lámina propia es un tejido conjuntivo laxo que proporciona soporte al epitelio y contiene los vasos sanguíneos y linfáticos, linfocitos, fibras nerviosas, células mesenquimales como pericitos, fibroblastos y miofibroblastos, y otros tipos celulares como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas y linfocitos (Figura 1).

Los miofibroblastos subepiteliales se localizan por debajo de la membrana basal rodeando las criptas y formando un sincitio tridimensional que se extiende por la lámina propia, permitiendo su conexión con los fibroblastos. Tienen características morfológicas y funcionales de fibroblastos y de células del músculo liso. Así, por ejemplo, expresan proteínas como la α -actina del músculo liso (α -SMA) (Joyce y cols., 1987) considerada como marcador de los miofibroblastos subepiteliales. Además, expresan y secretan un extenso repertorio de citoquinas, factores de crecimiento, hormonas, mediadores de inflamación y proteínas de la matriz extracelular (colágeno y proteínas de adhesión) así como proteínas que modifican dicha matriz como las metaloproteinasas. También expresan receptores para muchos de estos ligandos, lo que permite a estas células mediar un flujo de información paracrina y autocrina hacia y desde las células epiteliales, las del sistema inmune y otras células mesenquimales de la lámina propia. De esta forma, los miofibroblastos desempeñan funciones importantes en la homeostasis de las células del epitelio intestinal, regulando su proliferación y diferenciación, en procesos inflamatorios e inmunológicos y en la regeneración y reparación de lesiones de la mucosa intestinal. Trastornos en dichas interacciones, debidos a alteraciones fenotípicas de los miofibroblastos, han sido

asociadas a la formación de tumores intestinales (ver revisión de Pinchuk y cols. 2010; Powell y cols., 2011).

La capa submucosa está formada por tejido conectivo denso, que presenta gran cantidad de vasos sanguíneos y el plexo nervioso de Meissner. El colon presenta también una capa muscular considerablemente más gruesa que en el intestino delgado, formada por dos subcapas: circular interna y longitudinal externa. Entre las dos subcapas musculares se encuentra el plexo mientérico de Auerbach.

CÁNCER DE COLON

El tipo de cáncer de colon más frecuente es el adenocarcinoma. Aparece en el 90-95% de los casos de cáncer de colon y se produce en la mucosa que recubre el interior del colon y recto. En España, este tipo de cáncer es el tercero en frecuencia en varones, detrás del cáncer de pulmón y próstata. En mujeres es el segundo en frecuencia, detrás del de mama. Sin embargo, teniendo en cuenta ambos sexos, es el tipo de cáncer más frecuente con más de 41.000 nuevos casos al año. Afecta a 1 de cada 20 hombres y a 1 de cada 30 mujeres menores de 74 años (datos de la Asociación Española Contra el Cáncer, AECC, 09-03-2017).

El proceso de carcinogénesis en el colon es largo, pudiendo tardar varios años en alcanzar el estadio avanzado. En este proceso influyen la interacción con el ambiente, las alteraciones genéticas y la respuesta adaptativa del huésped. La clasificación TNM (tumor, lymph nodes, metastasis) es el sistema más utilizado para determinar el estado de desarrollo del cáncer y hace referencia a la extensión del tumor primario en las paredes del intestino (T), la afectación de ganglios linfáticos (N) y la presencia de metástasis (M). Se añade un número a cada letra para indicar el tamaño o extensión del tumor y la extensión de la diseminación (Union for International Cancer Control, UICC). Mediante este sistema se establecen las etapas o fases del cáncer de colon (Figura 2). De forma resumida:

Estadio 0: es la fase más temprana del cáncer de colon. Las células tumorales se encuentran situadas en la parte más superficial de la mucosa pero no la traspasa. No afecta a ganglios linfáticos.

Estadio I: el tumor afecta a la pared del colon o del recto (mucosa y submucosa) sin traspasar la capa muscular. No existe afectación de ganglios linfáticos.

Estadio II: el tumor ha infiltrado todas las capas de la pared del colon o recto. No hay afectación de ganglios linfáticos.

Estadio III: el cáncer ha invadido los órganos más próximos, y afecta a los ganglios linfáticos.

Estadio IV: el cáncer se ha diseminado afectando a órganos alejados. Hay metástasis.

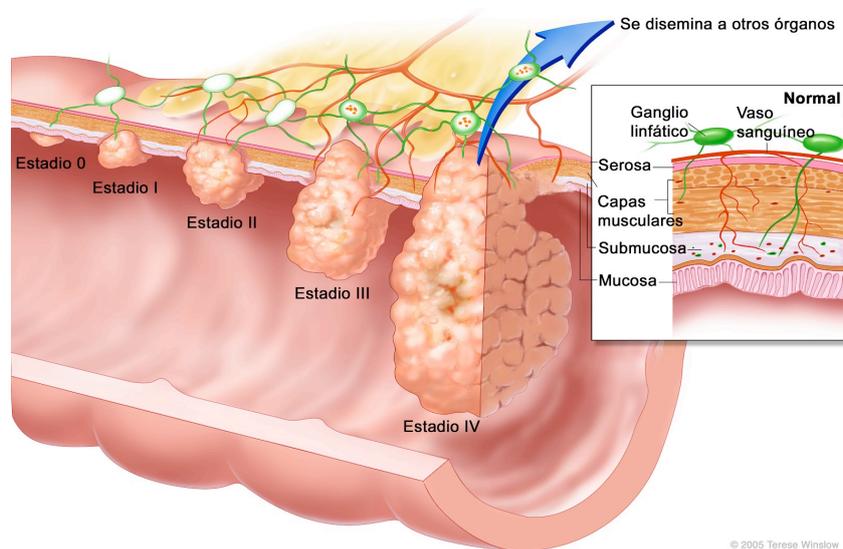


Figura 2. Estadios del cáncer de colon (Winslow T., 2005).

DESARROLLO Y TIPOS DE CANCER DE COLON

La mayoría de los casos de cáncer de colon son esporádicos, lo que significa que su causa es inespecífica o indeterminada. Su desarrollo se produce en etapas que van desde lesiones en la cripta del colon a través de la formación de pólipos o adenomas hasta el desarrollo del cáncer. Uno de los eventos más tempranos es la alteración del patrón proliferativo de las células epiteliales en las criptas del colon, asociado a un trastorno en el control de la muerte celular programada (apoptosis). Como consecuencia de un desequilibrio entre dicha proliferación y apoptosis, se desarrollan criptas morfológicamente anormales en la superficie de la mucosa del colon, que se

denominan **focos de criptas aberrantes** (FCA), siendo éstas la primera alteración apreciable en el epitelio (ver revisión de Alrawi y cols., 2006). La primera descripción de estos focos fue realizada en 1987 por Bird, quien observó al microscopio óptico, criptas aberrantes en la mucosa del colon de ratones tratados con un agente carcinogénico, azoximetano. Estos focos están formados por una o más criptas aberrantes que aparecen como un foco redondeado y aislado. Las criptas aberrantes se diferencian de las normales en que son más grandes, formadas por un mayor número de células (hiperplasia), tienen un epitelio más grueso que se tiñe más oscuro, presentan un área pericriptica mayor y aparecen elevadas sobre las criptas adyacentes (McLellan y Bird, 1988). Estas lesiones identificadas inicialmente en ratones expuestos a carcinógenos, se han detectado en el colon de pacientes con cáncer de colon en zonas adyacentes a los tumores con características morfológicas e histológicas similares a las descritas en los ratones (Roncucci y cols., 2000; Fenoglio-Preiser y Noffsinger 1999; López-Ceron y Pellise, 2012). Al igual que en los ratones, estos focos de criptas aberrantes, se consideran lesiones precancerosas o precursoras del cáncer de colon (ver revisión de Alrawi y cols., 2006).

Las criptas aberrantes pueden evolucionar hasta la formación de **pólipos**, que son acumulaciones anormales de células visibles macroscópicamente, las cuales se proyectan en la superficie de la mucosa hacia el lumen. Aunque la mayoría de pólipos son benignos y no progresan a cáncer, sin embargo, gran parte de los tumores malignos de colon se desarrollan sobre lesiones ya existentes en la mucosa. Existen algunos tipos de pólipos, en concreto, los pólipos adenomatosos o **adenomas** que son lesiones con tejido displásico (tejido con daño en el ADN de sus células, que sufren anomalías en el proceso de maduración), y que tienen mayor riesgo de sufrir transformaciones hacia el cáncer de colon. Cuando en el adenoma el grado de displasia es mayor y las mutaciones sufridas no son reparadas, se llega a la formación del **adenocarcinoma**. Estas alteraciones que tienen lugar de forma progresiva en la mucosa del colon y que conllevan a la formación del tumor reciben el nombre de **secuencia adenoma-carcinoma** (Figura 3) (Terzić y cols., 2010).

Aunque la mayoría de los tumores de colon son considerados esporádicos, no obstante, un porcentaje significativo de casos son formas hereditarias, la más conocida

es la Poliposis Adenomatosa Familiar, o están asociados a una enfermedad inflamatoria intestinal como la colitis ulcerosa (ver revisión de Subramaniam y cols., 2016).

En el caso del cáncer asociado a colitis, la evolución sigue una secuencia desde el tejido inflamado, pasando por diferentes grados de displasia y pudiendo llegar a formar un adenocarcinoma invasivo, llamada **secuencia inflamación-displasia-carcinoma**. En este proceso confluyen una disfunción en la regulación del sistema inmunitario, de la microbiota intestinal y de la reparación del epitelio frente a la inflamación (ver revisión de Low y cols., 2014).

A pesar de distinguir estas formas de cáncer de colon que pueden tener secuencias distintas, todos los tipos de cáncer de colon tienen similitudes y en todos ellos se han identificado focos de criptas aberrantes, pólipos, adenomas y adenocarcinomas (Terzić y cols., 2010).

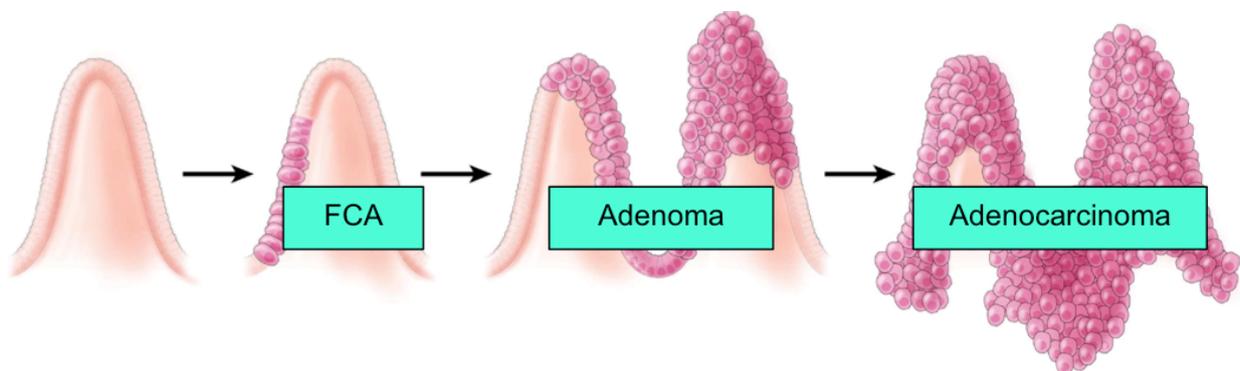


Figura 3. Secuencia adenoma-carcinoma. Se muestra la progresión del cáncer de colon (Terzić y cols., 2010).

MECANISMOS IMPLICADOS EN EL DESARROLLO DEL CÁNCER DE COLON

El cáncer de colon es un proceso multifactorial en el que están implicados factores genéticos, epigenéticos y ambientales. Aunque los mecanismos moleculares por los que ocurre son poco conocidos, se sabe que la transformación tumoral se inicia en la mucosa del colon a nivel de las criptas. Se han identificado alteraciones en numerosas moléculas y vías de señalización que regulan la homeostasis del eje cripta-

superficie epitelial del colon, entre ellas, Wnt/ β -catenina, TGF- β (factor de crecimiento transformante tipo β), BMP (proteína morfogenética del hueso), K-RAS (“Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog”), APC (“Adenomatous Poliposis Coli”) y p53 (proteína supresora de tumores p53), que pueden inducir la transformación neoplásica del epitelio intestinal provocando el inicio, desarrollo y progresión del cáncer de colon (ver revisiones Bertrand y cols., 2012; Hagland y cols., 2013).

Aunque los mecanismos que pueden desencadenar el desarrollo y progresión del cáncer de colon (secuencia adenoma-carcinoma) son muy variados, todos tienen en común que conllevan una gran inestabilidad genómica. Ésta se produce por diferentes vías moleculares, entre ellas, la de inestabilidad cromosómica o en microsatélites y la de metilación del ADN. Como consecuencia de la pérdida de estabilidad genómica se promueve la acumulación de múltiples mutaciones en diversos genes reguladores que confieren a las células un aumento en la capacidad de proliferación y de supervivencia (Schulmann y cols., 2005; Grady y Carethers, 2008).

Los genes afectados se dividen en tres grupos: i) los proto-oncogenes, cuya función es estimular la proliferación celular, ii) los genes supresores de tumores, que inhiben la proliferación celular y iii) los genes reparadores del ADN, responsables de corregir los errores producidos durante la replicación y de reparar las alteraciones inducidas por agentes externos. La sobreactivación de los proto-oncogenes, la pérdida de función de los genes supresores de tumores y la incapacidad para la reparación del ADN promueven la transformación tumoral (ver revisión de Knudson, 2002; Vogelstein y Kinzler, 2004).

La inestabilidad cromosómica sucede en la mayoría de los cánceres de colon y afecta a los proto-oncogenes y a los genes supresores de tumores. Sin embargo, la inestabilidad de los microsatélites (secuencias de ADN en las que un fragmento de pocos pares de bases se repite consecutivamente) afecta a los genes de reparación del ADN (Lindblom, 2001; Samstein y Chan, 2017).

Entre los genes en los que se han identificado mutaciones podemos destacar:

El proto-oncogen **K-RAS** (gen que codifica una proteína que participa en el crecimiento, maduración y muerte celular) se encuentra mutado con alta frecuencia (40-50%) en fases tempranas del desarrollo del cáncer de colon. K-RAS es una GTPasa implicada en la iniciación de varias vías de señalización. Las mutaciones de K-RAS producen una hiperactivación del proto-oncogen BRAF (“v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B”), que activa MAPK (“Mitogen-Activated Protein Kinase”) la cual actúa directamente en la regulación génica (Hagland y cols., 2013). Además, se ha descrito que actúa sobre las vías de señalización RAF-MEK-ERK y sobre la PI3K-Akt (fosfatidilinositol 3-quinasa /proteína quinasa B), produciendo alteraciones de las células y tumoración (ver revisión de Lee y cols., 2018).

Alteraciones en el gen **supresor de tumores APC** que conducen a la formación de una proteína truncada no funcional son responsables de una forma hereditaria de cáncer de colon, la poliposis adenomatosa familiar (Caspari y cols., 1994). La pérdida de función de la proteína APC hace que las células que han empezado la diferenciación dejen de migrar y continúen proliferando en la base de las criptas, contribuyendo a la formación de tumores en el colon (Kinzler y Vogelstein., 1996; Ficari y cols., 2000). APC forma parte de la vía de señalización Wnt/APC/ β -catenina y se ha demostrado que impide la localización nuclear de la β -catenina y, por lo tanto, la expresión de muchos genes carcinogénicos, como por ejemplo: c-myc, que controla el crecimiento neoplásico, la ciclina D1 que controla la progresión del ciclo celular y las metaloproteinasas de la matriz que favorecen la invasión tumoral (ver revisión de Fredericks y cols., 2015). En la formación de tumores, la activación de la vía Wnt lleva a la degradación proteolítica de APC y a una traslocación de la β -catenina al núcleo (Kobayashi y cols., 2000). Las alteraciones de la vía Wnt/APC/ β -catenina son responsables del 90% de los casos de cáncer de colon esporádico (ver revisión de Fredericks y cols., 2015).

Junto con el gen APC otro gen supresor de tumores es el **p53** (gen que codifica una factor de transcripción nuclear supresor de tumores) que se encuentra alterado en aproximadamente el 80% de los casos de cáncer de colon (Li y cols., 2015). La pérdida

de función de p53 lleva a una mayor acumulación de mutaciones en otros genes, por lo que estos tumores suelen ser más agresivos.

De los factores epigenéticos implicados en el desarrollo del cáncer de colon, cuyo efecto no conlleva cambios en la secuencia de ADN, destacan la metilación de las islas CpG del promotor del gen, en la que se añaden grupos metilo a las citosinas, y las modificaciones de histonas (ver revisión de Subramaniam y cols., 2016). Alteraciones en esta regulación de la expresión génica pueden afectar a genes relacionados con el desarrollo de patologías intestinales como la inflamación y el cáncer de colon. En este último, la alteración predominante es la hipermetilación de las islas CpG del promotor de genes supresores de tumores y de otros genes, lo que produce un silenciamiento con pérdida en la traducción de proteínas, alterando el ciclo celular, la reparación del ADN, la adhesión celular y la apoptosis (ver revisión de Fredericks y cols., 2015).

La inflamación crónica y la desregulación del sistema inmune son factores de riesgo para el desarrollo de mutaciones en las células del epitelio intestinal, que pueden desencadenar el desarrollo de cáncer de colon asociado a colitis. La colitis puede aparecer desde edades tempranas, por lo que el cáncer asociado a inflamación suele aparecer en pacientes más jóvenes que el esporádico. Además, el desarrollo del cáncer está relacionado con la severidad de la inflamación, así pacientes con inflamación crónica y una evolución larga son más susceptibles para desarrollar tumores (ver revisión de Subramaniam y cols., 2016).

Los mecanismos moleculares implicados en la iniciación y desarrollo del tumor difieren entre el cáncer de colon esporádico y el asociado a colitis (Figura 4). En el inicio del cáncer de colon esporádico las mutaciones de los proto-oncogenes y/o genes supresores de tumores son debidos a la inestabilidad cromosómica, de microsatélites y a la metilación de las islas CpG. Sin embargo, en el cáncer asociado a colitis parecen ser el aumento del estrés oxidativo y el exceso de citoquinas pro-inflamatorias los que provocan las alteraciones en dichos genes. Los cambios genéticos y epigenéticos contribuyen también al desarrollo de los estadios más tardíos del cáncer asociado a colitis (Subramaniam y cols., 2016).

Además, también existe una diferencia temporal en la producción de las alteraciones de los genes responsables del desarrollo de ambos tipos de cáncer de colon (Figura 4). Así, la pérdida del gen APC y las mutaciones en K-Ras y BRAF ocurren de manera más temprana en el cáncer esporádico. La inactivación de un solo alelo del gen APC es suficiente para la aparición de pólipos adenomatosos en el colon (Fodde y Smits, 2001). Sin embargo, las mutaciones en el gen p53 ocurren de forma más temprana en el cáncer asociado a colitis, apareciendo de forma más tardía en adenocarcinomas grandes de pacientes con cáncer de colon esporádico (Subramaniam y cols., 2016). También se ha descrito que citoquinas o la activación de NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) producen mutaciones en p53 en la mucosa inflamada y en los estadios iniciales del cáncer de colon asociado a colitis (Xie y cols., 2008). La activación de la β -catenina ocurre en estadios tempranos tanto en el cáncer de colon esporádico como en el asociado a colitis (Subramaniam y cols., 2016). Durante la inflamación aguda y crónica la activación del factor de necrosis tumoral tipo α (TNF- α), de la prostaglandina E2 (PGE2), del factor NF- κ B, y de la vía Akt conllevan a la activación de la β -catenina que favorece la proliferación y el desarrollo del cáncer de colon (Castellone y cols., 2005; Kaler y cols., 2009b).

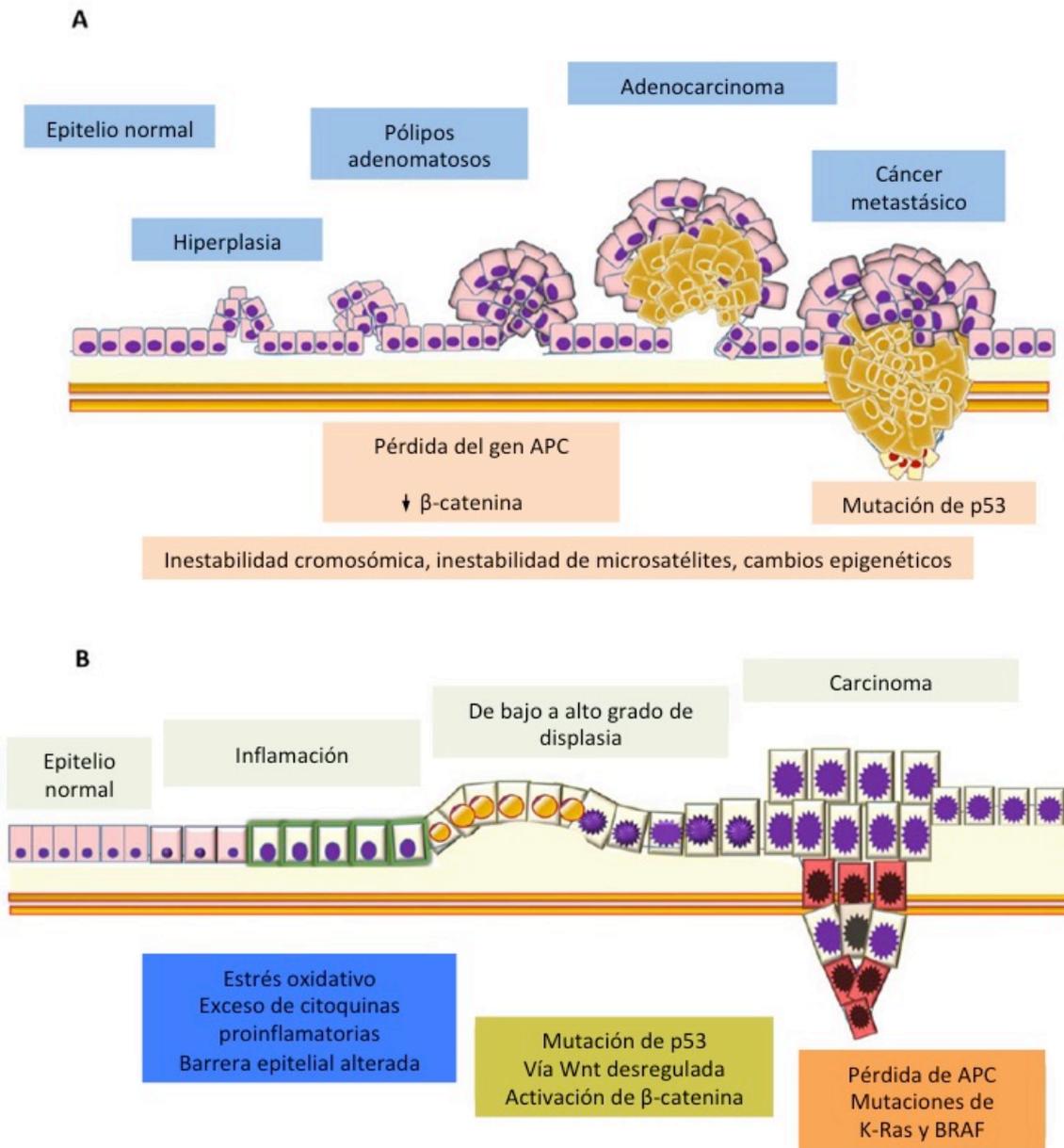


Figura 4. Mecanismos implicados en desarrollo y progresión del cáncer de colon. A: Cáncer esporádico **B:** Cáncer de colon asociado a colitis (Adaptado de Subramaniam y cols., 2016).

Los miofibroblastos intestinales además de contribuir a la homeostasis epitelial, la reparación tisular, inflamación, angiogénesis y fibrosis también están implicados en la carcinogénesis (ver revisiones de Powell y cols. 2005; Mifflin y cols., 2011). Se ha descrito que son las células mesenquimales las que primero se afectan en los procesos tumorales del tracto gastrointestinal y segregan muchos factores fundamentales en el microambiente del tumor (Vermeulen y cols., 2010). La citoquina TNF- α estimula los miofibroblastos e induce la expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y la unión de su ligando EGF activa la vía de señalización que aumenta la expresión de la ciclooxigenasa 2 (Cox2). Cox2 y otros factores segregados por los miofibroblastos como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) favorecen la angiogénesis, necesaria para el crecimiento y la invasión de las células tumorales (Subramaniam y cols., 2016).

Otro proceso implicado en la progresión y metástasis del cáncer de colon es la transición epitelio-mesénquima (TEM). En dicha transición, se produce una pérdida de E-cadherina de las uniones intercelulares, las células epiteliales expresan componentes mesenquimales, como vimentina y N-cadherina y manifiestan fenotipo migratorio (Kang y Massague, 2004). Este proceso está regulado especialmente por la vía de señalización TGF- β /SMAD/Snail/TEM. También NF- κ B y STAT3 y las citoquinas pro-inflamatorias, tales como TNF- α , IL-6 e IL-8 intervienen y mantienen la TEM (Subramaniam y cols., 2016).

Otras células con fenotipo mesenquimal, implicadas en la formación de tumores y que se localizan en el microambiente del tumor son los llamados fibroblastos asociados al cáncer (FAC), con morfología parecida a los miofibroblastos (Figura 5). La población de FACs es muy heterogénea, su origen celular puede ser muy variado dependiendo del tipo de tumor, entre otras células pueden proceder de fibroblastos normales, células madre mesenquimales, células epiteliales o endoteliales mediante el proceso de TEM. Los FACs están constantemente activados, no revertiéndose su fenotipo a la normalidad ni pudiendo sufrir apoptosis. Además contribuyen al desarrollo del cáncer modificando el microambiente en el que se desarrolla el tumor, secretando factores de crecimiento como TGF- β 1 y FGF (Xing y

cols., 2011). Aunque hay una gran variabilidad en las proteínas que expresan las distintas poblaciones de FACs, se utilizan como marcadores, principalmente, la proteína específica de fibroblastos 1 (FSP-1) y la proteína activadora de fibroblastos (FAP) (Bussard y cols., 2016). Los FACs promueven el desarrollo y progresión del tumor mediante la regulación de la inflamación intestinal, la estimulación de la proliferación epitelial y la angiogénesis, el mantenimiento de las células madre, la remodelación de la matriz extracelular y la metástasis (Koliaraki y cols., 2017).

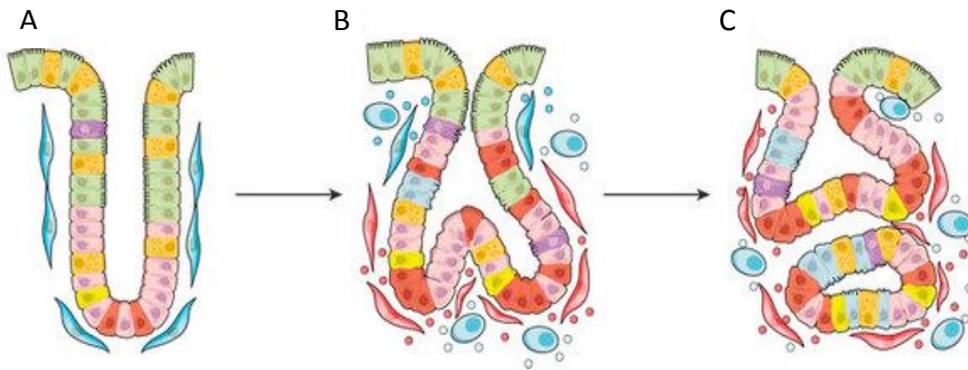


Figura 5. Miofibroblastos y células epiteliales en la secuencia adenoma-carcinoma. **A**, organización normal de una cripta. **B**, transformación de la cripta hacia adenoma con células mieloides (redondas y azules), miofibroblastos (azules) y fibroblastos asociados al cáncer (rojo). **C**, formación del tumor (adaptado de Medema y Vermeulen, 2011).

MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DEL CÁNCER DE COLON

La posibilidad de inducir cáncer de colon en animales de experimentación se viene desarrollando desde 1941, cuando Lorenz y Stewart demostraron la formación de tumores intestinales en ratones a los que se les había administrado dibenzantreno y metilcolantreno por vía oral. Desde entonces, los modelos experimentales se han ido extendiendo en modelos *in vivo*, *in vitro*, genéticos, etc. El cáncer de colon inducido por carcinógenos proporciona un buen modelo de cáncer local, comparte muchas características histológicas con el cáncer humano y, básicamente, presenta una

patología similar a la del cáncer de colon humano. Sin embargo, estos modelos no son muy adecuados para estudiar la producción de metástasis, ya que se produce con poca frecuencia y tarda mucho en desarrollarse. Entre los carcinógenos más frecuentemente utilizados en los modelos experimentales de ratón o rata, para estudiar el cáncer de colon, se encuentra el azoximetano (ver revisión de Rosenberg y cols. 2009). Este carcinógeno es metabolizado vía el citocromo P450 (CYP2E1) a metilazoximetanol, el cual causa mutaciones en genes de moléculas de vías de señalización implicadas en la homeostasis del epitelio intestinal y cuya alteración está asociada a la patogénesis del cáncer de colon. Entre estos genes se encuentran K-RAS, β -catenina y TGF- β . La vía de señalización de K-RAS regula a su vez otras vías tales como la de MAPK y PI3K/Akt, implicadas en el crecimiento y la proliferación celular. La β -catenina está implicada en la adhesión celular y también es un gen activador de la vía Wnt que controla la proliferación celular, como ya hemos descrito anteriormente. El factor TGF- β inhibe el crecimiento y la proliferación celular así como el ciclo celular. Las mutaciones que causa el tratamiento con azoximetano producen activación de las vías K-ras y β -catenina e inhibición de la vía TGF- β , estos cambios inducen en el colon el desarrollo desde lesiones precancerosas como los focos de criptas aberrantes a procesos tumorales como adenocarcinomas (ver revisiones de Chen y Huang, 2009; Rosenberg y cols. 2009).

Los efectos del azoximetano en los modelos experimentales se producen sobre todo en el colon distal y dependen de las dosis y del tiempo de exposición. A medio plazo se producen lesiones precancerosas, focos de criptas aberrantes, y a más largo plazo estos focos van evolucionando hacia adenomas y finalmente a adenocarcinomas, siguiendo la misma secuencia que ocurre en el cáncer de colon humano (ver revisión de Rosenberg y cols. 2009).

Existe un modelo animal de cáncer de colon asociado a inflamación intestinal en el que la inducción de tumores se realiza combinando azoximetano con dextrano sulfato sódico (DSS). El DSS es un compuesto que induce efectos tóxicos en el epitelio del colon y es ampliamente utilizado en modelos animales de colitis. Este protocolo permite reducir mucho el tiempo del tratamiento en comparación con el modelo para

obtener tumores utilizando solamente AOM. Es un método de bajo coste y gran valor por la gran semejanza en cambios histológicos y moleculares con el cáncer asociado a colitis en humanos (Thaker y cols., 2012). El tratamiento es más efectivo administrando una dosis inicial de AOM intraperitoneal y, tras un periodo de descanso, administrando DSS en el agua de bebida durante tres ciclos. Con otras combinaciones de ambas sustancias no se ha conseguido obtener el mismo efecto. Las lesiones producidas en este modelo animal son positivas para β -catenina, ciclooxigenasa-2 y óxido nítrico sintasa inducible (Tanaka y cols., 2003). Además, la respuesta inflamatoria, en este caso producida por el DSS, es mediada por las células T helper (Th1), en la que citoquinas proinflamatorias tales como el interferón- γ (INF- γ), el factor de necrosis tumoral, la interleucina-1 beta (IL-1 β) y la interleucina-6 (IL-6), entre otras, colaboran en el desarrollo de la inflamación y destrucción del tejido. También se producen citoquinas anti-inflamatorias como la interleucina-10 (IL-10) y el factor de crecimiento transformante beta-1. Diversas observaciones indican que estas citoquinas son las que en último término determinan si la respuesta inmune es beneficiosa o perjudicial y sugieren que el proceso patológico se debe a defectos en los mecanismos anti-inflamatorios (Zhang y Li, 2014).

SISTEMA DE SEÑALIZACIÓN DE LA REELINA

La reelina

La reelina es una glicoproteína de la matriz extracelular de gran tamaño, aproximadamente 400 kDa. Funcionalmente, la reelina y su sistema de señalización han sido muy estudiados en el cerebro. Durante el desarrollo embrionario la reelina es secretada principalmente por las células de Cajal-Retzius (D'Arcangelo y cols., 1995) y guía a las neuronas y a las células gliales durante su migración, desde las zonas germinativas hacia sus posiciones correctas en la corteza cerebral (Rice y cols., 2001; Tissir y Goffinet, 2003).

Los ratones reeler no expresan reelina y presentan síntomas como ataxia al desplazarse, distonía postural y temblores a partir de la segunda semana de vida. Fue Falconer, en 1951, quien los describió por primera vez y los denominó reeler. Este tipo

de ratones presentaban una mutación autosómica recesiva que les provoca anomalías arquitectónicas en la corteza cerebral debido a que las neuronas no alcanzan su posición correcta durante el desarrollo del cerebro. Como resultado, estos ratones muestran una desaparición de la estructura laminar de la corteza cerebral, cerebelar y del hipocampo. Por ello, los ratones reeler presentan importantes trastornos motores y reducida viabilidad y fertilidad. En 1995 se clonó el gen que codifica la reelina y se descubrió que el ratón reeler no expresaba reelina (D'Arcangelo y cols., 1995; Bar y cols., 1995; Hirotsune y cols., 1995).

Los receptores y las vías de señalización

Los principales receptores a través de los cuales la reelina ejerce su acción son los receptores de membrana VLDLR (receptor de lipoproteínas de muy baja densidad) y ApoER2 (receptor 2 de la apolipoproteína E) (Figura 6). Otros receptores descritos para la reelina son las integrinas $\alpha3\beta1$ y el receptor de la Efrina (Ephb) (ver revisión de Knuesel, 2010; Bouché y cols. 2013). La unión de la reelina a sus receptores induce la fosforilación de la proteína citosólica Dab1 (Disabled 1) mediante cinasas de la familia Src (Ware y cols., 1997; Howell y cols., 1997). Los ratones mutantes espontáneos para el gen Dab1 presentan un fenotipo muy parecido al de los reeler (Ware y cols., 1997; Howell y cols., 1997). La Dab1 fosforilada traduce la señal a otras vías de señalización que regulan la dinámica microtubular de la célula, promoviendo la migración neuronal y la laminación cerebral. La Dab1 fosforilada desencadena múltiples cascadas de señalización, como la vía PI3k/Akt (Park y Curran, 2008).

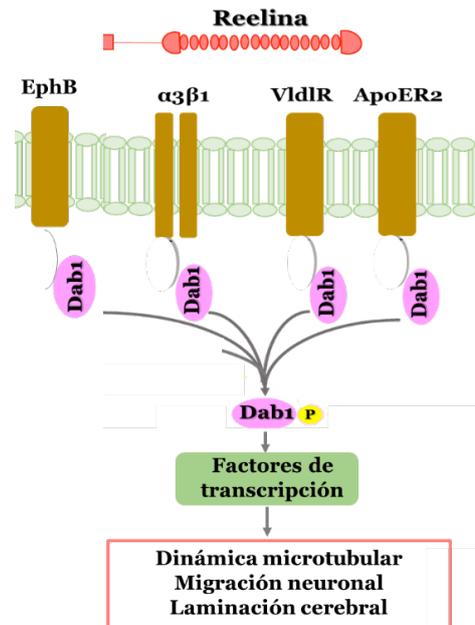


Figura 6. Sistema de señalización de la reelina-Dab1 en el sistema nervioso (esquema adaptado de Folsom y Fatemi, 2013).

Regulación de la expresión de la reelina

La reelina es un gen compuesto por 65 exones que ocupa 450 kb del ADN genómico. Su regulación transcripcional en el sistema nervioso ocurre vía factores de transcripción, que se unen a secuencias específicas del promotor, o mediante regulación epigenética vía metilación de sitios CpG del promotor y/o acetilación de histonas. El promotor contiene una isla CpG con residuos de citosinas susceptibles de metilación y sitios de unión para diferentes factores de transcripción. Los factores de transcripción descritos para el promotor de la reelina han sido: Sp1, Pax6 ("Paired Homeobox 6"), Tbr1 ("T brain 1"), CREB (elemento de unión dependiente de AMPc), NF-κB y Cask (serina cinasa dependiente de calcio/calmodulina) que actúan como reguladores positivos de la expresión de reelina. Cask puede unirse directamente al promotor o bien formar un complejo con la proteína Tbr1 (Bredt, 2000). También el fragmento intracelular del receptor ApoER2 de la reelina (ApoER2-ICD), que surge tras unión de la reelina con ApoER2, se une al promotor regulando negativamente la transcripción (Balmaceda y cols., 2014). Además HIC1 ("Hypermethylated In Cancer

1”), un gen supresor de tumores, es también un represor transcripcional directo de los receptores ApoER2 y VldLR (Dubuissez y cols., 2013).

Con respecto a la regulación epigenética, la proteína DNMT1 (ADN metiltransferasa 1) es la principal proteína encargada de metilar los sitios CpG del promotor de la reelina, silenciando su expresión (Noh y cols., 2005). Inicialmente se consideraba que la DNMT1 sólo era responsable del mantenimiento del patrón de metilación de las células mitóticas, sin embargo actualmente se sabe que también regula la metilación de los genes en células que no están en división (Inano y cols., 2000). La metilación del promotor por la DNMT1 recluta proteínas desacetilasas de las histonas, produciéndose un alto grado de condensación de la cromatina que dificulta el acceso de los factores de transcripción al promotor. Todos estos procesos provocan el silenciamiento de la expresión del gen de la reelina (ver revisiones Grayson y cols., 2006; Levenson y cols., 2008).

Existen otras proteínas que pueden regular la expresión de reelina. Se ha observado en células de cáncer de esófago que TGF- β 1, a través de Snail, un factor de transcripción inducible por TGF- β 1, disminuye la expresión de reelina, también actuando a nivel de su promotor (Yuan y cols., 2012). También el oncogen RAS, a través de PI3-K, modula la expresión de reelina (Castellano y cols., 2016).

La reelina regula la función de otras proteínas, entre ellas TGF- β 1, ya comentada anteriormente por su acción sobre el promotor de reelina. Yuan y cols. (2012) descubrieron la implicación de la reelina en la migración celular inducida por TGF- β 1 en el cáncer de esófago, de manera que el aumento de la reelina bloqueaba parcialmente este mecanismo. Al igual que ocurre con TGF- β 1, PI3-K además de modular la expresión de reelina también es regulada por ésta, en este caso activando la vía. La reelina también actúa sobre la vía Akt, activándola. En los dos últimos casos, la regulación es a través de la fosforilación de Dab1 (Jossin y Goffinet, 2007).

Expresión y función de la reelina

Además de la implicación en el desarrollo cerebral ya comentada, la reelina parece estar implicada en vías de señalización relacionadas con la memoria y la plasticidad sináptica (Levenson y cols., 2008). La reelina también contribuye al crecimiento y maduración postnatal de distintas poblaciones neuronales, no solo en el desarrollo temprano. En adultos se ha observado que la localización extracelular de la reelina es en las zonas sinápticas, por lo que debe tener una función en este proceso (D'Arcangelo, 2014).

Fuera del sistema nervioso central, el sistema de señalización de la reelina ha sido descrito en otros tejidos como en el bazo, riñón, testículo, ovario, corazón, pulmón, estómago (D'Arcangelo y cols., 1995; Hirotsune y cols., 1995; Ikeda y Terashima, 1997), odontoblastos (Maurin y cols., 2004), páncreas (Sato y cols., 2006), hígado (Kobold y cols., 2002), hipófisis (Smalheiser y cols., 2000), intestino (García Miranda y cols., 2010), glándulas mamarias (Khialeeva y cols., 2011) y vasos linfáticos (Lutter y cols., 2012).

Además de en el cerebro el ARNm de ambos receptores se ha detectado en testículo y ovario y el del VldLR también en corazón, riñón, músculo, pulmón, tejido adiposo e hígado (ver revisión de Reddy y cols., 2011). El ARNm de Dab1 se ha observado en células hematopoyéticas, próstata, endometrio, cérvix, ovario y glándulas mamarias, en tejido adiposo, testículo y bazo (McAvoy y cols., 2008, Long y cols., 2011).

Aunque el sistema de la reelina se ha localizado en una gran variedad de tejidos diferentes del sistema nervioso, son pocos los trabajos que han estudiado su función. Recientemente se ha demostrado que la reelina realiza diversas funciones en los tejidos periféricos, estando implicada en la proliferación, migración y homeostasis, durante el desarrollo y en el adulto, de los vasos linfáticos, intestino delgado, glándula submandibular, glándula mamaria, cartílago, hueso y colon (ver revisión de Khialeeva y Carpenter, 2017).

En el ser humano se han descrito algunas enfermedades que presentan alteraciones en la expresión del gen de la reelina o de los componentes de su sistema de señalización, como la lisencefalía (Hong y cols., 2000), esquizofrenia (Impagnatiello y cols., 1998; Guidotti y cols., 2000), autismo (Fatemi y cols., 2005; Serajee y cols., 2005), Alzheimer (Sáez-Valero y cols., 2003), síndrome de Angelman (Miao y cols., 2013) o epilepsia (Haas y Frotscher, 2010; Dazzo y cols., 2015). Es interesante destacar que los autistas presentan alteraciones del tracto gastrointestinal semejantes a las de la colitis ulcerosa y a las de la enfermedad de Crohn (ver revisión de Erickson y cols., 2005). La reelina también ha sido relacionada con procesos inflamatorios como en la artritis reumatoide, donde está aumentada (Magnani y cols., 2010). En cerebro de embriones de ratón, cuyas madres han sido sometidas previamente a inflamación cerebral, se observó una disminución en la reelina (Harvey y Boksa, 2012). La infección por rotavirus de las células Caco-2 induce un aumento de la expresión del ARNm de reelina (Cuadras y cols., 2002).

También se han relacionado variaciones de la expresión de la reelina con algunos tipos de cáncer. Un aumento se detectó en el cáncer de próstata (Perrone y cols., 2007) y en el retinoblastoma (Seigel y cols., 2007). En otros tipos de cáncer, sin embargo, se observó una disminución en la expresión de reelina, como en los cánceres de páncreas (Sato y cols., 2006), estómago (Dohi y cols., 2010), mama (Stein y cols., 2010; Khialeeva y cols., 2017), hígado (Okamura y cols., 2011) y neuroblastoma (Becker y cols., 2012). Wang y cols. (2002) observaron un aumento en la expresión de Cask y reelina en el cáncer de esófago, mientras que Yuan y cols. (2012) describieron una disminución de la reelina en este mismo tipo de cáncer. En el glioblastoma, la expresión tanto de reelina como de Dab 1 se encuentran disminuidas (Schulze y cols., 2017). Se ha observado un aumento en la expresión de reelina en los *nevus melanocíticos* en comparación con el tejido adyacente (Mihail y cols., 2017). Otros autores observaron aumentos en la expresión de la reelina tras lesión en la córnea y la retina (Pulido y cols., 2007), nervios periféricos (Panteri y cols., 2006; Pasten y cols., 2016), cerebro (Won y cols., 2006; Courtès y cols., 2011) y en la glándula

submandibular (Rebustini y cols., 2012), sugiriendo su participación en la reparación y/o regeneración de los tejidos dañados, como hemos indicado anteriormente.

Nuestro grupo de investigación identificó por primera vez la presencia de los componentes del sistema de señalización de la reelina (reelina, VldLR, ApoER2 y Dab1) en la mucosa del intestino delgado de rata y ratón y del colon de ratón (García-Miranda y cols., 2010, 2012a y 2013, Carvajal y cols., 2017a). Posteriormente, otros autores han corroborado la expresión de reelina en el intestino. Saeed y cols. (2012) observaron un aumento en la expresión de reelina en el colon de pacientes con la enfermedad de Hirschsprung, en la que las células ganglionares están ausentes o casi ausentes, aunque no especifican si dicha expresión procede de la mucosa, submucosa o muscular. Böttner y cols. (2014) describen su expresión en los plexos submucoso y mientérico del colon.

Con el estudio de la reelina en el intestino delgado, mostramos que la reelina se expresa en los miofibroblastos subepiteliales y que ejerce su función activando la proliferación, migración, diferenciación y apoptosis del epitelio intestinal. También observamos que los ratones reeler (deficientes en reelina) presentan: i) alteraciones en la morfología de la mucosa del intestino delgado; ii) mayor anchura del espacio intercelular de las uniones adherentes y desmosomas, lo que podría permitir el acceso de antígenos de la luz intestinal y/o ser resultado de uniones más laxas; iii) una disminución en el número de células de Paneth, que reduciría la defensa antimicrobiana intestinal, y iv) variaciones en la expresión de genes implicados en la respuesta inmune, en la inflamación y en el cáncer (García-Miranda y cols., 2013). Recientemente nuestro grupo de investigación ha observado que: i) la reelina, al igual que en el intestino delgado, en el colon regula la homeostasis epitelial manteniendo la integridad de la barrera intestinal, ii) la expresión de reelina aumenta en el colon en respuesta a colitis aguda inducida con DSS y iii) la reelina protege al colon de la inflamación intestinal, presentando los ratones reeler mayor susceptibilidad al tratamiento con DSS (Carvajal y cols., 2017b). Todo ello nos hizo pensar que la reelina también podría estar implicada en el inicio y/o la transición de la enfermedad inflamatoria intestinal al cáncer de colon.

OBJETIVOS DEL TRABAJO

Por lo anteriormente expuesto, los objetivos del presente trabajo son evaluar:

1. la expresión del sistema de señalización de la reelina-Dab1 en el inicio, progresión y desarrollo del cáncer de colon
2. la función de la reelina en el desarrollo del cáncer de colon

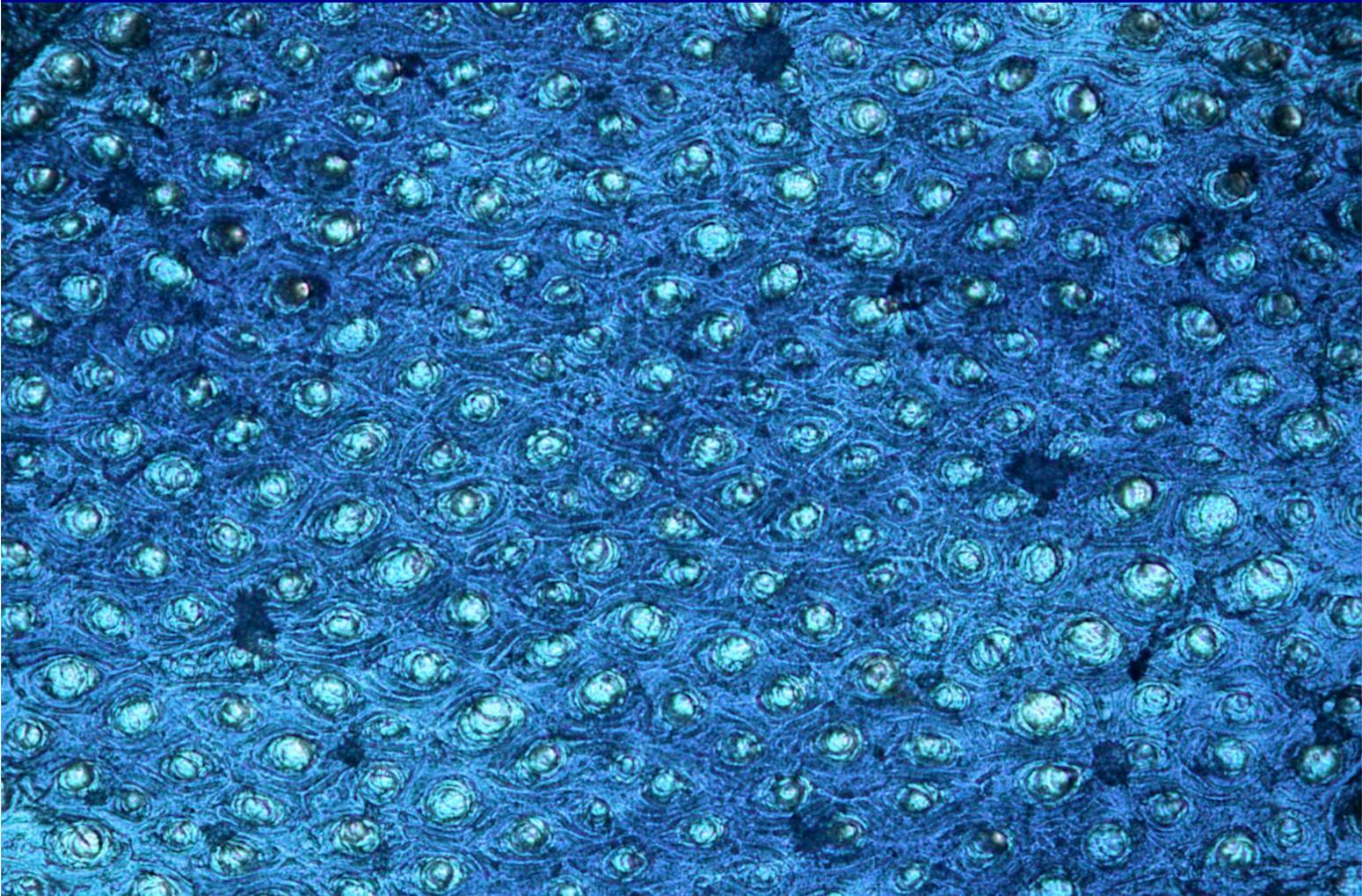
Para ello se estudiarán:

El sistema de señalización de la reelina- Dab1 en el colon humano mediante:

- 1) La caracterización del sistema de la reelina- Dab1
- 2) La expresión de reelina, VldlR, ApoER2 y Dab1 en adenocarcinoma de colon
- 3) Los cambios en la expresión de la reelina en el inicio, progresión y desarrollo del cáncer de colon
- 4) La regulación de la expresión de la reelina en el cáncer de colon

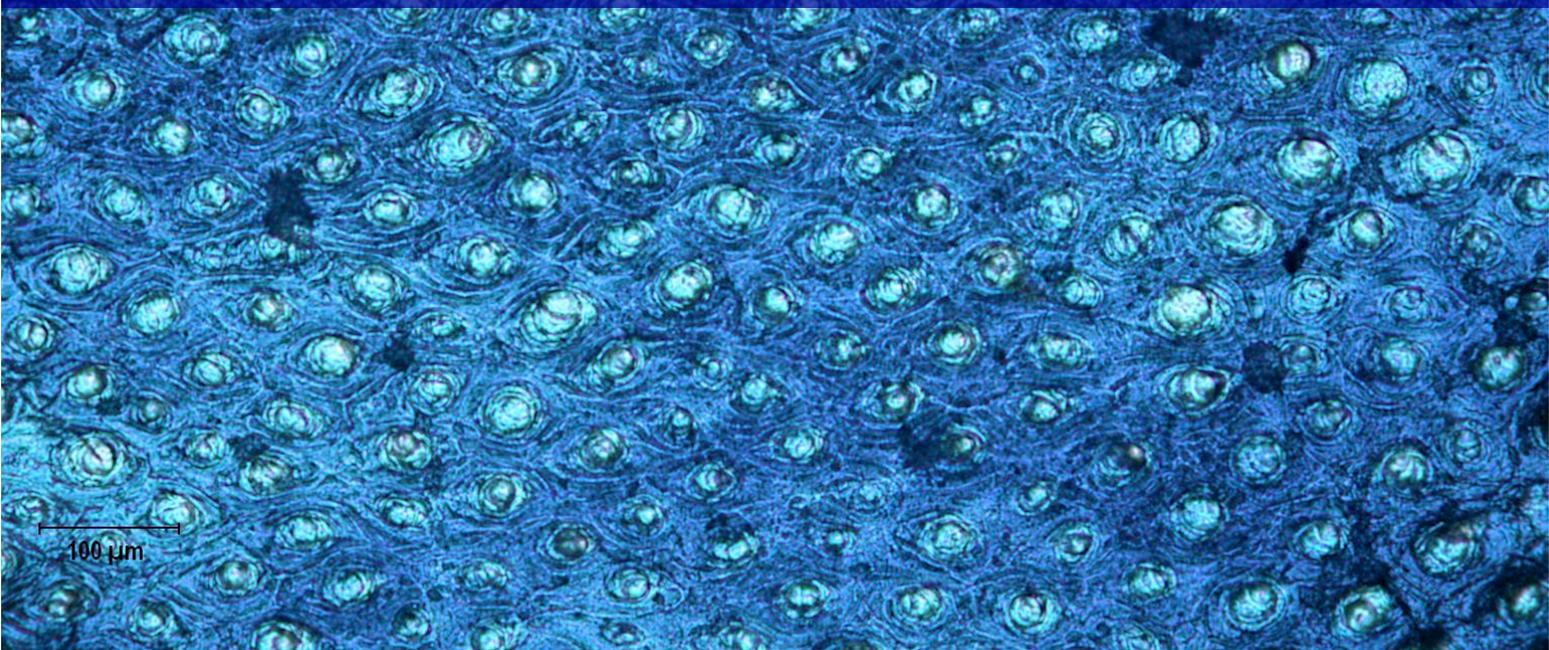
La función de la reelina en el desarrollo del cáncer de colon utilizando modelos animales y analizando:

- 1) La expresión de reelina en lesiones precancerosas y en adenocarcinomas inducidos mediante tratamientos con azoximentano y/o DSS
- 2) La expresión de genes que regulan la abundancia de reelina
- 3) El efecto de la ausencia de reelina en el desarrollo del cáncer de colon
- 4) El efecto de la ausencia de reelina en la expresión y activación de la proteína supresora de tumores p53



100 μm

Materiales y Métodos



100 μm

REACTIVOS

Salvo que se indique otra procedencia, los reactivos utilizados fueron suministrados por Sigma-Aldrich. Los anticuerpos empleados se resumen en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1. Anticuerpos empleados en los ensayos de inmunohistoquímica.

Anticuerpos Primarios	Procedencia	Laboratorio	Dilución
Anti- α -SMA	Ratón	Sigma-Aldrich	1:200
Anti-Reelina	Ratón	Calbiochem	1:100
Anti-Dab1	Conejo	Chemicon	1:200
Anti-VldIR	Ratón	Santa Cruz	1:50
Anti-ApoER2	Cabra	Santa Cruz	1:50
Anti-E-Cadherina	Ratón	BD Transduction Laboratories	1:200
Anti-p53	Conejo	Santa Cruz	1:50
Anti-p53 fosforilada Ser 15	Conejo	BD Transduction Laboratories	1:50
Anticuerpos Secundarios	Procedencia	Laboratorio	Dilución
Anti-IgG de ratón conjugado con biotina	Cabra	Vector	1:100
Anti-IgG de conejo conjugado con biotina	Cabra	Vector	1:100
Anti-IgG de ratón conjugado con FITC	Cabra	Jackson Tech.	1:100
Anti-IgG de conejo conjugado con FITC	Cabra	Jackson Tech.	1:100
Anti-IgG de conejo conjugado Alexa Fluor 546	Burro	Life Technologies	1:100

Tabla 2. Anticuerpos empleados en los ensayos de Western-blot.

Anticuerpos Primarios	Procedencia	Laboratorio	Dilución
Anti- GAPDH	Ratón	Sigma-Aldrich	1:6000
Anti-Reelina	Ratón	Chemicon	1:1000
Anti-p53	Conejo	Santa Cruz	1:500
Anti-p53 fosforilada Ser 15	Conejo	BD Transduction Laboratories	1:500
Anti- β -actina	Ratón	Sigma-Aldrich	1:5000
Anticuerpos Secundarios	Procedencia	Laboratorio	Dilución
Anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano	Oveja	Sigma-Aldrich	1:5000
Anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano	Cabra	Sigma-Aldrich	1:5000

APARATOS

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

- Agitador de balanceo (Heidolph, Duomax 1030).
- Agitador rotativo "Orbit" (Selecta, 3002512)
- Autoclave (Selecta, Autester-E).
- Balanza (Sartorius, CP224S).
- Baño termostático (Selecta, Precisdig).
- Cabina de flujo laminar (Microflow, 25674).
- Cámara de fotos digital (SPOT Insight V 3.5).
- Cámara de fotos para fluorescencia (Olympus DP73).
- Campana extractora (CRUMA, 870).
- Centrífuga (Heraeus, Biofuge Pico)
- Criostato (Leica, CM 1510 S).
- Cubeta de electroforesis para geles de acrilamida (Bio-Rad, Mini Trans-Blot Cell).
- Cubeta electroforesis para geles de agarosa (Sigma-Aldrich, SHU6).
- Espectrofotómetro (Hitachi, U-2001).
- Estufa digital (Selecta, Digitheat 2001242).
- Fuentes de alimentación (BioRad, Power-Pac 200, Power-Pac-300 y Power-Pac-3000).
- Homogeneizador Politrón (Ystral, T-1500).

- Lector de placas (ASYS, UVM 340).
- Microcentrífuga (Eppendorf, 5415C).
- Microtomo (Reichert-Jung, Ultracut E).
- Microscopio óptico (Carl Zeiss, Axioskop 40).
- Microscopio de fluorescencia (Olympus BX61).
- pH metro (HANNA, HI 221).
- Termociclador para tiempo real (BioRad, MJ MiniOpticon).

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

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

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

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

Salvo que se indique otra, la edad de los ratones empleados en este estudio fue de 3 meses.

El sacrificio de los animales se realizó de acuerdo a las normas éticas de experimentación mediante dislocación cervical, de acuerdo a la Directiva Europea 2010/63/UE y al Real Decreto 53/2013.

GENOTIPADO DE RATONES

El genotipado de los ratones de la cepa B6C3Fe se realizó siguiendo el protocolo descrito por D’Arcangelo y cols. (1996). Primero se extrajo el ADN genómico procedente de cada ratón a partir de alguno de sus dedos, siguiendo un código para poder identificarlos posteriormente, y utilizando la solución de extracción “QuickExtrac™”(EPICENTRE), conforme a las instrucciones del fabricante. Posteriormente, con 5 µl del ADN extraído se realizó una PCR usando tres cebadores específicos del gen de la reelina, de los cuales, uno es sentido (C1) y dos son antisentidos (C2 y C3) (Tabla 3). La polimerasa de ADN usada para esta reacción fue la “MyTaq Polimerasa” (Bioline), y las condiciones de reacción fueron: una primera etapa de desnaturalización de ADN de 2 minutos a 95°C, posteriormente, cuarenta ciclos que comprendían: 20 segundos a 95°C, 20 segundos a 55°C y 15 segundos a 72°C; y por último, una etapa de elongación de 2 minutos a 72°C.

El producto de esta reacción se analizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2%. Los tres posibles genotipos se identificaron en función del tamaño de las bandas obtenidas descritas en la Tabla 4.

Tabla 3. Cebadores para el genotipado de ratones.

NOMBRE	SECUENCIA (5'...3')
C1	TAATCTGTCCTCACTCTGCC
C2	CAGTTGACATACCTTAAT
C3	TGCATTAATGTGCAGTGT

Tabla 4. Bandas obtenidas en el genotipado.

GENOTIPO	TAMAÑO (pb)
rl+/rl+ (NORMAL)	266
rl+/rl- (HETEROCIGOTO)	266 y 363
rl-/rl- (REELER)	363

MATERIAL BIOLÓGICO**Muestras de tejido de ratón**

Tras el sacrificio de los ratones, se extrajo el colon de los ratones rápidamente, se abrió longitudinalmente, se lavó con solución salina fisiológica fría (4°C), se pesó y se midió.

Para obtener las muestras de criptas aberrantes, se realizó un raspado de mucosa, mientras que, en los diferentes modelos animales que veremos a continuación, se extirparon las lesiones y los tejidos adyacentes con ayuda de un bisturí.

Muestras de tejido humano

Se obtuvieron muestras de pacientes procedentes del Hospital Universitario Virgen de Valme (Sevilla) y del Biobanco del Hospital Universitario Virgen del Rocío (Sevilla). Las muestras obtenidas en el Hospital Universitario Virgen de Valme fueron resecciones de adenocarcinomas de colon, o de tejido sano del mismo paciente de una zona lejana al tumor. Estas muestras se procesaron como se describe más adelante en la presente memoria. Las muestras procedentes del Biobanco del Hospital Universitario Virgen del Rocío consistían en secciones de 10 µm incluidas en parafina, de biopsias de pacientes con colitis ulcerosa, pólipos no adenomatosos, adenomas, adenocarcinomas y colon sano. La edad de los pacientes estaba comprendida entre 22 y 64 años en el caso de las muestras de colitis y entre 44 y 81 años en las otras muestras. En ambos hospitales se realizó un estudio histopatológico para confirmar el

diagnóstico de las diferentes patologías. El estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Virgen de Valme y por el del Hospital Virgen del Rocío. Los pacientes firmaron el consentimiento informado.

Procesamiento de las muestras

Tras la extracción de ambos tipos de muestras, de ratón o humanas, el material se procesó de manera diferente según la técnica que se quería utilizar a continuación. Así, si el objeto era la extracción de ARN mensajero, ADN genómico o extractos proteicos, la muestra se congeló en nitrógeno líquido y se conservó a -80°C hasta su uso. En el caso de que el material fuera destinado a técnicas inmunohistoquímicas, las muestras de tejido se fijaron en p-formaldehído al 4% en PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10,1 mM Na_2HPO_4 y 1,8mM KH_2PO_4) durante toda la noche a 4°C y con agitación orbital.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA SU OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO ÓPTICO

Tras la fijación de las muestras como se ha descrito anteriormente, el tejido se incluyó en parafina (P.F. $55-58^{\circ}\text{C}$, Panreac) o en "Tissue-Tek[®]" (Sakura) para su congelación, según el procedimiento que se fuera a realizar a continuación.

En el primero de los casos, los tejidos ya fijados se sometieron a un proceso de deshidratación utilizando alcoholes de concentraciones crecientes (70%, 80%, 90% y 100%) y por último xilol, a temperatura ambiente y con agitación orbital. A continuación, se pasaron por una mezcla de xilol:parafina (1:1) a 60°C y se incluyeron en parafina previamente calentada a 60°C , donde se mantuvieron toda la noche. Por último, los bloques de parafina con los tejidos correctamente orientados se dejaron solidificar a temperatura ambiente. Se realizaron secciones de $5\ \mu\text{m}$ con un microtomo, se montaron en portaobjetos con adhesivo ("StarFrost[®] adhesive slides", Knittel Glaser, Alemania) y se conservaron a temperatura ambiente hasta su utilización.

En el segundo caso, los tejidos ya fijados se sumergieron en soluciones con concentraciones crecientes de sacarosa (20 y 30%) y se congelaron en isopentano a -15°C. Para obtener las criosecciones el bloque se preparó añadiendo el “Tissue-Tek®” sobre el tejido congelado. Se realizaron cortes de 7 µm con un criostato y, tras ser montados en portaobjetos con adhesivo (“StarFrost® adhesive slides”), se conservaron a -20°C hasta su utilización.

MODELOS EXPERIMENTALES DE RATÓN

Para estudiar las diferentes lesiones en ratones, así como la progresión desde las lesiones precancerosas hasta el desarrollo de adenocarcinomas, utilizamos varios modelos que permiten producir desde una inflamación aguda de colon hasta la aparición de criptas aberrantes, pólipos, adenocarcinomas y adenocarcinomas asociados a colitis. Se utilizaron distintas pautas de administración de azoximetano y/o DSS, y distintos tiempos de sacrificio. A continuación se detallan los distintos modelos animales utilizados.

Inflamación intestinal aguda

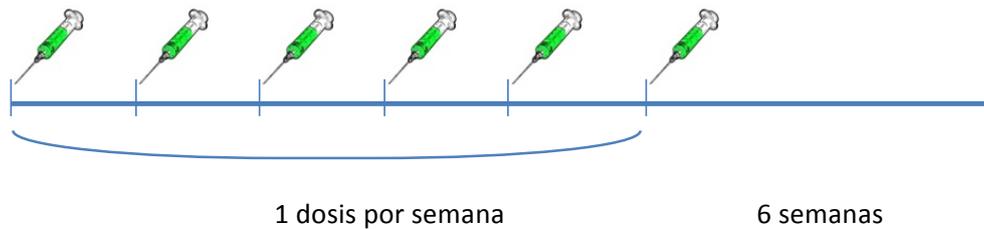
Las muestras de colon de ratón a los que se le ha inducido colitis aguda utilizadas en el presente trabajo proceden de estudios previos realizados en nuestro laboratorio. La colitis aguda se indujo mediante la administración de DSS (TdB Consultancy, PM= 40 kDa) al 3% en el agua de bebida a ratones control y reeler de 12 semanas de edad. El sacrificio de los animales se realizó a los 9 días de administración de DSS, cuando la pérdida de peso es superior al 10% de su peso inicial (Carvajal y cols., 2017a).

Criptas aberrantes

Los focos de criptas aberrantes, considerados lesiones precancerosas, se inducen mediante la administración de azoximetano (AOM) a ratones normales de la cepa C57BL/6J de 5 a 10 semanas de edad (Bissahoyo y cols., 2005). Los animales se dividieron en dos grupos, a un grupo se le administró por vía intraperitoneal una dosis de azoximetano (2 mg/ml en PBS) de 10 mg/kg de peso corporal semanalmente,

durante 6 semanas consecutivas. Paralelamente, a un grupo control, se le administró PBS también por vía intraperitoneal.

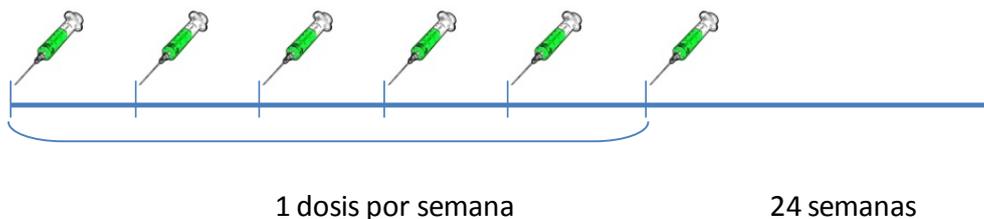
El sacrificio de los animales se realizó 4 semanas después de las 6 semanas de tratamiento.



Pólipos

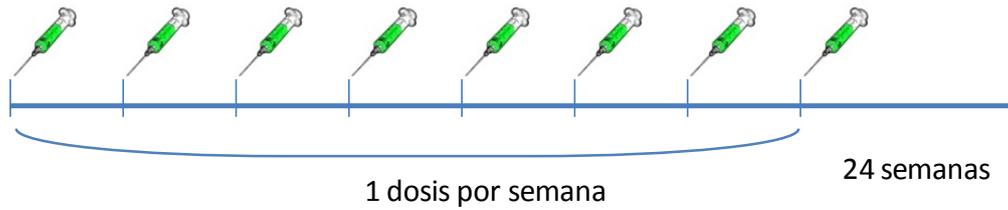
Los pólipos se obtuvieron mediante una inyección intraperitoneal por semana de AOM (2 μg / μl de AOM en PBS) a una dosis de 10 mg/kg peso corporal, a ratones de la cepa C57BL/6J de 5-6 semanas de edad, durante 6 semanas. Tras concluir el tratamiento, a las 24 semanas se procede al sacrificio de los animales.

Se utilizaron dos grupos de animales, un grupo control a los que se les inyectó PBS, y otro grupo de ratones tratados con la solución de AOM.



Adenocarcinoma de colon

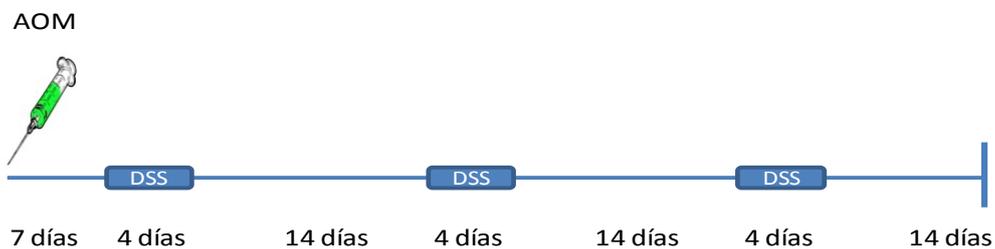
Se realiza el mismo procedimiento descrito en el apartado anterior, pero en lugar de 6 inyecciones, se aumentaron a 8 dosis de AOM, mediante 1 inyección intraperitoneal por semana.



Adenocarcinoma de colon asociado a colitis

Se utilizó azoximetano combinado con DSS para inducir tumores asociados a colitis. El tratamiento consta de dos partes: 1º) una inyección de AOM intraperitoneal (10 mg/kg peso corporal); 2º) tres ciclos de DSS (Pm: 40.000 Da) al 2% en el agua de bebida, de 4 días cada uno, a ratones de la cepa C57BL/6J de 8-9 semanas de edad y a ratones control y reeler.

Después de cada ciclo con DSS se dejan dos semanas de descanso. Se dividen en dos grupos: un grupo control formado por 9 animales y un grupo tratado de 11 animales.



EVALUACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS CON AZOXIMETANO Y/O DSS

Inflamación intestinal aguda

La evaluación se realizó midiendo el índice de actividad de la enfermedad (DAI), la actividad de la enzima mieloperoxidasa, la relación peso/longitud del colon, el análisis histológico y la abundancia relativa de las citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 β y TNF- α) según se describe en Carvajal y cols. (2017a).

Cripta aberrantes

Los focos de cripta aberrantes se identificaron en tejido intacto de colon (proximal y distal) mediante tinción con azul de metileno y también en secciones de

colon, incluidas en parafina y teñidas con hematoxilina y eosina (McGinley y cols. 2010).

Para la tinción con azul de metileno, los tejidos, ya fijados con paraformaldehído al 4% y conservados en etanol al 70%, se sumergieron en una solución al 0,05% de azul de metileno en agua (esta solución debe prepararse inmediatamente antes de su uso) a temperatura ambiente, 20 veces durante 1 segundo, y finalmente se dejaron 3 minutos en dicha solución. Transcurrido este tiempo, se lavaron con agua destilada para eliminar el azul de metileno sobrante y se dejaron secar. Las muestras se analizaron al microscopio óptico con un aumento de 50x y en un plazo no superior a 2 horas, ya que pasado este tiempo la tinción no permite distinguir los focos.

Para la tinción hematoxilina-eosina se partió de secciones de tejidos incluidos en parafina montados sobre portaobjetos. En primer lugar se procedió al desparafinado de los mismos: primero se trataron los tejidos a 60°C durante 30 minutos, luego se pasaron por xilol (2 x 1,5 minutos) y por una batería de alcoholes de porcentaje decreciente para la hidratación de las muestras: etanol 100% (30 segundos), metanol (15 minutos), etanol 100%, 95% y 70% (30 segundos en cada uno) y agua (30 segundos). La tinción se llevó cabo primero con hematoxilina de Harris (2 minutos) y luego con eosina (2 minutos). Se lavó el exceso de colorante con agua y se pasaron las muestras por una batería de alcoholes, igual que al inicio pero esta vez en sentido creciente para la deshidratación de la muestra y se incubó con xilol durante 20 segundos. Por último, se incluyeron en pegamento de montaje "EUKITT" para su observación al microscopio óptico.

Las preparaciones se fotografiaron utilizando la cámara digital "SPOT Insight V 3.5." acoplada al microscopio y al programa "Spot Advance 3.5.4.1."

Las criptas aberrantes se distinguen por ser más alargadas que las normales, tener aumentado el espacio pericriptico, una capa más gruesa de células epiteliales (que se tiñen más oscuras que las criptas normales), un lumen oval y frecuentemente se aprecian elevadas sobre la mucosa.

Pólipos y adenocarcinomas de colon

Se realizó un análisis macroscópico de los tejidos consistente en determinar el peso y longitud del colon. También se evaluaron el número de lesiones en cada ratón y su tamaño.

Para el análisis histológico se utilizó la tinción hematoxilina-eosina descrita en el apartado anterior.

Adenocarcinoma de colon asociado a colitis

- Índice de actividad de la enfermedad (Disease activity index) (DAI)

La evaluación clínica de la inflamación incluye un registro diario del peso corporal, de la consistencia de las heces y de la aparición de sangrado rectal, que son valorados según la escala descrita en la Tabla 5 y permite calcular el índice de actividad de la enfermedad (DAI) (Cooper y cols., 1993). Este parámetro puede tomar valores de 0 a 3.

Tabla 5. Criterios de puntuación del DAI.

CRITERIOS DE PUNTUACIÓN DEL DAI			
Puntuación	Pérdida de Peso (%del peso inicial)	Consistencia de heces	Sangre Rectal
0	<1	Consistentes, bien formadas	No
1	1-4,99	Sueltas, no adheridas al ano	Pequeño sangrado en las heces; región anal seca
2	5-10	Muy ligeras adheridas al ano	Sangrado en heces; la sangre aparece a través del orificio anal
3	>10	Líquidas o muy líquidas y ano humedecido	Profundo sangrado en las heces; la sangre se desprende por todo el ano

- Análisis macroscópico del intestino

Se realiza un análisis macroscópico del colon consistente en determinar el peso y longitud del mismo. A partir de estos datos se calcula la relación peso (g)/longitud (cm) de cada muestra, indicativa también del grado de inflamación.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) EN TIEMPO REAL

Para la extracción de ARN procedente de muestras congeladas en nitrógeno líquido (resecciones humanas o muestras animales) se utilizó el kit comercial “RNeasy-Mini” (Quiagen). Se determinó la pureza, la concentración y la integridad del ARN total mediante técnicas espectrofotométricas (absorbancia a 260 nm y 280 nm) y electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Para el aislamiento de ARN a partir de las secciones de tejido humano incluidas en parafina, obtenidas del Biobanco, se realizó un proceso de desparafinado, haciendo flotar las secciones en xilol durante 15 minutos y a continuación, se utilizó el kit comercial “FFPE RNeasy” (Quiagen). El protocolo propuesto por el fabricante fue adaptado para mejorar el aislamiento, repitiéndose dos veces el lavado con xilol y etanol. Una vez aislado el ARN se procedió de la misma manera que con las muestras anteriores.

El ARN obtenido se sometió a un tratamiento con DNAsa y a una transcripción reversa, usando el kit comercial “QuantiTect Reverse Transcription” (Quiagen) para obtener el ADN codificante (ADNc), según las instrucciones del fabricante.

Para la reacción de amplificación por PCR en tiempo real se utilizó:

- 1 µl de ADNc problema (producto de la transcripción reversa)
- 1 µl de cebadores específicos (concentración final: 0.4 µM) (Tabla 6)
- 10 µl de “SsoFast EvaGreen Supermix” (BioRad)
- Se completó con agua destilada estéril para un volumen final de 20µl

En todos los casos se incluyeron controles que no tienen ADNc. La reacción de amplificación se realizó en un termociclador MiniOpticon (Bio-Rad) y las condiciones de la reacción fueron: una primera etapa de desnaturalización del ADN de 3 minutos a 95°C; posteriormente, treinta y cinco ciclos que comprendían: 40 segundos a 94°C, 40

segundos a 58°C y 40 segundos a 72°C y, por último, una etapa de elongación de 3 minutos a 72°C. Posteriormente, la obtención de un único producto en la PCR se confirmó por la aparición de un único pico en el análisis de las curvas de disociación. Éstas se obtuvieron calentando la muestra desde los 65°C hasta los 95°C a intervalos de 1°C y monitorizando la fluorescencia. Esta curva representa la temperatura a la que las cadenas de ADN se separan o temperatura de fusión frente a la fluorescencia emitida por el producto de la PCR. Esta temperatura de fusión es específica para cada fragmento de ADN amplificado.

Para cada ADNc la PCR se hace por triplicado. En cada muestra, se determinó el número de ciclos necesarios para alcanzar un nivel de fluorescencia umbral (Ct). Los resultados se analizaron usando el método comparativo de Ct en una hoja de cálculo “GeneExpression Macro” proporcionada por BioRad (Vandesompele y cols., 2002).

Se utilizó β -actina como gen de referencia para la normalización de los valores de ARNm de las diferentes muestras.

Tabla 6. Cebadores específicos para PCR en Tiempo Real

RATÓN			
Gen	GeneBank ID	Sentido (5'...3')	Antisentido (5'...3')
ApoER2	NM_001080926.1	GAATGAAGGCAGCCAGAT	GTTGTCGAAATTCATGCTC
α-SMA	NM_007392.3	CTTTGCTGGTGATGATGCTC	GCGAAGCTCGTTATAGAAGG
β-actin	NM_007393.3	ACCCACACTGTGCCCATCTA	CGGAACCGCTCATTGCC
Cask	NM_001284503.1	TCTCCAGAAAGTGCTAACGG	ATGAAGTGTACCTTGCTGTG
Dab1	NM_010014.2	GACATCACAGATCATCGG	CTGGTACACAGATTGTTTAC
DNMT1	NM_010066.4	CAAGTTCTGCCTATCTTGATCC	TGATGTTGAAAGTAAAGGCCTC
FAP	NM_007986.3	CGGGAAGCAACTCATGTCCT	TGATTCTCACTGCACAGCGT
p53	AB020317.1	CAGAAGATATCCTGCCATCACC	GGAGAGTACGTGCACATAACAG
Reelin	NM_011261.2	GGACTAAGAATGCTTATTTCC	GGAAGTAGAATTCATCCATCAG
TGF-β1	NM_011577.1	ATCCTGTCCAACTAAGGCTC	TGACCTCTTTAGCATAGTAGTCC
VldIR	NM_013703.2	GTGTACTIONGAAGACCACTGAAGAG	GCTGGCTCTGTTACCATTTC

HUMANO			
Gen	Genebank ID	Sentido (5'....3')	Antisentido (5'....3')
ApoER2	NM_000041	AGATGGGAGTGATGAAGCTG	GCAGTTCTTGGTCAGTAGGT
α-SMA	XM_011540016	AGACTTTCAATGTCCCAGCC	CTCAGCAGTAGTAACGAAGGA
Cask	XM_011543997	TCTCCAGAAAGTGCTAACGG	ATGAAGTGTACCTTGCTGTG
Dab1	NM_021080	CACACAAACTGTTATGCCTT	GTTTCATCATGGAATCTTGACATA
DNMT1	NM_001130823	CAAGTTCTGCCTATCTTGATCC	TGATGTTGAAAGTAAAGGCCTC
E-Cadherin	NM_004360	TTTGAAGATTGCACCGGTCG	TCTCTTCTGTCTTCTGAGGC
HIC1	NM_001098202	CGACGACTACAAGAGCAGCAGC	CAGGTTGTCACCGAAGCTCTC
N-Cadherin	NM_001792	AGTACAATATGAGAGCAGTGAG	CTGAATTGTCTTGGGAACAC
Reelin	NM_005045	CCACGAGAACTGATTACCAC	ATTGTGCTGACATTGGAAGG
TGF-β1	NM_000660	AACCCACAACGAAATCTATGA	AAAGATAACCACTCTGGCGA
Vimentin	NM_003380	GAGCTATGTGACCACGTCCA	TGAACTCAGTGTTGATGGCGT
VldIR	NM_003383	CCAGAACAGTGCCATATGAG	CCATTGCATACAAAGTTCTCTG

INMUNOHISTOQUÍMICA

Los ensayos de inmunohistoquímica se realizaron en secciones de 7 μm obtenidas con un criostato, de colon normal y adenocarcinoma de colon humano, o bien en secciones de 5 μm de tejidos incluidos en parafina. Los anticuerpos empleados en este ensayo, así como las diluciones de los mismos, se detallan en la Tabla 1.

Inmunohistoquímica en secciones obtenidas con el criostato

En este tipo de secciones se utilizaron dos métodos diferentes: i) técnica de la peroxidasa y ii) inmunofluorescencia.

i) Técnica de la peroxidasa:

Las secciones montadas en portaobjetos se descongelaron a temperatura ambiente y se permeabilizaron primero con acetona, 10 minutos a -20°C y, a continuación, con Tritón X-100 al 0,1% en PBS, a temperatura ambiente durante 15 minutos, lavándose con PBS entre ambos pasos y después de permeabilizar. Para inhibir la actividad peroxidasa endógena se incubaron con una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en metanol, a temperatura ambiente, en cámara húmeda y con balanceo durante 30 minutos. Nuevamente se lavaron con PBS.

Las uniones inespecíficas del anticuerpo se bloquearon incubando las muestras en solución de bloqueo (3% suero de cabra, 3% albúmina bovina sérica y 0,1% Tritón X-100 en PBS) durante 30 minutos. A continuación, se incubaron con el anticuerpo primario diluido con solución de bloqueo o únicamente con solución de bloqueo (para el control), a 4°C en cámara húmeda y con balanceo, durante toda la noche. Tras lavar con PBS, se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con biotina, diluido con solución de bloqueo a temperatura ambiente, en cámara húmeda y con balanceo, durante 90 minutos. Transcurrido ese tiempo se lavaron con PBS.

La señal se visualizó utilizando el kit ABC (Vector), según el protocolo del fabricante, se incubó con 1 mg/ml de Diaminobenzidina (DAB) en PBS durante 15 minutos y posteriormente, con 1 mg/ml de DAB en una solución de peróxido de

hidrógeno al 0,05% en PBS hasta la aparición de señal. Finalmente, las preparaciones se lavaron con PBS, se dejaron secar y se incluyeron en pegamento de montaje "EUKITT" para su observación al microscopio óptico. El análisis se realizó mediante la obtención de imágenes utilizando la cámara digital "SPOT Insight V 3.5." acoplada al microscopio y el programa "Spot Advance 3.5.4.1."

ii) Inmunofluorescencia:

Las secciones montadas en portaobjetos se descongelaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación se realizó un lavado de 10 minutos con PBS y se incubó con etanol absoluto durante 10 minutos a una temperatura de -20°C. Tras realizar tres lavados consecutivos de 3 minutos con PBS, se procedió a bloquear las uniones inespecíficas del anticuerpo, incubando las muestras en solución de bloqueo (3% suero de cabra, 3% albúmina bovina sérica y 0,1% Tritón X-100 en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente, con balanceo y en cámara húmeda.

Seguidamente se incubaron las muestras con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo o únicamente con solución de bloqueo (para el control), a 4°C en cámara húmeda y balanceo, durante toda la noche. Tras lavar con PBS, se incubaron con el anticuerpo secundario marcado con fluorescencia, diluido con solución de bloqueo a temperatura ambiente, cámara húmeda y balanceo, durante 1 hora. En el siguiente paso, se incubaron con Hoechst 33258 a una dilución 1:1.000 a temperatura ambiente durante 2 minutos. La tinción con Hoechst nos permite la visualización de los núcleos de las células. Por último, se lavaron con PBS durante 10 minutos y se montaron con solución de montaje para microscopía de fluorescencia "Vectashield" (Vector).

La señal se visualizó bajo el microscopio de fluorescencia Olympus BX61 y las imágenes se obtuvieron con la cámara digital Olympus DP73.

Inmunohistoquímica en secciones de parafina

Las secciones de parafina montadas en portaobjetos se desparafinaron pasando primero por la estufa a 60°C durante 30 minutos y luego, por una batería de

alcoholes: xilol (1,5 minutos x2), etanol 100% (30 segundo), metanol (14,5 minutos), etanol 100%, 95% y 70% (30 segundos en cada uno) y agua (30 segundos). A continuación se sumergieron en una solución de citrato trisódico 0,01 M, pH 6, durante 10 min en el microondas, para recuperar el antígeno y seguidamente se lavaron con PBS. Las uniones inespecíficas del anticuerpo se bloquearon mediante incubación con solución de bloqueo (Dako) durante 10 minutos. Todas las incubaciones se realizaron en cámara húmeda y a temperatura ambiente.

Los portaobjetos se lavaron con PBS y se incubaron durante 15 minutos con avidina- estreptavidina (Vector). Tras lavar con PBS durante 5 minutos se incubaron con biotina (Vector), 15 minutos y se lavaron de nuevo con PBS, 5 minutos.

A continuación las preparaciones se incubaron con el anticuerpo primario en solución de bloqueo (PBS con suero de cabra al 5%) o únicamente con solución de bloqueo, sin el anticuerpo primario (para el control) durante 1 hora. Tras un lavado extensivo con PBS, las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario en solución de bloqueo, durante 45 minutos. Se lavaron extensivamente con PBS y se incubaron con peroxidasa- estreptavidina (Vector) en PBS, durante 30 minutos. Tras varios lavados, se incubaron a temperatura ambiente con DAB, durante aproximadamente 10-15 minutos, hasta la aparición de señal. Se lavaron con PBS y se procedió a deshidratar siguiendo la misma batería de alcoholes que al inicio pero esta vez en sentido creciente, finalizando con la incubación en xilol durante 20 segundos.

Finalmente las muestras se incluyeron en pegamento de montaje "EUKITT®" para su observación y análisis al microscopio óptico mediante fotografías utilizando la cámara digital "SPOT Insight V 3.5." acoplada al microscopio y el programa "Spot Advance 3.5.4.1."

ANÁLISIS DE WESTERN BLOT

Para el ensayo de Western se han utilizado extractos de proteínas de muestras humanas y de colon de ratón. Los extractos de proteínas se obtuvieron mediante homogenización del tejido con Politron a alta velocidad en solución RIPA (0,15M NaCl,

1% Triton X-100, 1% Deoxicolato Sódico, 0,1% SDS, 10 mM Na₂HPO₄, 10 mM NaH₂PO₄, 2 mM EDTA, 15 mM β-Mercaptoetanol) con inhibidores de proteasas. Los inhibidores de proteasas utilizados han sido: aprotinina (10 µg/ml), leupeptina (10 µg/ml), fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) (0,2 mM) y benzamidina (0,2 mM). El homogenado se incubó a 4°C durante 10 minutos y se clarificó mediante centrifugación a 14.000g durante 30 minutos. La concentración de proteínas presente en los extractos empleados se determinó mediante el método descrito por Bradford (1976). Esta técnica se basa en el empleo del colorante azul brillante de Coomassie (aminotiarilmetano) (Bio-Rad), el cual se une a las proteínas dando lugar a un complejo azul, cuya absorbancia se mide por espectrofotometría a 595 nm. Se empleó γ-Globulina como proteína estándar.

Una vez obtenidos los extractos proteicos, se realizó la electroforesis en un gel de acrilamida-SDS de gradiente 4-15% (Bio-Rad) con 70 µg de proteína para las muestras humanas o bien, en un gel de acrilamida-SDS al 10% con 20 µg de proteína para las muestras de ratón, según el método tradicional de Laemmli y cols. (1970). A continuación, se realizó la transferencia a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm de diámetro de poro (NitroBind, Osmonics). Para bloquear las uniones inespecíficas del anticuerpo, la membrana se incubó con leche no grasa (Bio-Rad) al 5% en TBST (0,9% NaCl, 0,1% Tween 20 y 0,1M Tris-HCl, pH 7,5) durante 2 horas a temperatura ambiente. Seguidamente, se incubó con el anticuerpo primario diluido en TBST con 5% de leche (Tabla 1) a 4°C durante 15 horas. Las membranas se lavaron 3 veces con TBST durante 15 minutos. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario diluido en TBST con 5% de leche (Tabla 1), a temperatura ambiente durante 1 hora, seguido de otros 3 lavados de 15 minutos con TBST. Para normalizar la abundancia de la reelina, las membranas también se incubaron con el anticuerpo anti-GAPDH o con anti-β-Actina (Tabla 1) seguido de una incubación con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa. La visualización de las bandas se realizó mediante quimioluminiscencia utilizando el kit “ECL Western Blotting Analysis System” (Amersham), siguiendo las indicaciones del fabricante. Seguidamente se reveló mediante autorradiografía utilizando la película fotográfica Hyperfilm ECL (Amersham). El tamaño de las bandas se calculó a partir de un marcador estándar de proteínas (Bio-

Rad) y su abundancia relativa se cuantificó mediante el programa informático “Image J” versión 1.46 (National Institutes for Health).

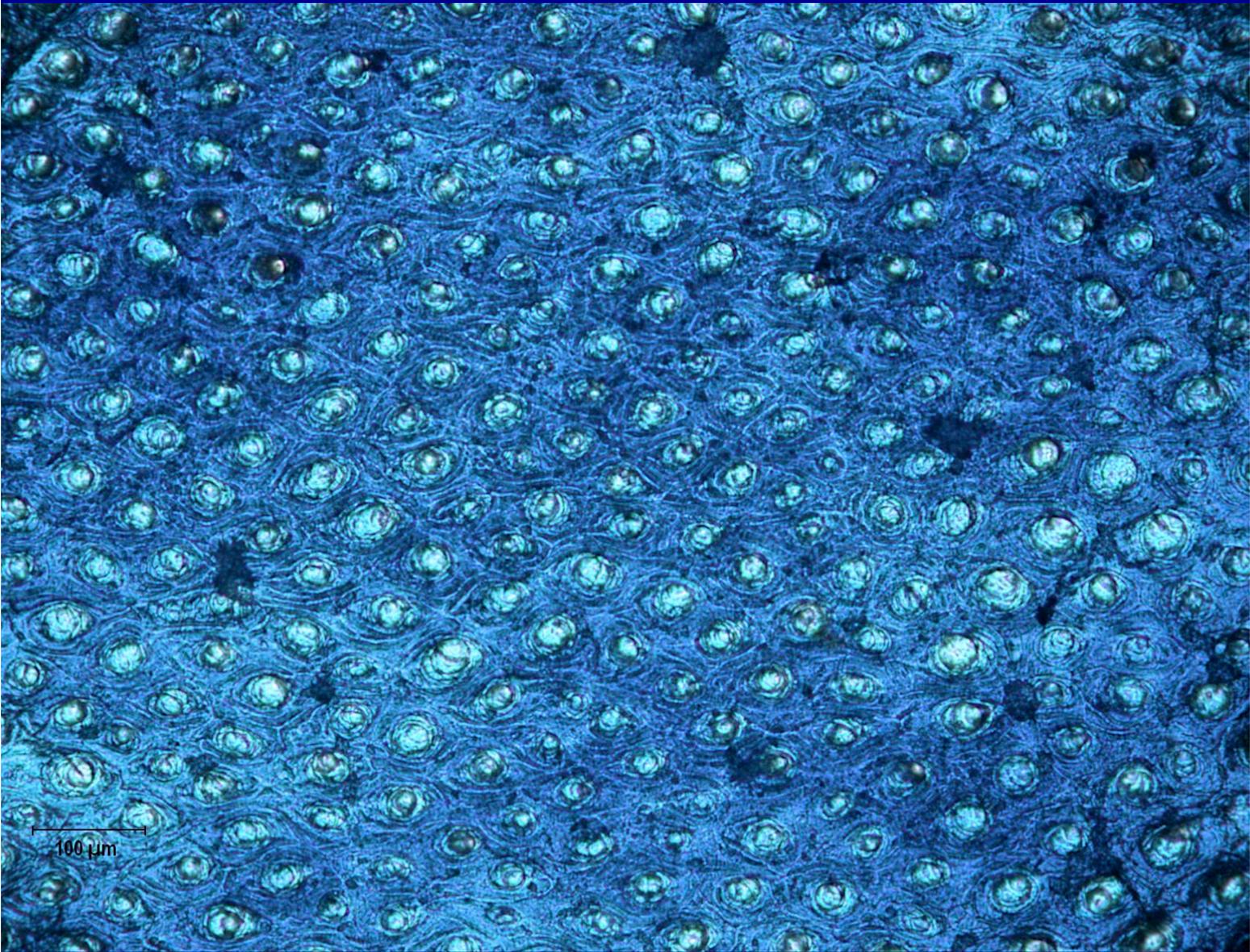
MEDIDA DEL GRADO DE METILACIÓN DEL ADN GENÓMICO

El estado de metilación de las islas 5’CpG del gen de la reelina se determinó mediante PCR específica de metilación (MSP), según lo descrito previamente por Stein y cols. (2010). El ADN genómico se aisló de las muestras humanas utilizando el “DNeasy Blood and Tissue Kit” (Quiagen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se trataron 500 ng de ADN genómico con bisulfato de sodio mediante el “Zymo EZ DNA Methylation Kit” (Zymo Research, Irvine, CA) diluido en 10ml de tampón de elución. En cada reacción de PCR se utilizan 2 µl de la solución de ADN genómico modificado. La secuencia de los cebadores usados en el ensayo de MSP de reelina fueron (5’...3’): GGGTGTTCCTTTAGGTTTGGTT (sentido) y CCAAAAATTCCACAAAAACAAC (antisentido) para las reacciones no metiladas (156 pares de bases) y GGCGTTCCTTTAGGTTTGGTC (sentido) y CGAAAAATTCCGCGAAAAACG (antisentido) para reacciones metiladas (155 pares de bases). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando la ADN polimerasa “PCR MyFi DNA Polymerase” (Bioline) en un termociclador MiniOpticon™ System (BioRad) siguiendo el siguiente protocolo: 1 minuto a 95°C para desnaturalizar el ADN, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 15 segundos a 60°C y 30 segundos a 72°C y por último, una etapa de elongación de 5 minutos a 72°C. Los productos de las reacciones se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y se visualizaron gracias al uso de “RedSafe” (Intron Biotechnology). Los niveles de metilación se calcularon como la proporción de cada banda (metilada y no metilada) respecto a la suma de ambas bandas, utilizando el programa informático “Image J” versión 1.46 (National Institutes for Health).

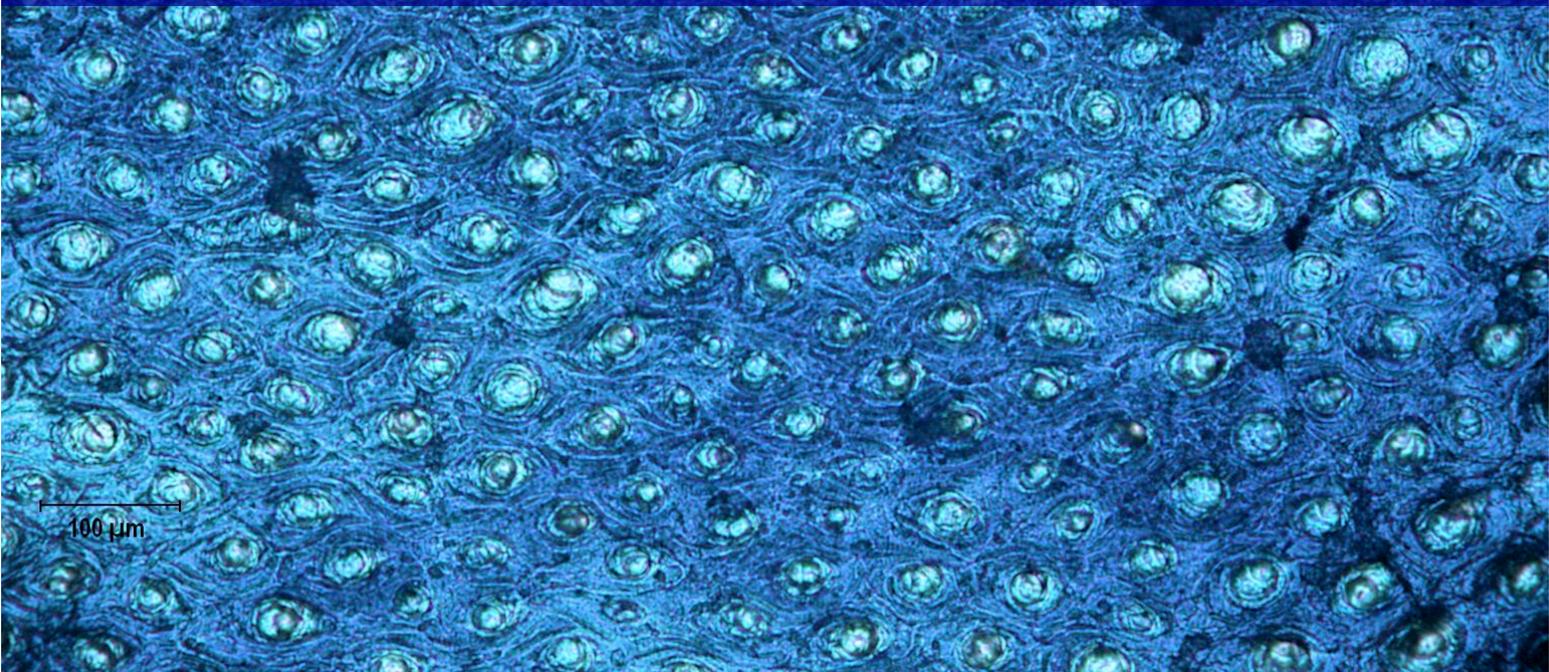
PRESENTACIÓN DE LOS RESULTADOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se presentan como la media acompañada de su error estándar. El número de experimentos realizados y/o el número de animales utilizados se indica en los pies de figura. La comparación entre los distintos grupos experimentales se realizó estadísticamente mediante el test de la “t de Student”.

También se realizaron correlaciones de Pearson y análisis de Spearman para estudiar correlaciones no paramétricas, usando el programa informático “GraphPad Prism 6”. Las correlaciones son significativas cuando $p < 0.05$.



Bibliografía



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

Abreu MT. (2010) Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat Rev Immunol.* 10(3):215.

Akimori T, Hanazaki K, Okabayashi T, Okamoto K, Kobayashi M, Ogata T. (2011) Quantitative distribution of brush cells in the rat gastrointestinal tract: brush cell population coincides with NaHCO₃ secretion. *Med Mol Morphol.* 44:7-14.

Alrawi SJ, Schiff M, Carroll RE, Dayton M, Gibbs JF, Kulavlat M, Tan D, Berman K, Stoler DL, Anderson GR. (2006) Aberrant crypt foci. *Anticancer Res.* 26(1A):107-19.

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

Asociación Española Contra el Cáncer, AECC. En: <https://www.aecc.es>.

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

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

Becker J, Fröhlich J, Perske C, Pavlakovic H, Wilting J. Source. (2012) Reelin signalling in neuroblastoma: migratory switch in metastatic stages. *Int J Oncol.* 41(2):681-689.

Belley A, Keller K, Göttke M y Chadee K. (1999) Intestinal mucins in colonization and host defense against pathogens. *Am J Trop Med Hyg.* 60:10-15.

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

Bienz M, Clevers H. (2000) Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell*. 103(2):311– 320.

Bird RP. (1987) Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett*. 37:147-51.

Bissahoyo A, Pearsall RS, Hanlon K, Amann V, Hicks D, Godfrey VL, Threadgill DW. (2005) Azoxymethane is a genetic background-dependent colorectal tumor initiator and promoter in mice: effects of dose, route and diet. *Toxicological Science* 88(2):340-345.

Boland CR, Goel A. (2010) Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 138(6): 2073–208

Botella-Lopez A, de Madaria E, Jover R, Bataller R, Sancho-Bru P, Candela A, Compañ A, Pérez-Mateo M, Martínez S y Sáez-Valero J. (2008) Reelin is overexpressed in the liver and plasma of bile duct ligated rats and its levels and glycosylation are altered in plasma of humans with cirrosis. *Int J Biochem Cell Biol*. 40:766-775.

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

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

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

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

Bussard KM, Mutkus L, Stumpf K, Gomez-Manzano C, Marin FC. (2016) Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. *Breast Cancer Res.* 18: 84.

Carvajal AE, de los Santos A, Vazquez-Carretero MD, Peral MJ, Ilundain AA, Calonge ML. (2014) The colon of control and reeler mice in health and disease, *Acta Physiol.* 212;90.

Carvajal AE, Serrano-Morales JM, Vázquez-Carretero MD, García-Miranda P, Calonge ML, Peral MJ, Ilundain AA. (2017b) Reelin protects from colon pathology by maintaining the intestinal barrier integrity and repressing tumorigenic genes. *Biochim Biophys Acta.* 1863(9):2126-2134.

Carvajal AE, Vázquez-Carretero MD, García-Miranda P, Peral MJ, Calonge ML, Ilundain AA. (2017a) Reelin expression is up-regulated in mice colon in response to acute colitis and provides resistance against colitis. *Biochim Biophys Acta.* 1863(2):462-473.

Carvajal AE, Vázquez-Carretero MD, Ilundáin AA, Calonge ML y Peral MJ. (2013) Colitis up-regulates reelin expression in the colon. *J Physiol Biochem.* (Abstract de Congreso).

Caspari R, Friedl W, Mandl M, Möslein G, Kadmon M, Knapp M, Jacobasch KH, Ecker KW, Kreissler-Haag D, Timmermanns G. (1994) Familial adenomatous polyposis: mutation at codon 1309 and early onset of colon cancer. *Lancet.* 343:629–32.

Castellano E, Molina-Arcas M, Krygowska AA, East P, Warne P, Nicol A, Downward J. (2016) RAS signalling through PI3-Kinase controls cell migration via modulation of Reelin expression. *Nat Commun.* 7:11245.

Castellone MD, Teramoto H, Williams BO, Druey KM, Gutkind JS. (2005) Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin-beta-catenin signaling axis. *Science.* 310(5753):1504–1510.

Chen J, Huang X. (2009) The signal pathways in azoximethane-induced colon cancer and preventive implications. *Cancer Biology & Therapy*. 8:14 1313-1317.

Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. (1993) Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*. 69(2):238-249.

Courtès S, Vernerey J, Pujadas L, Magalon K, Cremer H, Soriano E, Durbec P, Cayre M. (2011) Reelin controls progenitor cell migration in the healthy and pathological adult mouse brain. *PLoS One*.6(5):e20430.

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

Cummings OW. (2000) Pathology of the adenoma-carcinoma sequence: from aberrant crypt focus to invasive carcinoma. *Semin Gastrointest Dis*. 11(4):229-37.

D'Arcangelo G. (2014) Reelin in the Years: Controlling Neuronal Migration and Maturation in the Mammalian Brain. *Advances in Neuroscience*, Article ID 597395.

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

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

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

De Wever O, Demetter P, Mareel M, Bracke M. (2008) Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *Int J Cancer*. 123, 2229-2238.

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

Dorudi S, Sheffield JP, Poulson R, Northover JMA, Hart R. (1993) E-cadherin expression in colorectal cancer. *American Journal of Pathology* 142(4):981-986.

Dubuissez M, Faiderbe P, Pinte S, Dehennaut V, Rood BR, Leprince D. (2013) The Reelin receptors ApoER2 and VLDLR are direct target genes of HIC1 (Hypermethylated In Cancer 1). *Biochem Biophys Res Commun.* 440:424-430.

Erickson CA, Stigler KA, Corkins MR, Posey DJ, Fitzgerald JF, McDougle CJ. (2005) Gastrointestinal factors in autistic disorder: a critical review. *J Autism Dev Disord.* 35(6):713-27.

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

Fatemi SH, Snow AV, Stary JM, Araghi-Niknam M, Reutiman TJ, Lee S, Brooks AI, Pearce DA. (2005) Reelin signaling is impaired in autism. *Biol Psychiatry.* 57(7):777-87.

Fenoglio-Preiser C.M., Noffsinger A. (1999) Aberrant crypt foci: A review, *Toxicol. Pathol.* 27:632-642.

Ficari F, Cama A, Valanzano R, Curia MC, Palmirotta R, Aceto G, Esposito DL, Crognale S, Lombardi A, Messerini L, Mariani-Costantini R, Tonelli F, Baptista P. (2000) APC gene mutations and colorectal adenomatosis in familial adenomatous polyposis. *Br J Cancer.* 82(2):348-353.

Fodde R, Smits R. (2001) Disease model: familial adenomatous polyposis. *Trends in Molecular Medicine.* 7(8): 369:373.

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

Fredericks E, Dealtry G, Roux S. (2015) Molecular aspects of Colorectal Carcinogenesis: A Review. *J Cancer Biol Res* 3(1): 1057.

Fujii S, Katake Y, Tanaka H. (2010) Increased expression of DNA methyltransferase-1 in non-neoplastic epithelium helps predict colorectal neoplasia risk in ulcerative colitis. *Digestion*. 82:179-186.

Galgut BJ, Lemberg DA, Day AS, Leach ST. (2018) The Value of Fecal Markers in Predicting Relapse in Inflammatory Bowel Diseases. *Front Pediatr* 19. 5-292.

García-Miranda P, Galindo-Galindo A, Ilundáin AA y Peral MJ. (2012b) Reelin mRNA expression is reduced in human colorectal cáncer. *Genes Nutr*. 6:S77 (Abstract de Congreso).

García-Miranda P, Peral M J y Ilundáin A. (2010) Rat small intestine expresses the reelin-Dab1 signalling pathway. *Exp Physiol*. 95:498-507.

García-Miranda P, Vázquez-Carretero MD, Gutiérrez G, Peral MJ y Ilundáin AA. (2012a) Lack of reelin modifies the gene expression in the small intestine of mice. *J Physiol Biochem*. 68:205-218.

García-Miranda P, Vázquez-Carretero MD , Sesma P , Peral MJ y Ilundáin A. (2013) Reelin is involved in the crypt-villus unit homeostasis. *Tissue Eng Part A* 19(1-2):188-98.

Garnis C, Campbell J, Davies JJ, Macaulay C, Lam S, Lam WL. (2005) Involvement of multiple developmental genes on chromosome 1p in lung tumorigenesis. *Hum Mol Genet*. 14:475-482.

Gommeaux J, Cano C, Garcia S, Gironella M, Pietri S, Culcasi M, Pébusque MJ, Malissen B, Dusetti N, Iovanna J, Carrier A. (2007) Colitis and colitis-associated cancer are exacerbated in mice deficient for tumor protein 53-induced nuclear protein 1. *Mol Cell Biol*. 27(6):2215-28.

Gonzalez-Pons M, Cruz-Correa M. (2015) Colorectal Cancer Biomarkers: Where Are We Now? *Biomed Res Int*. 149014.

Grady WM, Carethers JM. (2008) Genomic and Epigenetic Instability in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Gastroenterology*. 135(4):1079–1099.

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

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

Grayson DR. (2010) Schizophrenia and the epigenetic hypothesis. *Epigenomics* 1: 201–211.

Guda K, Claffey KP, Dong M, Nambiar PR, Rosenberg DW. (2003) Defective processing of the transforming growth factor- β 1 in azoxymethane-induced mouse colon tumors. *Molecular Carcinogenesis* 37:51-59.

Guidotti A, Auta J, Davis JM, Di-Giorgi-Gerevini V, Dwivedi Y, Grayson DR, Impagnatiello F, Pandey G, Pesold C, Sharma R, Uzunov D, Costa E. (2000) Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem brain study. *Arch Gen Psychiatry*. 57(11):1061-9.

Günther C, Neumann H, Becker C. (2013) Apoptosis, necrosis and necroptosis: cell death regulation in the intestinal epithelium. *Gut*. 62(7):1062-71.

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

Hagland HR, Berg M, Jolma IW, Carlsen A, Søreide K. (2013) Molecular Pathways and Cellular Metabolism in Colorectal Cancer. *Dig. Surg*. 30:12-25.

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

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

Hong SE, Shugart YY, Huang DT, Al Shahwan S, Grant PE, Hourihane J O'B, Martin NDT, Walsh CA. (2000) Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations. *Nature Genetics* 26:93-96.

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

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

Ikeda Y y Terashima T. (1997) Expression of reelin, the gene responsible for the reeler mutation, in embryonic development and adulthood in the mouse. *Dev Dyn.* 210: 157-172.

Impagnatiello F, Guidotti AR, Pesold C, Dwivedi Y, Caruncho H, Pisu MG, Uzunov DP, Smalheiser NR, Davis JM, Pandey GN, Pappas GD, Tueting P, Sharma RP, Costa E. (1998) A decrease of reelin expression as a putative vulnerability factor in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(26):15718-23.

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

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

Jossin Y, Goffinet AM. (2007) Reelin signals through phosphatidylinositol 3-kinase and Akt to control cortical development and through mTor to regulate dendritic growth. *Mol Cell Biol.* 27(20):7113-24.

Joyce NC, Haire MF y Palade GE. (1987) Morphologic and biochemical evidence for a contractile cell network within the rat intestinal mucosa. *Gastroenterology*. 92: 68-81.

Kaler P, Augenlicht L, Klampfer L. (2009a) Macrophage-derived IL-1beta stimulates Wnt signaling and growth of colon cancer cells: a crosstalk interrupted by vitamin D3. *Oncogene*. 28(44):3892–3902.

Kaler P, Godasi BN, Augenlicht L, Klampfer L. (2009b) The NF-kappaB/AKT-dependent Induction of Wnt Signaling in Colon Cancer Cells by Macrophages and IL-1beta. *Cancer Microenviron*. 2(1):69–80.

Kalluri R, Weinberg RA. (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 119(6):1420-1428.

Kang Y, Massague J. (2004) Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell*. 118:277-279.

Khialeeva E, Lane TF, Carpenter EM. (2011) Disruption of reelin signaling alters mammary gland morphogenesis. *Development*. 138:767-776.

Khialeeva E, Carpenter EM. (2017) Nonneuronal roles for the reelin signaling pathway. *Dev. Dyn.*, 246: 217-226.

Kidd S, Spaeth E, Watson K, Burks J, Lu H, Klopp A, Andreeff M, Marini FC. (2012) Origins of the tumor microenvironment: quantitative assessment of adipose-derived and bone marrow-derived stroma. *PLoS One*.7:e30563.

Kinzler KW, Vogelstein B. (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*. 18;87(2):159-70.

Knudson, A.G. (2002) Cancer genetics. *Am. J. Med. Genet*. 111, 96–102.

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

Kobayashi M, Honma T, Matsuda Y, Suzuki Y, Narisawa R, Ajioka Y, Asakura H. (2000) Nuclear translocation of beta-catenin in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 82(10):1689-93.

Kobold D, Grundmann A, Piscaglia F, Eisenbach C, Neubauer K, Steffgen J, Ramadori G, Knittel T. (2002) Expression of reelin in hepatic stellate cells and during hepatic tissue repair: a novel marker for the differentiation of HSC from other liver myofibroblasts. *J Hepatol*. 36: 607-613.

Koliaraki V, Pallangyo CK, Greten FR, Kollias G. (2017) Mesenchymal Cells in Colon Cancer. *Gastroenterology*. 152:964–979.

Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW. (1997) Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science*. 275(5307):1784–1787.

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

Lee SK, Hwang JH, Choi KY. (2018) Interaction of the Wnt/ β -catenin and RAS-ERK pathways involving co-stabilization of both β -catenin and RAS plays important roles in the colorectal tumorigenesis. *Adv Biol Regul*. 68:46-54.

Levenson JM, Qiu S, Weeber EJ. (2008) The role of reelin in adult synaptic function and the genetic and epigenetic regulation of the reelin gene. *Biochim Biophys Acta* 1779:422-431.

Levine AJ. (2011) The Changing Directions of p53 Research. *Genes Cancer*. 2(4): 382–384.

Li XL, Zhou J, Chen ZR, Chng WJ (2015). P53 mutations in colorectal cancer- Molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World Journal of Gastroenterology*. 21 (1):84-93.

Li Y, Deuring J, Peppelenbosch MP, Kuipers EJ, de Haar C, van der Woude CJ. (2012) IL-6-induced DNMT1 activity mediates SOCS3 promoter hypermethylation in ulcerative colitis-related colorectal cancer. *Carcinogenesis*. 33:1889-1896.

Lindblom, A. (2001) Different mechanisms in the tumorigenesis of proximal and distal colon cancers. *Curr Opin Oncol.* 13(1):63-9.

Long H, Bock HH, Lei T, Chai X, Yuan J, Herz J, Frotscher M, Yang Z. (2011) Identification of alternatively spliced Dab1 and Fyn isoforms in pig. *BMC Neurosci.* 5;12:17.

Lopez-Ceron M, Pellise M. (2012) Biology and diagnosis of aberrant crypt foci. *Colorectal Dis.* 14(4):e157-64.

Lorenz, E, Stewart, HL. (1941) Intestinal carcinoma and other lesions in mice following oral administration of 1,2,5,6-dibenzanthracene and 20-methyleholanthrene. *J. Natl. Cancer Inst.,* 1, 17-40.

Lorenzetto, E, Panteri, R, Marino, R, Keller F, Buffelli M. (2008) Impaired nerve regeneration in reeler mice after peripheral nerve injury. *Eur J Neurosci.* 27: 12-19.

Low D, Mino-Kenudson M, Mizoguchi E. (2014) Recent advancement in understanding colitis-associated tumorigenesis. *Inflamm Bowel Dis.* 20(11):2115–2123.

Lutter S, Xie S, Tatin F, Makinen T. (2012) Smooth muscle-endothelial cell communication activates Reelin signaling and regulates lymphatic vessel formation. *J Cell Biol.* 11;197:837-849.

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

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

Maurin JC, Couble ML, Didier-Bazes M, Brisson C, Magloire H, Bleicher F. (2004) Expression and localization of reelin in human odontoblasts. *Matrix Biol.* 23(5):277-85.

Medema JP, Vermeulen L. (2011) Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature* 474, 318–326.

McAnulty RJ. (2007) Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 39:666-671.

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

McGinley JN, Thompson M.D, Thompson HJ. (2010) A method for serial tissue processing and parallel analysis of aberrant crypt foci, mucin depletion, and beta-catenin staining in an experimental model of colon carcinogenesis. *Biol Proced Online.* 12:118-130.

McLellan EA, Bird RP. (1988) Aberrant crypts: potential preneoplastic lesions in the murine colon. *Cancer Research* 48:6187-6192.

Miao S, Chen R, Ye J, Tan GH, Li S, Zhang J, Jiang YH, Xiong ZQ. (2013) The Angelman Syndrome Protein Ube3a Is Required for Polarized Dendrite Morphogenesis in Pyramidal Neurons. *The Journal of Neuroscience.* 33(1): 327-333.

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

Mihail, A, Coman, G, Staniceanu, F, Coman, L, Zurac, S, Coman, O. (2017). Reelin and its receptors, VLDLR and ApoER2, in melanocytic nevi . *Journal of Medicine and Life,* 10(1), 85–89.

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

Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B. (1997) Activation of beta- catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science.* 275(5307):1787–1790.

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

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

Nordgaard I, Hansen BS, Mortensen PB. (1996) Importance of colonic support for energy absorption as small-bowel failure precedes. *Am J Clin Nutr.* (2):222-31.

Okamura Y, Nomoto S, Kanda M, Hayashi M, Nishikawa Y, Fujii T, Sugimoto H, Takeda S, Nakao A. (2011) Reduced expression of reelin (RELN) gene is associated with high recurrence rate of hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 18:572-579.

Panteri R, Mey J, Zhelyaznik N, D'Altocolle A, Del Fà A, Gangitano C, Marino R, Lorenzetto E, Buffelli M, Keller F. (2006) Reelin is transiently expressed in the peripheral nerve during development and is upregulated following nerve crush. *Mol Cell Neurosci.* 32(1-2):133-42.

Park TJ, Curran T. (2008) Crk and CrkL play essential overlapping roles downstream of Dab1 in the Reelin pathway. *J Neurosci.* 28(50):13551-13562.

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

Perrone G, Vincenzi B, Zagami M, Santini D, Panteri R, Flammia G, Verzì A, Lepanto D, Morini S, Russo A, Bazan V, Tomasino RM, Morello V, Tonini G, Rabitti C. (2007) Reelin expression in human prostate cancer: a marker of tumor aggressiveness based on correlation with grade. *Mod Pathol.* 20(3):344-51.

Pinchuk IV, Mifflin RC, Saada JI, Powell DW. (2010) Intestinal mesenchymal cells. *Curr Gastroenterol Rep.* 12(5):310-8.

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

Powell DW, Pinchuk IV, Saada JI, Xin Chen, Mifflin RC. (2011) Mesenchymal cells of the intestinal lamina propia. *Annu. Rev. Physiol.* 73:213-37.

Pulido JS, Sugaya I, Comstock J y Sugaya K. (2007) Reelin expression is upregulated following ocular tissue injury. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 245: 889-893.

Qin X, Lin L, Cao L Zhang X, Song X, Hao J, Zhang Y, Wei R, Huang X Lu J Ge Q. (2017) Extracellular matrix protein Reelin promotes mieloma progression by facilitating tumor cell proliferation and glycolysis. *Scientific Reports.* 7:45305.

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

Reddy SS, Connor TE, Weeber EJ, Rebeck W. (2011) Similarities and differences in structure, expression, and functions of VLDLR and ApoER2. *Mol Neurodegener.* 9;6:30.

Rice DS y Curran T. (2001) Role of the reelin signaling pathway in central nervous system development. *Annu Rev Neurosci.* 24: 1005-1039.

Roncucci L, Pedroni M, Vaccina F, Benatti P, Marzona L, De Pol A. (2000) Aberrant crypt foci in colorectal carcinogenesis. Cell and crypt dynamics. *Cell Prolif.* 33(1):1-18.

Rosenberg DW, Giardina C, Tanaka T. (2009) Mouse models for the study of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 30(2):183-196.

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

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

Sáez-Valero J, Costell M, Sjögren M, Andreasen N, Blennow K, Luque JM. (2003) Altered levels of cerebrospinal fluid reelin in frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *J Neurosci Res.* 72(1):132-6.

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

Samstein RM, Chan TA. (2017) Dissecting microsatellite instability in colorectal cancer: one size does not fit all. *Genome Medicine.* 9:45.

Sato N, Fukushima N, Chang R, Matsubayashi H y Goggins M. (2006) Differential and epigenetic gene expression profiling identifies frequent disruption of the RELN pathway in pancreatic cancers. *Gastroenterology.* 130: 548-565.

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

Schmid RS, Jo R, Shelton S, Kreidberg JA y Anton ES. (2005) Reelin, integrin and DAB1 interactions during embryonic cerebral cortical development. *Cereb Cortex.* 15: 1632-1636.

Schulmann K, Mori Y, Croog V, Yin J, Olaru A, Sterian A. (2005) Molecular phenotype of inflammatory bowel disease-associated neoplasms with microsatellite instability. *Gastroenterology.* 129(1):74–85.

Schulze M, Violonchi C, Swoboda S, Welz T, Kerkhoff E, Hoja S, Brüggemann S, Simbürger J, Reinders J, Riemenschneider MJ1. (2017) RELN signaling modulates glioblastoma growth and substrate-dependent migration. *Brain Pathol.* doi: 10.1111/bpa.12584.

Seigel GM, Hackam AS, Ganguly A, Mandell LM, Gonzalez-Fernandez F. (2007) Human embryonic and neuronal stem cell markers in retinoblastoma. *Mol Vis.* 13:823-832.

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

Serajee FJ, Zhong H, Mahbubul Huq AH. (2005) Association of Reelin gene polymorphisms with autism. *Genomics.* 87(1):75-83.

Simon-Assmann P, Kedinger M, De Arcangelis A, Rousseau V, Simo P. (1995) Extracellular matrix components in intestinal development. *Experimentia.* 51(9-10):883-900.

Smalheiser NR, Costa E, Guidotti A, Impagnatiello F, Auta J, Lacor P, Kriho V, Pappas GD. (2000) Expression of reelin in adult mammalian blood, liver, pituitary pars intermedia, and adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97: 1281-1286.

Sipos F, Fúri I, Constantinovits M, Tulassay Z, Múzes G. (2014) Contribution of TLR signaling to the pathogenesis of colitis-associated cancer in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 20(36): 12713–12721.

Sonoshita M, Itatani Y, Kakizaki F, Sakimura K, Terashima T, Katsuyama Y, Sakai Y, Taketo M. (2014) Promotion of Colorectal Cancer Invasion and Metastasis through Activation of NOTCH–DAB1–ABL–RHOGEF Protein TRIO. *AACR* 10.1158/2159-8290.

Stein T, Cosimo E, Yu X, Smith PR, Simon R, Cottrell L, Pringle MA, Bell AK, Lattanzio L, Sauter G, Lo Nigro C, Crook T, Machesky LM, Gusterson BA. (2010) Loss of reelin expression in breast cancer is epigenetically controlled and associated with poor prognosis. *Am J Pathol.* 177:2323-2333.

Subramaniam R, Mizoguchi A, Mizoguchi E. (2016) Mechanistic roles of epithelial and immune cell signaling during the development of colitis-associated cancer, *Cancer Res Front.* 2(1):1-21.

Tahara T, Inoue N, Hisamatsu T, Kashiwagi K, Takaishi H, Kanai T, Watanabe M, Ishii H, Hibi T. (2005) Clinical significance of microsatellite instability in the inflamed mucosa for the prediction of colonic neoplasms in patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol.* 20(5):710-5.

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

Tanaka T, Kohno H, Suzuki R, Yamada Y, Sugie S, Mori H. (2003) A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci.* 94(11):965-73.

Terzić J, Grivennikov S, Karin E, Karin M. (2010) Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology.* 2010 Jun;138(6):2101-2114.e5.

Thaker AI, Shaker A, Rao MS, Ciorba MA. (2012). Modeling colitis-associated cancer with azoxymethane (AOM) and dextran sulfate sodium (DSS). *J Vis Exp.* 11;(67).

Tissir F y Goffinet AM. (2003) Reelin and brain development. *Nat Rev Neurosci.* 4: 496-505.

Tjalsma H, Boleij A, Marchesi JR, Dutilh BE. (2012) A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nat Rev Microbiol.* 10(8):575–582.

Tsushima H, Kawata S, Tamura S, Ito N, Shirai Y, Kiso S, Imai Y, Shimomukai H, Nomura Y, Matsuda Y, Matsuzawa Y. (1996) High levels of transforming growth factor beta 1 in patients with colorectal cancer: association with disease progression. *Gastroenterology.* 110:375-382.

Union for International Cancer Control, UICC, TNM classification. En: <http://www.uicc.org/resources/tnm>.

Van der Flier LG, Clevers H. (2009) Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol.* 71:241-260.

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

Vermeulen L, De Sousa EMF, van der Heijden M, Cameron K, de Jong JH, Borovski T. (2010) Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol.* 12(5):468–476.

Vogelstein B, Kinzler KW. (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine.* 10:789–799.

Voorneveld PW, Kodach LL, Jacobs RJ. (2015) The BMP pathway either enhances or inhibits the Wnt pathway depending on the SMAD4 and p53 status in CRC. *British Journal of Cancer.* 112(1):122-130.

Wales MM, Biel MA, el Deiry W, Nelkin BD, Issa J-PJ, Cavenee WK, Kuerbitz SJ Baylin SB. (1995). p53 activates expression of HIC-1, a new candidate tumor supresor gene on 17p13.1. *Nat. Med.*, 1, 570-577.

Wang Q, Lu J, Yang C, Wang X, Cheng L, Hu G, Sun Y, Zhang X, Wu M y Liu Z. (2002) CASK and its target gene Reelin were co-upregulated in human esophageal carcinoma. *Cancer Lett.* 179: 71-77.

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

Winslow T, National Cancer Institute, (2005). National Cancer Institute - NCI American Joint Committee on Cancer. *AJCC Cancer Staging Manual.* 6ª Edición (Nueva York).

Won SJ, Kim SH, Xie L, Wang Y, Mao XO, Jin K, Greenberg DA. (2006) Reelin-deficient mice show impaired neurogenesis and increased stroke size. *Exp Neurol.* 198(1):250-259.

Xie J, Itzkowitz SH. (2008) Cancer in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 14(3):378–389.

Xing F, Saidou J, Wataba K. (2011) Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. *Front Biosci.* ; 15: 166–179.

Yoo J, Rodriguez Perez CE, Nie W, Edwards RA, Sinnott-Smith J, Rozengurt E. (2012) TNF-alpha induces upregulation of EGFR expression and signaling in human colonic myofibroblasts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 302(8):G805–G814.

Yoo J, Rodriguez Perez CE, Nie W, Sinnott-Smith J, Rozengurt E. (2013) TNF-alpha and LPA promote synergistic expression of COX-2 in human colonic myofibroblasts: role of LPA-mediated transactivation of upregulated EGFR. *BMC Gastroenterol.* 13:90.

Yuan Y, Chen H, Ma G, Cao X, Liu Z. (2012) Reelin is involved in transforming growth factor- β 1-induced cell migration in esophageal carcinoma cells. *PLoS ONE.* 7(2):e31802.

Zhang YZ, Li YY. (2014) Inflammatory bowel disease: pathogenesis. *World J Gastroenterol.* 20:91-9.