



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFEECTO DE LAS CITOCINAS TNF-ALFA, IL-1BETA E
IFN- GAMMA EN LA FUNCIÓN DE BARRERA EPITELIAL Y
EN LA EXPRESIÓN DE CLAUDINAS EN CÉLULAS LLC-PK₁**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I Ó L O G A
P R E S E N T A:**

SAMANTHA NAHOLI RIVERA DÍAZ



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. ERIKA PATRICIA RENDÓN HUERTA**

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, mis abuelos y mis hermanos, muchas gracias por todo el apoyo y el cariño que me han brindado siempre, y por la paciencia que han tenido a lo largo de este proceso.

A Rodrigo, gracias por darme la motivación para seguir siempre adelante.

A la doctora Erika Rendón, muchas gracias por todo el apoyo durante la realización de este trabajo, y a mis sinodales y al M. en I.B.B. Simón Guzmán, gracias por todos sus comentarios para mejorarlo.

A todos mis amigos, del laboratorio y de la carrera, gracias por todos los momentos que compartimos. Ana, Bere, Pao, Christian, Jane, Monse, Yamile, Luis, Erick, gracias por todo lo que aprendí de ustedes, por alentarme, y por hacer mi estancia en el laboratorio tan enriquecedora y amena.

ÍNDICE

❖ ABREVIATURAS	1
❖ RESUMEN.....	2
❖ INTRODUCCIÓN	
▪ Uniones celulares, epitelios y transporte epitelial	4
♦ Uniones adherentes	5
♦ Desmosomas y hemidesmosomas	5
♦ Uniones Gap	7
♦ Uniones estrechas	8
▪ Ocludina	10
▪ JAM	10
▪ Tricelulina	11
▪ Claudinas	12
▪ ZO's	15
▪ Citocinas	16
♦ Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α).....	19
♦ Interleucina 1-beta (IL-1 β).....	19
♦ Interferón gamma (INF- γ).....	20
❖ ANTECEDENTES	
▪ Inflamación.....	22
▪ TNF - α	22
▪ IL-1 β	23
▪ INF- γ	24
▪ Citocinas en conjunto	25
❖ JUSTIFICACIÓN	26
❖ HIPÓTESIS	27
❖ OBJETIVOS	28

❖	METODOLOGÍA	
▪	Linea celular	29
▪	Tratamientos con citocinas	31
▪	Medición de la resistencia transepitelial	32
▪	Extracción de proteínas por fracciones subcelulares	33
▪	Cuantificación de proteínas	34
▪	Análisis de proteínas por western blot	35
▪	Análisis estadístico.....	36
❖	RESULTADOS	
▪	Efecto de diferentes concentraciones de citocinas en la TER de células LLC-PK1.....	37
▪	Efecto de la aplicación Apical o Basolateral de las citocinas en la TER	38
▪	Efecto individual de las citocinas sobre la TER a varios tiempos de tratamiento.....	38
▪	Efecto conjunto de TNF- α , IL-1 β e INF- γ en la TER.....	41
▪	Efecto del TNF- α en la expresión y localización subcelular de las claudinas	42
▪	Efecto de IL-1 β en la expresión y localización subcelular de las claudinas	47
▪	Efecto del IFN- γ en la expresión y localización subcelular de las claudinas	52
▪	Efecto conjunto de TNF- α , IL-1 β e INF- γ en la localización de claudinas	57
❖	DISCUSIÓN	
▪	Efecto de la concentración y el sitio de aplicación de las citocinas en la TER.....	63
▪	Tratamiento con TNF- α	64
▪	Tratamiento con IL-1 β	66
▪	Tratamiento con IFN- γ	67
▪	Tratamiento conjunto con TNF- α , IL-1 β e IFN- γ	68
❖	CONCLUSIONES	70
❖	REFERENCIAS	71
❖	ANEXOS	80

ABREVIATURAS

α -MEM: *Minimum Essential Medium Alpha*

AP-1: Proteína activadora 1

ASIP: *Agouti-signaling protein*

ATCC: *American Type Culture Collection*

CPE: Enterotoxina de *Clostridium perfringens*

GUK: Guanilato ciclasa

IBD: Enfermedad Inflamatoria intestinal

IFN- γ : Interferón-gamma

IL-1: Interleucina-1

IL-1ra: Antagonista del receptor de Interleucina-1

Jak-STAT: Vía de señalización (Janus Kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription)

JAM: *Junction Adhesion Molecules*

KO: Knockout

LLC-PK₁: Células epiteliales derivadas de riñón porcino

MAGUK: Guanilato ciclasas asociadas a membrana

MUPP-1: *Multi-PDZ domain protein 1*

NK- κ B: Factor de transcripción nuclear κ B

NK: Células *Natural Killer*

PAR-3: *Partitioning defective protein 3*

PATJ: Proteína asociada a uniones estrechas

PBS: Buffer Fosfato Salino

PDZ: Dominio estructural de varias proteínas (es un acrónimo que combina las primeras letras de las tres primeras proteínas donde se identificó dicho dominio)

SH3: SRC Homology 3 Domain

TBS: Tris Buffer Salino

TER: Resistencia Eléctrica Transepitelial

TIR/IRAK: Vía de señalización (*Toll Interleukin-1 receptor /interleukin-1 receptor associated kinase*)

TNF- α : Factor de necrosis tumoral-alfa

TNFR1 y TNFR2: Receptores del Factor de Necrosis Tumoral 1 y 2

TRAF: *TNF receptor associated factors*

TTBS: Tris Buffer Salino con Tween-20

UA: Uniones Adherentes

UE: Uniones Estrechas

ZO: *Zonula Occludens*

ZONAB: proteína asociada con ácidos nucleicos

RESUMEN

Las células de la mayoría de los tejidos se unen directamente unas con otras por medio de uniones intercelulares. Las uniones estrechas (UE) son las estructuras encargadas del sellado intercelular, actuando como una barrera para el transporte paracelular de iones y solutos. Juegan un papel crucial en el mantenimiento de la polaridad celular, actuando como una cerca que impide la difusión lateral de proteínas de membrana y lípidos, dividiendo los dominios apical y basolateral de las membranas plasmáticas. Las UE están formadas por varios componentes entre los que se encuentran proteínas de membrana como claudinas, ocludina, JAMs y tricelulina; proteínas de andamio que unen a las proteínas de membrana con el citoesqueleto, como ZO-1, ZO-2 y ZO-3; y otras proteínas citosólicas con funciones de señalización, tráfico vesicular y factores de transcripción. Las claudinas forman una familia de alrededor de 24 proteínas en mamíferos. Por lo general, la mayoría de los tejidos presentan varios tipos de claudinas y se observan distintos patrones de expresión de manera tejido-específica.

Se ha demostrado que las UE son estructuras dinámicas y están sujetas a modulación durante la remodelación de los tejidos epiteliales, reparación de heridas, inflamación, y transformación en tumores.

La inflamación es normalmente un proceso reparador pero en ocasiones, por falta de mecanismos compensatorios, esta reacción inflamatoria puede resultar exagerada o mantenerse por periodos prolongados dando lugar a cambios patológicos. Durante la inflamación, se reclutan células del sistema inmune en el foco inflamatorio, que deben pasar a través de los endotelios y epitelios.

Se ha reportado que la exposición a citocinas proinflamatorias reduce la integridad de la barrera epitelial y puede inducir la endocitosis de algunas proteínas de UE. Aunque se han hecho varios estudios del efecto de las citocinas en varias proteínas de UE, el efecto sobre la familia de las claudinas ha sido menos estudiado, y en la mayoría de los trabajos sólo se analiza a la claudina-1. Debido a que las claudinas juegan un papel central en la función de barrera de las UE, el objetivo del presente trabajo fué observar el efecto, tanto individual como en conjunto, de las citocinas pro-inflamatorias TNF- α , IL-1 β e IFN- γ en la línea celular LLC-PK₁, en la resistencia eléctrica transepitelial (TER) y en la expresión y localización subcelular de varias claudinas.

Se observó que el tratamiento con TNF- α indujo una disminución de la TER de casi el 50%, asociada posiblemente a la supresión de la expresión de claudina-5 en la fracción membranal, y a

un aumento en la expresión de claudina-2 en dicha fracción celular. En el tratamiento con IL-1 β se observó un incremento en la TER que alcanza su máximo a las 48h de tratamiento (de alrededor del 30%), sin embargo, aunque este tratamiento induce cambios en la expresión y localización de varias claudinas, el aumento en la TER no correlaciona con dichos cambios, por lo que éste puede deberse a cambios en otras proteínas no analizadas en el presente estudio. El tratamiento con IFN- γ indujo un incremento en la TER (de aproximadamente el 20 %), asociado con un aumento en la expresión de claudina-1 en la membrana celular. Cuando las células fueron tratadas con las tres citocinas en conjunto, la TER se mantuvo alrededor del nivel del control hasta las 24h de tratamiento, y posteriormente se observó una disminución de alrededor del 30%. Este efecto en la TER parece deberse a la expresión de claudina-5 en membrana, que se observa en el control y a las 24h de tratamiento, pero se suprime a partir de las 48h de tratamiento.

Por último, se comprobó que las citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β e IFN- γ inducen una alteración en la TER de las células epiteliales LLC-PK1, y que estos cambios (a excepción del tratamiento con IL-1 β) correlacionan con cambios en la expresión y localización de las claudinas estudiadas.

INTRODUCCIÓN

Uniones celulares, epitelios y transporte epitelial.

Las células de la mayoría de los tejidos se unen directamente unas con otras por medio de uniones intercelulares. En los tejidos epiteliales, las células se encuentran estrechamente unidas formando láminas que se denominan epitelios. Las capas de células epiteliales tapizan todas las cavidades del organismo ⁽¹⁾.

La función principal de los epitelios es separar los compartimentos estructurales de diferentes composiciones moleculares y regular el paso de diferentes sustancias entre ellos ^(2,3). El transporte epitelial puede llevarse a cabo por las vías transcelular y paracelular. El transporte transcelular se da a través de las células, es direccional, dependiente de energía, y regido por la presencia de canales y transportadores específicos; el transporte paracelular se da entre células adyacentes, es pasivo, y es el resultado de la difusión de moléculas a través de gradientes creados por los mecanismos transcelulares. Estos dos tipos de transporte permiten que los epitelios funcionen como barreras permeables capaces de crear gradientes eléctricos y de concentración de moléculas entre los fluidos lumenales y serosos. Las uniones especializadas entre las células permiten que el epitelio forme barreras que regulan el desplazamiento de agua, de solutos y de células mediante el transporte paracelular ^(4,5).

Las uniones celulares se localizan en regiones de contacto célula-célula y célula-matriz extracelular de todos los tejidos y son especialmente abundantes en los epitelios (Figura 1). Estas uniones pueden clasificarse en tres grupos funcionales ⁽¹⁾:

- Uniones de anclaje: que unen mecánicamente a las células con sus vecinas o la matriz extracelular (uniones adherentes, desmosomas y hemidesmosomas).
- Uniones de comunicación: que median el paso de señales químicas o eléctricas entre las células adyacentes (uniones de tipo gap).
- Uniones oclusivas: que proporcionan un sellado de la región situada entre las células epiteliales, limitando el paso de moléculas entre las caras del epitelio (uniones estrechas) ⁽¹⁾.

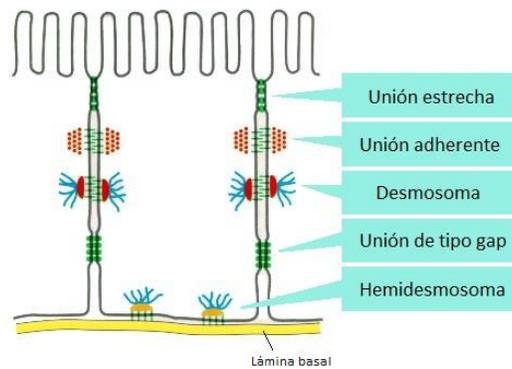


Figura 1. Esquema de los distintos tipos de uniones celulares en una célula epitelial intestinal. Modificado de (1)

Uniones adherentes

Las uniones adherentes (UA) forman una banda de adhesión continua (o *zonula adherens*) rodeando cada una de las células adyacentes⁽¹⁾ en los epitelios. Conectan haces de filamentos de actina de células adyacentes por la interacción en la región intercelular de cadherinas (principalmente la E-cadherina). Estas son proteínas de adhesión dependientes de Ca^{2+} , que atraviesan una vez la membrana plasmática⁽⁶⁾. Su dominio extracelular se extiende de la superficie celular y se une a las cadherinas presentes en células adyacentes, manteniendo unidas las membranas. Los dominios citoplasmáticos de las cadherinas forman un complejo multiprotéico con proteínas reguladoras y de anclaje (α -catenina, β -catenina y p120-catenina), que se unen a su vez con los filamentos de actina^(7, 8) (figura 2). Las uniones adherentes desempeñan varias funciones, incluyendo la iniciación y estabilización de las adhesiones célula-célula, la regulación del citoesqueleto de actina, señalización intracelular y regulación transcripcional⁽⁹⁾.

Desmosomas y hemidesmosomas

Los desmosomas son contactos intercelulares que mantienen unidas a las células entre sí. En el interior de la célula actúan como lugares de anclaje para los filamentos intermedios⁽¹⁰⁾. Mediante los desmosomas, los filamentos intermedios de las células adyacentes están conectados formando una red que se extiende a numerosas células del tejido. La clase específica de filamentos intermedios anclados a los desmosomas depende del tipo celular (en la mayoría de las células

epiteliales son de queratina) ⁽¹⁾. Constan de una placa citoplasmática densa, compuesta por un complejo proteico de anclaje intracelular (placoglobina y desmoplaquina) que es el responsable de la unión de los filamentos intermedios a las proteínas transmembranales de adhesión. Las proteínas transmembranales (desmogleína y desmocolina) pertenecen a la familia de las cadherinas, las cuales interactúan a través de sus dominios extracelulares manteniendo unidas las membranas adyacentes ^(1, 10) (Figura 3a). A pesar de que los desmosomas son críticos para mantener la adhesión célula-célula estable, son estructuras dinámicas que contribuyen a otros procesos celulares aparte de la adhesión ⁽¹¹⁾.

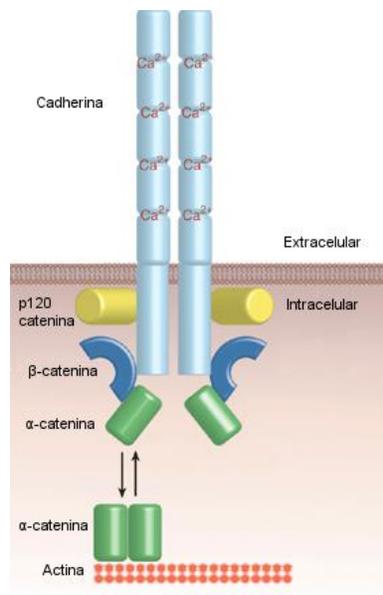


Figura 2. Esquema de las moléculas que intervienen en las uniones adherentes. Modificado de (7).

Los hemidesmosomas se asemejan a los desmosomas en su morfología y en su capacidad para conectar filamentos intermedios. En lugar de unir las membranas de las células adyacentes, unen el dominio basal de las células a la lámina basal. Las proteínas transmembranales de adhesión que intervienen en estas uniones célula-matriz son las integrinas. Los dominios extracelulares de las integrinas se unen a la laminina de la lámina basal, mientras que los dominios intracelulares se unen a los filamentos intermedios a través de una proteína de anclaje, llamada plectina ^(1, 12) (figura 3b).

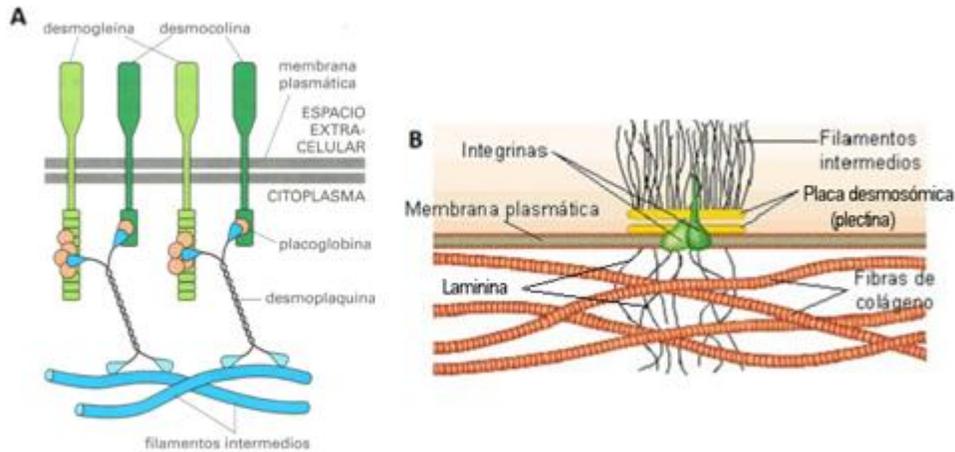


Figura 3. Esquema de las moléculas que forman un desmosoma (A) y un hemidesmosoma (B). Modificado de (1, 12).

Uniones Gap

Las uniones Gap (o uniones comunicantes) son agregados de canales intercelulares, llamados conexones, que permiten la difusión directa de iones inorgánicos y de otras pequeñas moléculas hidrosolubles entre células adyacentes⁽¹³⁾. Los conexones están compuestos por subunidades de conexina. Las conexinas son proteínas que contienen cuatro hélices transmembranales, y se ensamblan de seis en seis formando el conexón. Cuando los conexones de las membranas plasmáticas de dos células adyacentes están alineados, forman un canal acuoso continuo que conecta ambos citoplasmas⁽¹⁾ (Figura 4).

Hay un gran número de subtipos de conexinas, la interacción entre diferentes tipos de conexinas da como resultado la formación de conexones homoméricos y heteroméricos, lo que da diferentes características al canal^(14, 15). Mediante microscopía electrónica de transmisión se observan como regiones discretas en las que las membranas de dos células adyacentes están separadas por un espacio uniforme de unos 2 a 4 nm de amplitud. Los conexones mantienen las membranas separadas a una distancia fija, de aquí su denominación “gap” (separación o hueco)⁽¹⁾. Se ha mostrado que las uniones gap están involucradas en una gran variedad de funciones en la homeostasis, regulación, regeneración y desarrollo⁽¹³⁾.

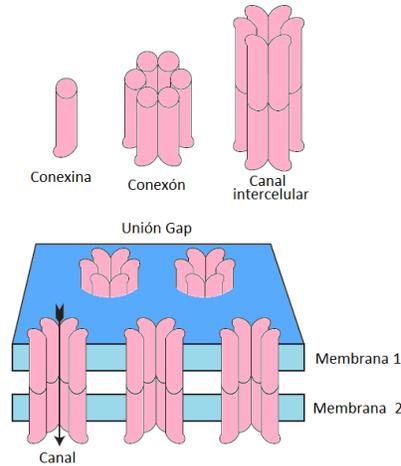


Figura 4. Esquema que muestra las uniones de tipo gap. Cada conexón está formado por seis subunidades de conexina. Modificado de (13).

Uniones estrechas

Las UE son uniones intercelulares que rodean a las células epiteliales y endoteliales en la parte más apical ⁽¹⁶⁾. Por microscopía electrónica de transmisión las UE se observan como una serie de contactos muy cercanos entre las membranas de células adyacentes, llamados “*kissing points*”, donde el espacio intercelular es completamente obliterado ^(5, 17) (Figura 5A). Por microscopía de crío-fractura, las UE se observan como una compleja red de filamentos que rodean a la célula, que se asocian lateralmente con los filamentos de las membranas de células adyacentes, y pueden ser extremadamente variables en número y complejidad, dependiendo del tipo celular ⁽³⁾ (Figura 5B).

Las uniones estrechas contribuyen a la formación de epitelios polarizados y barreras endoteliales ⁽¹⁸⁾. Dentro de una célula, las uniones estrechas actúan como una “cerca” que restringe la difusión de las proteínas de membrana entre las superficies apical y basolateral, manteniendo así la polaridad apical-basal de la célula. Entre las células adyacentes, las UE funcionan como una “compuerta” que regula el movimiento paracelular de iones y moléculas pequeñas entre las superficies apical y basolateral de la capa ⁽²⁾. Así mismo participan, junto con moléculas de señalización, en la regulación de la diferenciación y la proliferación celular ⁽¹⁹⁾. Las UE son estructuras dinámicas: son constantemente remodeladas y están reguladas por diversos estímulos fisiológicos y patológicos ⁽²⁰⁾.

Las UE están formadas por varios componentes entre los que se encuentran proteínas integrales de membrana como claudinas, ocludina, JAMs (*Junction Adhesion Molecules*) y tricelulina; proteínas de andamio que unen a las proteínas de membrana con el citoesqueleto de actina, como ZO-1, ZO-2 y ZO-3; y otras proteínas citosólicas con funciones de señalización y tráfico vesicular, y factores de transcripción, como ZONAB, ASIP, ZAK, entre otros ^(21, 22) (Figura 5C).

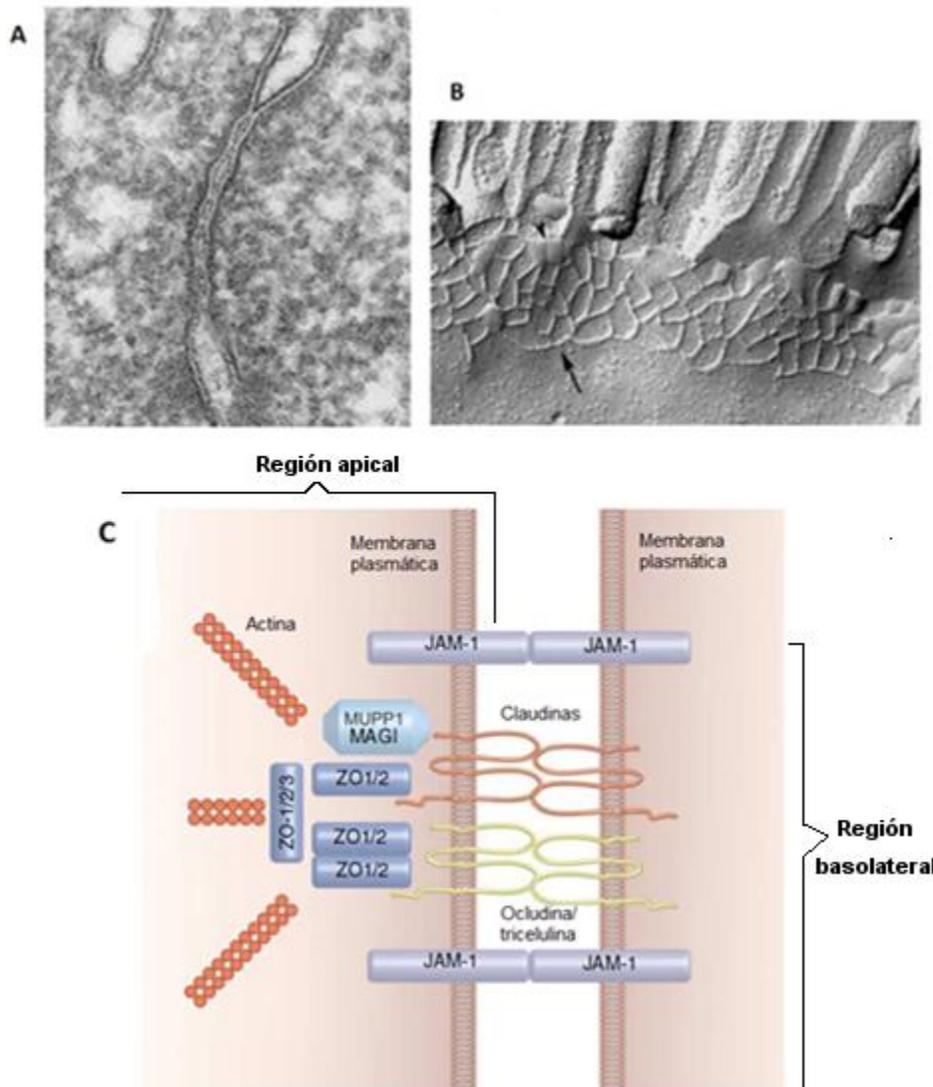


Figura 5. Estructura de las uniones estrechas. A) Micrografía electrónica de transmisión donde se observan los puntos de contacto entre las membranas en las UE. B) Micrografía electrónica de criofractura, se observan los filamentos de las uniones estrechas (flechas). C) Esquema de las proteínas que componen a las UE. Modificado de (7, 17)

Ocludina

La ocludina fue la primer proteína integral de membrana identificada en las UE ⁽²³⁾. Es una proteína de aproximadamente 65-kD que presenta cuatro dominios transmembranales, dos asas extracelulares de similar tamaño y tres dominios citoplasmáticos: un asa corta intracelular, un dominio amino-terminal corto y un dominio carboxilo terminal largo ⁽²⁴⁾. Ambas asas extracelulares están enriquecidas en residuos de tirosina, y en la primera asa más de la mitad de los residuos son tirosinas y glicinas (Figura 6). La ocludina interactúa a través del extremo carboxilo terminal con las proteínas de la familia MAGUK, ZO-1 ZO-2 y ZO-3 ⁽²⁵⁾.

Hay reportes contradictorios sobre la importancia de la ocludina en las UE. Varias líneas de evidencia sugieren que la ocludina tiene una participación importante en la función y la regulación de las UE, pero otros estudios muestran resultados opuestos ⁽²³⁾. La ocludina también ha sido relacionada con la regulación de varias vías de señalización, Sin embargo, los mecanismos moleculares subyacentes de muchos de estos procesos aun no se han determinado, y la relevancia funcional de muchas de sus interacciones bioquímicas se desconoce ⁽¹⁸⁾.

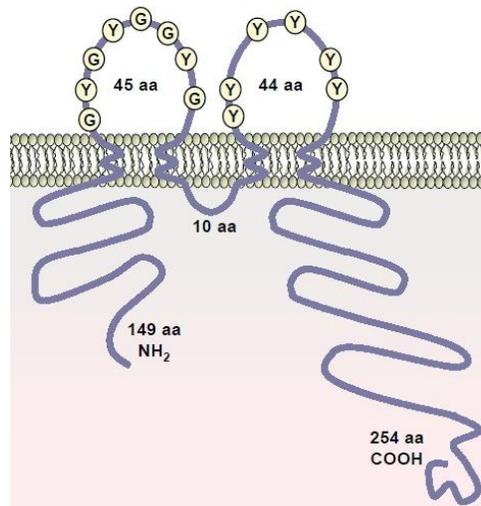


Figura 6. Esquema de la estructura de la ocludina. (25)

JAM

Las JAM (*Junction Adhesion Molecules*) son miembros de una familia de proteínas glicosiladas, de 30 a 45 kD, que median la adhesión celular independiente de Ca²⁺ ⁽¹⁶⁾. Poseen una región

extracelular de 215 aa que contiene 2 dominios de tipo inmunoglobulina (uno de tipo V y uno de tipo C₂), un único dominio transmembranal y una cola intracelular corta (45 aa) que presenta un motivo de unión a PDZ^(25, 26) (Figura 7). Las JAM se localizan en las uniones de células epiteliales y endoteliales polarizadas, más enriquecidas en las UE, pero también se expresan en leucocitos y plaquetas^(16, 27). La evidencia experimental sugiere que las moléculas de JAM en las células epiteliales podrían asociarse lateralmente formando dímeros, siendo estos los que se unen a las UE formadas por polímeros lineales de claudina y ocludina⁽²⁵⁾.

Se han sido identificados cuatro isotipos de JAMs: JAM-A, -B, -C y -4⁽¹⁸⁾. Se ha reportado la unión de células epiteliales y endoteliales adyacentes mediante interacciones homofílicas, y por otro lado, se ha observado que las interacciones heterofílicas con las integrinas de los leucocitos facilitan la extravasación de los mismos^(28, 29). Varias proteínas se asocian con las JAM, entre ellas ZO-1, cingulina, MUPP-1 y PAR-3, lo que sugiere que participan en la polaridad celular⁽²⁶⁾.

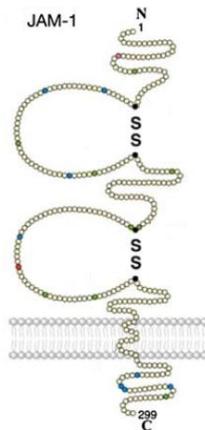


Figura 7. Esquema de la estructura de JAM-1. (27).

Tricelulina

En los puntos de contacto entre tres células epiteliales, los filamentos de las UE se extienden basolateralmente y las UE se orientan verticalmente⁽³⁰⁾. La tricelulina es una proteína transmembranal de las UE que se encuentra enriquecida en estas uniones tricelulares, aunque también puede encontrarse en las uniones entre dos células. La extensión de la distribución

bicelular de la tricelulina depende del tipo de célula epitelial^(17, 31). La tricelulina (~63kD), al igual que la ocludina, contiene cuatro dominios transmembranales, dos asas extracelulares, un asa intracelular pequeña y los dominios amino y carboxilo terminal localizados en el citoplasma. En el extremo carboxilo terminal, la tricelulina comparte una secuencia conservada con la ocludina, que media la unión a ZO-1^(32, 33) (Figura 8). Hasta el momento, se han descrito cuatro isoformas de tricelulina en humanos⁽³¹⁾.

Mutaciones de la tricelulina se han asociado con sordera no sindrómica. Además, en estudios *in vitro*, la supresión de la expresión de tricelulina por RNA de interferencia altera la función de barrera de las UE, lo que sugiere que la tricelulina es requerida para la formación de las uniones estrechas, sin embargo los mecanismos moleculares no se conocen del todo⁽³¹⁾.

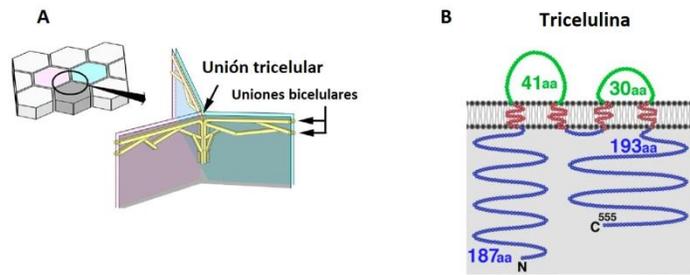


Figura 8. A) Representación esquemática de las uniones estrechas tricelulares. B) Esquema de la estructura de la tricelulina. Modificado de (32).

Claudinas

Las claudinas, objeto de estudio del presente trabajo, se consideran los componentes esenciales de las uniones estrechas y las principales determinantes del flujo paracelular de solutos a través de epitelios y endotelios⁽³⁴⁾. Las claudinas fueron identificadas en 1998 por Furuse y Tsukita⁽³⁵⁾. A la fecha se han encontrado un total de 24 genes que codifican para claudinas en mamíferos. Humanos y chimpancés tienen 23 de estos genes (carecen de CLDN13), mientras que los ratones y ratas tienen los 24⁽³⁾. Se han separado en dos subgrupos, las claudinas “clásicas” y las “no clásicas”, de acuerdo a análisis de la similitud de sus secuencias^(3, 34).

Las claudinas varían en tamaños de 20 a 27 KDa ⁽³⁶⁾. Su estructura predicha es de cuatro dominios transmembranales, dos asas extracelulares, una pequeña asa intracelular y los dominios amino y carboxilo terminales localizados en el citoplasma (Figura 10). La primer asa extracelular contiene aproximadamente 52 aminoácidos y muestra una considerable variación en la secuencia de aminoácidos ⁽²⁾. Esta asa contiene aminoácidos cargados, por lo que se piensa que crea un filtro con selectividad electrostática que controla la resistencia general y la selectividad de carga del flujo paracelular. La primer asa también contiene dos residuos de cisteína altamente conservados, que parecen mejorar la estabilidad de la proteína a través de un puente disulfuro intramolecular ^(37, 38). Se ha reportado que la primer asa extracelular de Claudina-1 funciona como un co-receptor para el anclaje del virus de la hepatitis C ⁽²⁾.

La segunda asa extracelular tiene de 16 a 33 aminoácidos de tamaño. Por su conformación hélice-giro-hélice, se ha sugerido que la segunda asa puede formar dímeros entre claudinas de membranas celulares adyacentes a través de interacciones hidrofóbicas de residuos aromáticos conservados. En algunas claudinas la segunda asa funciona como un receptor para la enterotoxina de *Clostridium perfringens* (CPE) ^(2, 3, 21).

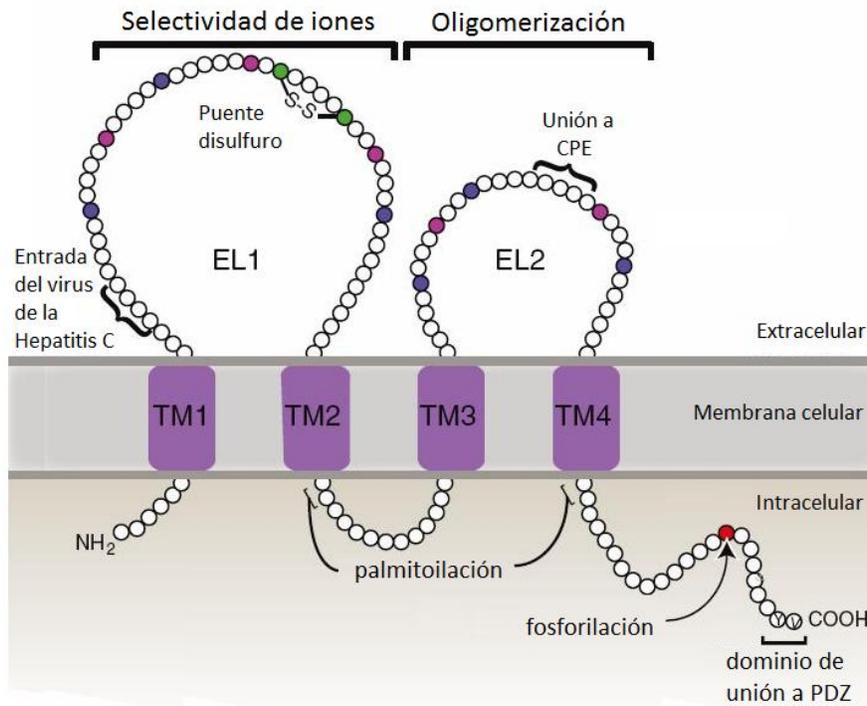


Figura 10. Esquema de la estructura de las claudinas. Modificado de (2)

La mayoría de las claudinas presentan un extremo amino terminal corto, de alrededor de 7 residuos de aminoácidos, un asa intracelular corta de 20 residuos, y un extremo carboxilo terminal. El tamaño del extremo carboxilo terminal es más variable en tamaño y secuencia ⁽²¹⁾. Típicamente tiene entre 21 y 63 residuos (aunque puede ser tan largo como 106 residuos en el caso de claudina-23). El extremo carboxilo terminal contiene un motivo de unión a PDZ, que es un dominio de interacción entre proteínas, y que permite a las claudinas interactuar directamente con proteínas citoplásmicas de andamiaje, como ZO -1, -2 y -3, MUPP-1, y PATJ, las cuales unen a las proteínas transmembranales con el citoesqueleto. Así mismo, el extremo carboxilo terminal es el blanco de varias modificaciones post-traduccionales, como la fosforilación de serina/treonina y tirosina, y la palmitoilación, que pueden alterar significativamente la localización, estabilidad y función de las claudinas ^(2, 3).

Las claudinas pueden interactuar entre ellas de dos formas: de manera lateral (interacción en *cis*) en la oligomerización de los filamentos en una membrana, así como las interacciones “cabeza a cabeza” a través de sus asas extracelulares (interacción en *trans*) entre filamentos de células adyacentes. Estas interacciones pueden ser homotípicas o heterotípicas, sin embargo, parece que las interacciones heterotípicas están limitadas a ciertas combinaciones de claudinas ^(34, 38).

La mayoría de los tipos celulares expresa varios tipos de claudinas y este patrón de expresión es tejido-específico ⁽³⁾. La combinación de varios tipos de claudinas y en diferentes proporciones es lo que determina las distintas propiedades de selectividad de carga del flujo paracelular y la resistencia transepitelial de cada tejido ⁽³⁶⁾. Se ha observado que algunos tipos de claudinas tienden a hacer más herméticas las UE mientras que otras tienen el efecto opuesto: claudina-1, 4, 5, 8, 11, 14, y 19 aumentan la resistencia transepitelial, usualmente disminuyendo la permeabilidad a cationes. Las claudinas 2, 10b y 15 disminuyen la resistencia al aumentar la permeabilidad a cationes. La Claudina-10a y posiblemente Claudina-7 son las únicas que hasta el momento se ha visto que aumentan la permeabilidad a aniones ^(21, 34).

Además de las modificaciones post-traduccionales, la expresión de claudinas puede ser modulada transcripcional y post-transcripcionalmente por varios factores de crecimiento y citocinas ⁽³⁾.

Se ha observado que la expresión de genes de claudinas se ve alterada en varios tipos de cáncer. Por ejemplo, claudina-1 se encuentra disminuida en cáncer de mama y de colon. Estos hallazgos son consistentes con el hecho ampliamente conocido de que las UE se disocian durante la tumorigénesis. Sin embargo, la expresión de claudina-3 y claudina-4 se ha encontrado aumentada en varios tipos de cáncer. La alteración de la expresión de claudinas podría tener un papel en la motilidad, la invasión y la supervivencia de las células cancerosas^(4, 39). Las claudinas no solo están confinadas a las uniones intercelulares, sino que a veces pueden ser encontradas en otras localizaciones subcelulares, como el citosol o el núcleo celular⁽²¹⁾. Toda esta evidencia sugiere que las claudinas participan en una gran variedad de funciones además de formar las barreras paracelulares⁽³⁸⁾.

ZOs

Las ZOs (*Zonula occludens*) son miembros de la familia de proteínas MAGUK (homólogos a la guanilato ciclasa asociados a membrana), las cuales son proteínas de andamiaje que crean y mantienen complejos multimoleculares^(17, 40). Las ZOs se caracterizan por la presencia de tres dominios PDZ, un dominio Homólogo a Src (SH3) y un dominio guanilato ciclasa (GUK). Los dominios PDZ son módulos de 80 a 90 aa que se unen a motivos específicos que se encuentran el extremo carboxilo de varias proteínas⁽²⁵⁾. Al presentar varios de estos dominios las ZOs unen a las proteínas de membrana de las UE con el citoesqueleto de actina y reclutan una gran variedad de componentes de señalización, así como proteínas de doble localización que pueden residir tanto en las uniones como en el núcleo, proporcionando un mecanismo por el cual las UE pueden regular la expresión génica (figura 9)^(18, 41).

ZO-1 es una proteína de 220 kDa. En las UE, ZO-1 está asociada a través de su primer dominio PDZ al extremo carboxilo terminal de las claudinas, con su segundo y tercer dominio PDZ se une a JAM, mediante su módulo GUK interactúa con la ocludina y se une al citoesqueleto de actina a través de su extremo carboxilo terminal. ZO-1 puede interactuar con ZO-2 o ZO-3 mediante el segundo dominio PDZ. ZO-1 interactúa a través de su dominio SH3, con un factor de transcripción llamado ZONAB, que se une a secuencias promotoras reguladoras del ciclo celular, lo que sugiere que ZO-1 juega un papel en la regulación de la diferenciación y crecimiento de las células epiteliales⁽²⁵⁾.

ZO-2 es una molécula de 160 kDa que interactúa con las claudinas a través de su primer módulo PDZ, y con la ocludina, cingulina y α -catenina a través de su región GUK. El dominio rico en prolina de ZO-2, localizado en el extremo carboxilo terminal de la proteína, se une a la actina⁽²⁵⁾.

ZO-3 es una proteína de 130 kD, se asocia a través de su primer motivo PDZ a las claudinas, y por medio de sus extremos carboxilo y amino terminal se une a la ocludina y la cingulina. En contraste con ZO-1 y ZO-2, la región amino terminal de ZO-3 es la que se asocia con la actina⁽²⁵⁾.

ZO-1 puede formar heterodímeros con ZO-2 y ZO-3, pero no se han detectado trímeros entre ZO-1, ZO-2 y ZO-3. Se ha visto que ZO-1 y ZO-2 son indispensables para la formación de UE en células epiteliales, además de que están involucradas en vías de transducción de señales y modulación transcripcional^(17, 40).

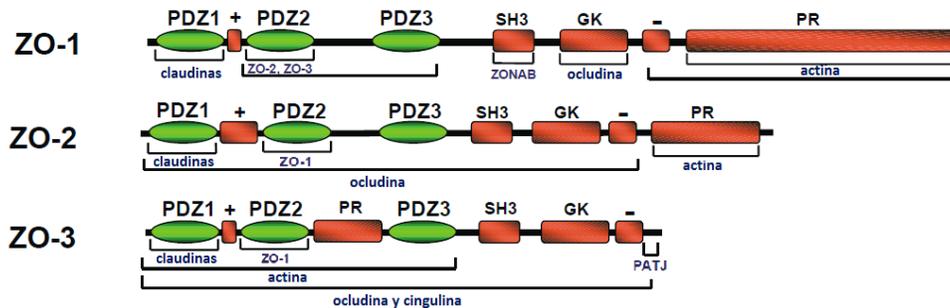


Figura 9. Esquema de la estructura de ZO-1, -2 y -3, mostrando los sitios de interacción con otras proteínas. Modificado de (25).

Citocinas

Las citocinas son polipéptidos de peso molecular bajo sintetizados principalmente por células del sistema inmune en respuesta a diversos estímulos, como microorganismos u otros antígenos^(42, 43). Actúan como mensajeros entre diferentes células y participan en procesos de la inmunidad innata y adaptativa, además de regular respuestas inflamatorias, recuperación de heridas, hematopoyesis y angiogénesis⁽⁴⁴⁾. Las citocinas regulan también diversos procesos fisiológicos del desarrollo y no inflamatorios⁽⁴⁵⁾.

La denominación de citocinas abarca a las proteínas secretadas por linfocitos (linfocinas), las liberadas por monocitos y macrófagos (monocinas), citocinas con actividades quimiotácticas (quimiocinas) y las que son secretadas por leucocitos y actúan sobre otros leucocitos (interleucinas), entre otras ^(46, 47).

La secreción de las citocinas es un fenómeno breve y autolimitado, es decir que su síntesis se inicia como consecuencia de la activación celular, es transitoria, y hay mecanismos de retroalimentación negativa para inhibir su síntesis ⁽⁴²⁾. Muchas citocinas son producidas en una forma inactiva y son cortadas por enzimas para adquirir su conformación activa, este procesamiento proteolítico es importante, por ejemplo, en la producción de las formas activas del factor de necrosis tumoral (TNF) y la Interleucina-1. Una vez sintetizadas, las citocinas se secretan rápidamente, lo que da lugar a un estallido de liberación cuando es necesario ^(42, 43).

Diferentes tipos celulares pueden secretar la misma citocina, y una misma citocina puede actuar en varios tipos celulares distintos (pleiotropía), esto permite que una citocina pueda generar múltiples respuestas biológicas dependiendo del tipo celular, tiempo de exposición y contexto ⁽⁴³⁾. Así mismo, las citocinas son redundantes en su actividad, ya que funciones similares pueden ser estimuladas por diferentes citocinas. Debido a esta redundancia, los antagonistas contra una citocina pueden no tener consecuencias funcionales, porque otras citocinas pueden compensarlas ⁽⁴⁶⁾.

Las citocinas influyen con frecuencia en la síntesis y las acciones de otras citocinas. La capacidad de una citocina de estimular la síntesis de otras, da lugar a cascadas en las que una segunda o tercer citocina puede mediar los efectos biológicos de la primera. Dos citocinas pueden antagonizar mutuamente sus acciones, producir efectos aditivos, o efectos sinérgicos ⁽⁴²⁾.

Las acciones de las citocinas pueden ser locales o sistémicas. La mayoría de las citocinas actúa cerca de su lugar de producción, ya sea en la misma célula que las secreta (acción autócrina) o en células cercanas (acción parácrina) ⁽⁴⁶⁾. Cuando se producen en cantidades grandes, las citocinas pueden entrar en la circulación y actuar a distancia de su punto de producción (acción endócrina). El TNF es un ejemplo de una citocina que tiene efectos locales y sistémicos importantes ⁽⁴²⁾.

Las citocinas median sus efectos biológicos al unirse a receptores de membrana específicos en la célula diana, y debido a que se unen con afinidades muy altas, solo son necesarias pequeñas cantidades de una citocina (concentraciones picomolares a nanomolares) para activar a los

receptores específicos y modular sus acciones biológicas^(42, 43). La susceptibilidad de las células diana a una citocina en particular depende de la presencia de los receptores específicos. Muchos tipos celulares expresan estos receptores y son susceptibles al efecto de las citocinas⁽⁴⁷⁾. Las señales externas, incluyendo las mismas citocinas, pueden regular la expresión de los receptores, lo que permite la amplificación positiva y la retroalimentación negativa⁽⁴²⁾. Varias proteínas inhiben la actividad biológica de las citocinas, ya sea uniéndose directamente al receptor de la citocina, pero sin activar a la célula, o uniéndose a la citocina, suprimiendo su actividad⁽⁴⁷⁾.

Al unirse las citocinas a los receptores de membrana, inician vías de transducción de señales especializadas (como las vías de Jak-STAT, TIR/IRAK y TRAF), que generalmente culminan con la activación de factores de transcripción, produciendo cambios en la expresión génica de las células diana⁽⁴⁷⁾.

Las citocinas se pueden clasificar en mediadores y reguladores de la inmunidad innata (como TNF, IL-1 e IFN-gamma), mediadores y reguladores de la inmunidad adaptativa (como IL-2, IL-4, IL-5 e IFN-gamma), y estimuladores de la hematopoyesis⁽⁴²⁾. Las citocinas pueden también clasificarse en proinflamatorias (que promueven la inflamación, como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, IFN- β e IFN- γ) y anti-inflamatorias (que atenúan o suprimen la actividad de las citocinas proinflamatorias, como IL-4, IL-10, IL-13 e IFN- α)^(43, 48).

In vivo, las citocinas rara vez actúan solas. Por el contrario, las células diana se exponen a un medio que contiene una mezcla de citocinas y sus efectos sinérgicos o antagónicos combinados pueden tener consecuencias muy diferentes⁽⁴⁷⁾. La respuesta inflamatoria neta está determinada por el balance entre las citocinas pro y anti-inflamatorias, el tiempo de exposición, el ambiente, la presencia de factores sinérgicos o antagónicos, la densidad de los receptores de citocinas, y la sensibilidad del tejido a cada citocina⁽⁴³⁾.

Varios padecimientos se han asociado con defectos en la regulación de la expresión de citocinas o sus receptores, y también con el desbalance entre citocinas pro y anti-inflamatorias⁽⁴⁷⁾.

Las citocinas tienen un importante efecto fisiológico y patológico en las uniones estrechas, influenciando la permeabilidad paracelular de células epiteliales y endoteliales⁽⁴⁹⁾. Se ha reportado que la exposición a citocinas proinflamatorias reduce la integridad de la barrera epitelial y puede

inducir la endocitosis de algunas proteínas de UE ⁽⁵⁰⁾. Estos cambios contribuyen a una gran cantidad de condiciones patológicas, ya que el aumento de la permeabilidad paracelular genera un incremento en la exposición de los tejidos a antígenos luminales ^(45, 51).

Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α)

El TNF- α es una citocina proinflamatoria y es el principal mediador de la respuesta inflamatoria aguda frente a bacterias gram negativas y otros microorganismos infecciosos. El principal origen celular del TNF- α son los macrófagos y monocitos, aunque los linfocitos T activados, neutrófilos y fibroblastos también pueden secretar esta proteína ^(42, 47). El TNF- α se sintetiza en forma de una proteína de membrana de 26 kD (pro-TNF), que se escinde por una metaloproteinasa, liberando un polipéptido de 17 kD. Tres de esas cadenas polimerizan para formar la proteína del TNF- α circulante de 51 kD ^(42, 49).

El TNF actúa en varias vías de señalización distintas a través de dos receptores de membrana distintos (TNFR1 y TNFR2), ambos presentes en la mayoría de los tipos celulares ⁽⁴⁶⁾. La principal función del TNF- α es estimular la atracción de neutrófilos y monocitos hacia focos de infección y activar a estas células para que erradiquen a los microorganismos ⁽⁴²⁾. El TNF- α induce a las células endoteliales vasculares a que expresen moléculas de adhesión para los leucocitos, e induce la secreción de IL-1 por los macrófagos ⁽⁴⁸⁾. En las infecciones graves, el TNF se sintetiza en grandes cantidades y entra en el torrente sanguíneo, lo que puede producir alteraciones clínicas, y es responsable de muchas de las complicaciones sistémicas de las infecciones graves ⁽⁴²⁾. EL TNF- α es citotóxico para muchos tipos de células transformadas ⁽⁴⁷⁾.

Esta citocina ha sido implicada en la patogénesis de varias enfermedades inflamatorias, como la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (IBD), o la artritis reumatoide. Se ha observado que afecta la función de barrera en varias líneas epiteliales y endoteliales *in vitro*. Hay reportes conflictivos sobre los efectos en diferentes líneas celulares, que pueden deberse a la variación del tipo celular y diferencias en las dosis y tiempos de tratamientos (45, 52).

Interleucina 1-beta (IL-1 β)

Las interleucinas son una gran familia de citocinas. La familia de la IL-1 consta de tres miembros: IL-1 α , IL-1 β e IL-1ra (IL-1 receptor antagonist). La IL-1 α permanece unida a la membrana celular,

mientras que la IL-1 β es secretada al torrente sanguíneo durante los procesos inflamatorios. IL-1ra es un antagonista específico de IL-1, ya que se une al receptor de IL-1 impidiendo la unión de las formas activas (IL-1 α e IL-1 β)⁽⁵³⁾.

La interleucina 1 β es una citocina proinflamatoria cuya principal función, similar a la del TNF, es actuar como mediador de la respuesta inmunitaria innata del huésped frente a infecciones, inflamación y otros estímulos⁽⁴²⁾. La IL-1 β es producida principalmente por los monocitos y macrófagos, aunque también es sintetizada por otros tipos celulares, como neutrófilos, células endoteliales y algunas células epiteliales^(42, 46). Se sintetiza en forma de un precursor de 33 kD, que es escindido mediante proteólisis por la proteasa caspasa-1 (también denominada enzima de conversión de la IL-1 β) para generar la proteína secretada, biológicamente activa, de 17 kD⁽⁴²⁾.

La IL-1 β media sus efectos al unirse a un receptor de membrana denominado IL-1R1, que participa en vías de transducción de señales que activan los factores de transcripción NF- κ B y AP-1. La IL-1 β presenta una gran variedad de actividades biológicas en muchos tipos celulares^(42, 47). Sus efectos dependen además de la cantidad de citocina sintetizada: cuando se secreta en concentraciones bajas actúa como mediador de la inflamación local, sobre las células endoteliales, para aumentar la expresión de moléculas de superficie que median la adhesión de leucocitos. Cuando se secreta en cantidades mayores, entra en el torrente sanguíneo y ejerce efectos endócrinos, induciendo síntesis de proteínas plasmáticas de fase aguda por el hígado y producción de neutrófilos y plaquetas por la médula ósea⁽⁴²⁾.

Se han relacionado alteraciones en los niveles de IL-1 β con algunas enfermedades inflamatorias. Por ejemplo, se ha reportado una elevada concentración de IL-1 β en la mucosa intestinal de pacientes con IBD. Se ha observado que su adición en cultivos epiteliales y endoteliales *in vitro* aumenta la permeabilidad paracelular a iones y moléculas pequeñas. Así mismo, se ha encontrado que muchas interleucinas actúan como moduladores de las uniones estrechas, modificando los niveles de las proteínas que las componen⁽⁴⁵⁾.

Interferón gamma (INF- γ)

Es una citocina pro-inflamatoria y es la principal activadora de macrófagos. Tiene funciones fundamentales en la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa frente a los microorganismos intracelulares. El INF- γ es secretado por las células Natural Killer (NK) como mediador de la

inmunidad innata, y por los linfocitos T como mediador de la inmunidad adaptativa. Es un homodímero de 50 kD (glicosilado), de subunidades de 20 a 24kD ⁽⁴²⁾.

El receptor del INF- γ está formado por dos polipéptidos, INF- γ R1 e INF- γ R2. Al unirse a su receptor, el INF- γ activa las vías de JaK/STAT ⁽⁴²⁾. El INF- γ influye en la activación, proliferación y diferenciación de linfocitos T, B, macrófagos y NK ⁽⁴⁷⁾.

El INF- γ ha sido implicado en la patogénesis de múltiples condiciones inflamatorias crónicas ⁽⁵⁴⁾. Además de su rol inmunomodulatorio durante la inflamación, también modifica la función de barrera epitelial y endotelial. Se ha observado *in vitro* que el tratamiento con esta citocina aumenta la permeabilidad paracelular en células epiteliales y endoteliales, sin embargo, en células de epitelio aéreo el IFN- γ tiene propiedades anti-inflamatorias y promueve la función de barrera epitelial ⁽⁴⁵⁾.

ANTECEDENTES

Inflamación

La inflamación es una respuesta fisiológica compleja del sistema inmune para proteger al organismo ante lesiones, patógenos y otros estímulos dañinos. La reacción inflamatoria aguda combate las primeras fases de una infección y pone en marcha procesos que llevan a la reparación del tejido dañado ⁽⁴²⁾.

La respuesta inicial del cuerpo al estímulo nocivo es incrementar la migración de leucocitos y el paso del plasma a las áreas lesionadas a través de los endotelios y epitelios, efecto mediado por quimiocinas y citocinas proinflamatorias. La migración ocurre principalmente por la vía paracelular, por lo que debe ocurrir una apertura y resellado de las uniones intercelulares. Se ha observado que las uniones adherentes parecen desorganizarse durante la transmigración de los leucocitos, mediante una deslocalización de la E-cadherina de la membrana celular y todo el complejo de uniones se restablece después de la migración del leucocito; en cuanto a las UE, se ha observado deslocalización de ZO-1 y ocludina durante la migración leucocitaria ^(42, 49, 50).

La inflamación es normalmente un proceso reparador, seguido por una respuesta compensatoria anti-inflamatoria. En ocasiones, por falta de mecanismos compensatorios, esta reacción inflamatoria puede resultar exagerada, o mantenerse por periodos prolongados, volviéndose una inflamación crónica, y dando lugar a cambios patológicos ^(42, 51).

TNF - α

Utilizando modelos *in vitro* se ha observado que el TNF- α afecta la función de barrera de las UE en varias líneas celulares epiteliales y endoteliales ⁽⁴⁵⁾. A pesar de que el TNF- α puede inducir apoptosis, en varios estudios se ha observado que media sus efectos sobre la permeabilidad paracelular por mecanismos independientes de la apoptosis.

En las líneas celulares endoteliales BPAEC (células de arteria pulmonar bovina) y MVEC (células endoteliales microvasculares), el tratamiento con TNF- α produce un aumento del flujo paracelular, asociado, en ambos casos, con reestructuración de los filamentos de actina ^(55, 56). En la línea epitelial Caco-2 (células de adenocarcinoma de colon humano), el TNF- α aumenta el flujo

paracelular a pequeñas moléculas y provoca una disminución de la TER (lo que indica que hay mayor flujo paracelular de iones), así como una disminución en los niveles de ZO-1^(57, 58). En otros estudios, también con células Caco-2, se observó que el tratamiento con TNF- α induce una disminución de los niveles de ocludina y su deslocalización de la membrana celular^(59, 60).

En las líneas celulares IEC-18 (intestino de rata) y PANC-1 (derivada de cáncer de pancreático humano), el tratamiento con TNF- α induce un aumento en la permeabilidad, así como aumento en la expresión de claudina-1^(61, 62), por el contrario en células MDCK (línea celular de epitelio de riñón canino), el TNF- α induce disminución de la expresión de claudina-1⁽⁶³⁾. En la línea celular de colon humano HT-29/B6, al tratar las células con TNF- α se observó una deslocalización de claudina-1 y un aumento en la expresión de claudina-2⁽⁶⁴⁾. En la línea de células endoteliales de retina de bovino (BREC), el tratamiento con TNF- α origina un aumento de la permeabilidad y una disminución de los niveles de RNAm y proteína de ZO-1⁽⁶⁵⁾. En células HUVEC (células endoteliales humanas de la vena umbilical) se observa disminución de los niveles de ocludina y deslocalización de JAM al ser tratadas con TNF- α ⁽⁶⁶⁾. En la línea UEC (células del epitelio uterino de ratón), por el contrario, el TNF- α produce una disminución de la permeabilidad, y un aumento de la TER⁽⁶⁷⁾.

En la línea celular LLC-PK₁ (de epitelio de riñón porcino, línea celular utilizada en este estudio), se ha observado que después de dar un estímulo con TNF- α , se produce una disminución de la TER en las primeras 2 horas y regresa al nivel del control antes de las 12 horas⁽⁶⁸⁾. En otro estudio de este mismo grupo de trabajo, se observó que el TNF- α induce un aumento de la TER a las 24, 48 y 72 horas después del estímulo (lo que indica una disminución del flujo paracelular a iones), y la TER comienza a disminuir a partir de las 96 horas⁽⁶⁹⁾.

También se ha observado en modelos *in vivo* que el TNF- α disminuye la expresión de ZO-1⁽⁷⁰⁾ y produce endocitosis de la ocludina⁽⁷¹⁾.

IL-1 β

En varios sistemas de cultivo *in vitro* se ha observado que la adición de IL-1 β afecta la permeabilidad paracelular y provoca un aumento o una disminución en algunas proteínas de uniones estrechas⁽⁴⁵⁾: En la línea celular HCE (epitelio de cornea humana), la adición de IL-1 β induce una disminución en la TER y una deslocalización de las proteínas ocludina y ZO-1⁽⁷²⁾. Se ha

observado en estudios tanto con células Caco-2 como con astrocitos en cultivo, que el tratamiento con IL-1 β disminuye los niveles de ocludina y aumenta los de Claudina-1^(53, 73). En la línea celular HaCaT (queratinocitos humanos), la adición de IL-1 β tiene poco efecto en la resistencia transepitelial, pero incrementa la expresión de claudina-1⁽⁷⁴⁾. Al cultivar las células ARPE-19 (de epitelio pigmentario de retina) con IL-1 β se observa una disminución de la TER, un aumento de la permeabilidad paracelular, así como una disminución en los niveles de RNAm de ocludina y un incremento del RNAm de claudina-1⁽⁷⁵⁾. En células de epitelio gástrico humano HGE-20, la IL-1 β induce una disminución en la expresión de claudina-4⁽⁷⁶⁾.

Por el contrario, en un cultivo primario de queratinocitos humanos, el tratamiento con IL-1 β indujo un incremento en la TER hasta las 48 horas posteriores al tratamiento, y posteriormente la TER tiende a disminuir. Al inyectar IL-1 β en modelos de piel *ex vivo*, se observa un aumento de ocludina y ZO-1⁽⁷⁷⁾.

INF- γ

En varios modelos de cultivo celular, el tratamiento con IFN- γ incrementa la permeabilidad paracelular. Sin embargo, se ha visto que en algunos tipos celulares, como las células del epitelio aéreo, el IFN- γ tiene propiedades antiinflamatorias y promueve la función de barrera⁽⁴⁵⁾.

En células MVEC y T84, se ha observado que el tratamiento con IFN- γ induce reestructuración de los filamentos de actina y disminuye los niveles de ZO-1^(56, 78). En otro trabajo con células T84 se observó que el tratamiento con IFN- γ produce internalización por macropinocitosis de las proteínas transmembranales JAM-A, ocludina y claudina-1^(79, 80). Por otro lado, con esta misma línea epitelial, se observó que el tratamiento con INF- γ induce un aumento significativo en la expresión de claudina-1 y una disminución en la expresión de ocludina y claudina-2^(81, 82). En células HUVEC, el IFN- γ induce una disminución de los niveles de ocludina y E-cadherina^(83, 84) y en cultivos primarios de tirocitos humanos, el tratamiento con IFN- γ disminuye la TER y la expresión de claudina-1⁽⁸⁵⁾.

Por el contrario, en la línea Calu-3, (células epiteliales de pulmón humano), el IFN- γ aumenta la TER y disminuye la permeabilidad paracelular, sin embargo, aunque promueve la función de

barrera, el IFN- γ induce una disminución en la expresión de ZO-1 y ocludina a niveles prácticamente indetectables comparado con los controles ⁽⁸⁶⁾.

Citocinas en conjunto

Los epitelios *in situ* no se encuentran expuestos a una sola citocina, sino a un conjunto de ellas, por lo tanto, se han hecho experimentos combinando dos o más citocinas para observar el efecto conjunto que producen sobre las células epiteliales.

En células HUVEC, se ha observado que el tratamiento combinado de TNF- α e IFN- γ causa una redistribución de la proteína JAM ⁽⁶⁶⁾. En cultivos primarios de células epiteliales humanas de vías respiratorias, el tratamiento con TNF- α e IFN- γ disminuye la TER e induce una disminución en los niveles de ZO-1 y JAM, así como su deslocalización ⁽⁸⁷⁾. En la línea celular HT-29/B6, la exposición a TNF- α e IFN- γ disminuye los niveles de RNAm de ocludina ⁽⁸⁸⁾. Con la línea Caco-2, se ha observado que el TNF- α junto con IFN- γ inducen una disminución de la TER y una deslocalización de la membrana de la proteína ocludina ⁽⁶⁰⁾. La exposición crónica de células Par-C10 (de glándula parótida de rata) a TNF- α e IFN- γ , genera un aumento en la permeabilidad paracelular, disminución de la TER, alteraciones en la morfología de las UE y disminución de la expresión de claudina-1 ⁽⁸⁹⁾.

En las células MDCK en cambio, el tratamiento con TNF- α /IFN- γ , aunque también eleva la permeabilidad paracelular, genera un incremento en la TER, al contrario de lo visto en otras líneas celulares. En este mismo estudio se observó que el tratamiento con dichas citocinas aumenta la expresión y genera deslocalización de ocludina y claudina-1 ⁽⁹⁰⁾.

Se han hecho algunos experimentos utilizando una mezcla de citocinas, denominada “citomix”, que contiene TNF- α , IL-1 β e IFN- γ . En células Caco-2 se observó que el tratamiento con citomix disminuye la función de barrera epitelial, disminuye en un 50% la expresión de ocludina y de ZO-1, aumenta la expresión de claudina-1 y causa deslocalización de dichas proteínas ⁽⁹¹⁻⁹³⁾.

JUSTIFICACIÓN

A pesar de que la inflamación es un componente esencial de la respuesta inmune a patógenos y otros agentes nocivos para el organismo, la producción desbalanceada de citocinas pro- y anti-inflamatorias y la inflamación crónica, pueden dar lugar a varias patologías y promover la progresión tumoral. Ya que durante la progresión tumoral en epitelios y endotelios se pierden las uniones celulares y la función de barrera, es importante el estudio y comprensión de los mecanismos a través de los cuales un ambiente pro-inflamatorio altera las uniones.

Aunque se han hecho varios estudios del efecto de las citocinas en otras proteínas de uniones estrechas, el efecto sobre la familia de las claudinas ha sido menos estudiado, y en la mayoría de los trabajos sólo se analiza a la claudina-1. Debido a que las claudinas juegan un papel central en la función de barrera de las UE, el presente trabajo estudia el efecto de tres citocinas sobre varias proteínas de esta familia.

HIPÓTESIS

Se espera que el tratamiento con las citocinas TNF- α , IL-1 β e IFN- γ provoque una alteración en la resistencia eléctrica transepitelial de las células epiteliales LLC-PK₁, que correlacione con cambios en la expresión y localización de diferentes claudinas.

OBJETIVOS

General:

El objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto, tanto individual como en conjunto, de las citocinas pro-inflamatorias TNF- α , IL-1 β e IFN- γ en la resistencia eléctrica transepitelial y en la expresión de claudinas en la línea celular LLC-PK₁

Particulares:

- Observar el efecto de diferentes concentraciones de citocinas en la TER de las células.
- Comparar el efecto de la aplicación apical o basolateral de las citocinas en la TER.
- Examinar el efecto que producen las citocinas en la TER a diferentes tiempos de tratamiento
- Analizar el efecto de la exposición a citocinas en la expresión y localización subcelular de las proteínas de uniones estrechas claudina-1 a -5

METODOLOGÍA

LINEA CELULAR

Características de la línea

Se trabajó con células LLC-PK₁, una línea celular epitelial derivada de riñón porcino (obtenida de la ATCC). Se eligió esta línea porque es ampliamente utilizada como modelo de cultivo celular epitelial, ya que forma una barrera epitelial eficiente y bien caracterizada^(69, 94). Estas células en cultivo establecen monocapas con una polaridad bien definida⁽⁹⁴⁾. Cuando las células LLC-PK₁ son cultivadas en plástico o vidrio, a diferencia de cuando son cultivadas en un filtro o membrana permeable, la monocapa confluyente se caracteriza por la aparición de domos llenos de fluido, los cuales son el resultado del transporte unidireccional de solutos y agua del medio de cultivo (compartimento apical) al espacio entre la capa de células y la caja de cultivo (compartimento basolateral)⁽⁶⁸⁾.

Medio de cultivo

Las células fueron cultivadas en el medio α -Minimum Essential Medium (α -MEM, de GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1mmol/L de L-glutamina y 1% de solución penicilina-estreptomicina a 37°C, en un ambiente húmedo con 5% de CO₂.

Mantenimiento de la línea

A. Descongelamiento.

Se descongeló un criovial almacenado a -70°C con células LLC- PK₁ y su contenido fue colocado en un tubo cónico de 15 ml, al cual se le adicionó 3ml de medio de cultivo. Posteriormente se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min, se eliminó el medio y se resuspendió gentilmente el botón celular con 1 ml de medio de cultivo. Por último, se colocó la suspensión celular en una caja de petri (p-100) a la cual se le añadieron 7ml de medio fresco. Al día siguiente se reemplazó el medio de cultivo para eliminar las células que no se adhirieron a la caja.

B. Propagación

Se monitorearon los cultivos hasta que las células alcanzaron un 90% de confluencia, momento en el cual se propagó la línea celular de la siguiente manera:

Se retiró el medio de cultivo de las cajas y se realizaron dos lavados con 5 ml de *Phosphate Buffered Saline* (PBS). Posteriormente se retiró el PBS y se añadió 1ml de Tripsina-EDTA 1X, incubándose durante 3 min para desprender las células de la caja. Se inactivó la tripsina con 5 ml de medio de cultivo, se resuspendió y se colocó la suspensión en un tubo cónico. Se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min, se descartó el medio y el botón celular se resuspendió en 1ml de medio fresco. Se tomó una alícuota para contar el número de células en la cámara de Neubauer. Se colocaron aproximadamente 7×10^5 células por caja a sembrar, y se añadieron 7ml de medio a cada caja p-100. Se cambió el medio al día siguiente para retirar las células no adheridas.

C. Preservación celular

El proceso de congelamiento tiene diversas finalidades, entre las que puede mencionarse preservar a las líneas celulares, evitar la senescencia de las mismas, o evitar la pérdida accidental de la línea por contaminación. Para ello se congelaron reservas de células en crioviales usando glicerol como agente crioprotector. Cuando las células alcanzaron un 90% de confluencia, se retiró el medio de cultivo, se hicieron dos lavados con 5ml de PBS y posteriormente se desprendieron las células incubando por 3 min con 1ml de Tripsina-EDTA 1X. Se inactivo la tripsina con 5 ml de medio de cultivo, se resuspendió y se colocó la suspensión en un tubo cónico. Se centrifugó a 1500 rpm por 5 min y se eliminó el medio. Cada botón se resuspendió en medio de cultivo con glicerol al 10% y se colocó 1×10^6 células/criovial en hielo. Las células se almacenaron a -70°C .

D. Cultivo para evaluar la resistencia eléctrica transepitelial

Para el análisis de la TER, las células se sembraron en insertos transwell de 24mm de diámetro que poseen una membrana de $0.4\mu\text{m}$ (Corning) los cuales se colocaron en placas de seis pozos. Estos insertos permiten establecer un medio apical (medio de cultivo sobre el inserto) y uno basolateral (medio en el pozo), separados por la monocapa celular (Figura 10).

Se sembraron 7×10^5 células por inserto, a densidad de confluencia, y se dejaron 4 días antes de medir la resistencia inicial y comenzar los tratamientos, esto con el fin de permitir que la

resistencia transepitelial se estabilizara. Al quinto día se lavaron las células dos veces con PBS, retirando primero el líquido de la parte basal y luego el de la apical, y colocándolo primero en la parte apical y luego en la basal, para evitar que la presión en el compartimento basolateral pudiera desprender a las células de la membrana permeable sobre la que crece la monocapa celular. Posteriormente se añadió medio fresco en ambos compartimentos y se regresaron las placas a la incubadora por una hora antes de tomar la primer medida de resistencia eléctrica transepitelial (T_0).

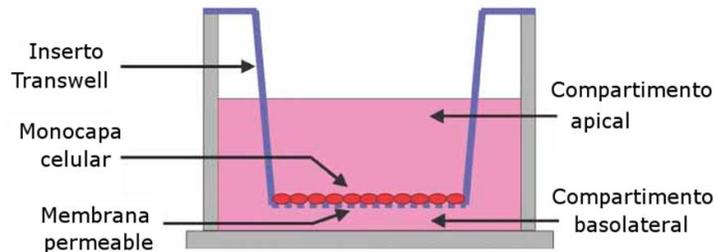


Figura 10. Representación esquemática de un inserto transwell en el que se muestra la separación de los compartimentos apical y basolateral por una membrana permeable sobre la que crece la monocapa celular. Modificado de (95).

TRATAMIENTOS CON CITOCINAS

Para los tratamientos se utilizaron las citocinas recombinantes humanas *libres de acarreador* TNF- α , IL-1 β e IFN- γ (BioLegend). Las citocinas liofilizadas fueron resuspendidas en PBS estéril. Posteriormente a la primera medición de resistencia eléctrica transepitelial (T_0) se añadieron las citocinas en el compartimento apical o basolateral, según el tratamiento.

- Tratamiento 1: Se añadieron 5, 10 o 20ng/ml de TNF- α , IL-1 β o IFN- γ en la parte basolateral de los insertos, para observar el efecto de la concentración de las citocinas y establecer las concentraciones adecuadas para los tratamientos posteriores. Cada concentración se probó por triplicado, y se hizo un tratamiento para cada una de las tres citocinas.

- Tratamiento 2: Se añadieron 10ng/ml de TNF- α , IL-1 β o INF- γ en la parte apical o en la parte basolateral, para observar si existen diferencias entre la aplicación basolateral y apical de las citocinas. Cada citocina se probó por triplicado.
- Tratamiento 3: Se añadieron 10ng/ml de TNF- α , IL-1 β o INF- γ en la parte basolateral para observar el efecto de las citocinas a diferentes tiempos. Cada citocina se probó en cinco pozos.
- Tratamiento 4: Se añadieron al mismo tiempo 10ng/ml de cada una de las tres citocinas en el compartimento basolateral, para observar el efecto conjunto de las citocinas. Se probó la combinación en cinco pozos.

MEDICIÓN DE LA RESISTENCIA TRANSEPITELIAL

Para evaluar la integridad de las uniones estrechas se midió la resistencia eléctrica transepitelial (TER) de las monocapas celulares, pues es un método conveniente, confiable y que no altera la integridad de la monocapa celular.

Para ello se utilizó un voltímetro epitelial EVOM (*World Precision Instruments*), que tiene un par de electrodos de plata para el paso de la corriente y otro par de electrodos de plata/cloruro de plata para la medición del voltaje.

Se coloca un electrodo en el inserto (medio apical) y otro en el pozo (medio basal). El voltímetro hace pasar una corriente eléctrica de 10 μ A y mide el voltaje que fue requerido. Esto se envía al procesador del aparato, el cual mediante la ley de Ohm ($I=V/R$), calcula la resistencia en ohms y la muestra en la pantalla.

Aproximadamente cuatro días después de haber sembrado las células se ha establecido firmemente la monocapa y la TER se ha estabilizado, así que se cambió el medio de cultivo y se tomó la medición inicial (T_0). Posteriormente se añadieron las citocinas en la parte basal o apical de los insertos y se realizaron mediciones de la TER a las 24, 48 y 72hrs. Para cada tiempo de tratamiento se realizaron cuatro lecturas por pozo y se calculó el promedio.

Se graficaron las medidas como porcentaje con respecto al control (células sin tratamiento con citocinas) utilizando el paquete de software *Sigma Plot* para la obtención de los gráficos.

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS POR FRACCIONES SUBCELULARES

Con el fin de observar los efectos de las citocinas en las proteínas de uniones estrechas, se procedió a hacer una extracción de proteínas por fracciones subcelulares, que permite obtener y separar las proteínas citosólicas (solubles en agua), las de membrana (solubles en Tritón X-100) y de citoesqueleto (insolubles en Tritón X-100).

Inmediatamente al terminar los periodos de los tratamientos y tomadas las lecturas de la resistencia transepitelial, las células fueron lavadas dos veces con PBS frío y congeladas a -70°C hasta su utilización.

Para la extracción de proteínas, las cajas con los cultivos celulares fueron descongeladas y se adicionó a cada inserto 0.5ml de Buffer A con inhibidores de proteasas y fosfatasa (Ver anexos). Se rasparon manualmente los insertos y las suspensiones celulares se colocaron en tubos de polipropileno etiquetados adecuadamente. Se trabajó utilizando hielo en los distintos procesos.

Para la obtención de las fracciones subcelulares, las suspensiones celulares se lisaron por sonicación durante un minuto a 25% de amplitud. Posteriormente, las muestras fueron ultracentrifugadas a 39000 rpm, durante 30 minutos a 4°C , utilizando el rotor 70Ti. Se recuperó el sobrenadante o fracción citosólica en un tubo nuevo y se colocó sobre hielo. El botón celular se resuspendió con 150 μl de Buffer A que contenía Tritón X-100 al 1% más los inhibidores de proteasas y fosfatasa, se incubó a 4°C por 1 hora y en agitación moderada. Posteriormente se ultracentrifugó bajo las condiciones anteriores y el sobrenadante obtenido o fracción membranal fue colocado en tubos nuevos y sobre hielo, mientras que el botón celular se resuspendió en 150 μl de Buffer de lisis con inhibidores de fosfatasa y proteasas, y fue incubado en agitación moderada durante 1h a 4°C . Se realizó una tercer ultracentrifugación en las mismas condiciones anteriores, y el sobrenadante obtenido, la fracción del citoesqueleto, fue colocado en tubos eppendorf sobre hielo.

Para la cuantificación de proteínas se utilizaron 25 μ l de la fracción citosólica y 10 μ l de las fracciones de membrana y citoesqueleto. A los sobrenadantes restantes se les añadió Buffer de Laemli 3X en proporción 2:1. Las muestras fueron congeladas a -20°C hasta su utilización.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La concentración de proteína se determinó con el kit de ensayo de proteínas, modificado del método de Bradford (Bio-Rad). Este método se basa en la adición de azul de Coomassie a una solución de proteínas. Este colorante se une principalmente a residuos aromáticos, especialmente arginina, y al hacerlo, la absorbancia máxima del azul de Coomassie G-250 cambia de 465nm a 595nm.

Para la cuantificación de proteínas, las fracciones celulares obtenidas fueron diluidas con agua bidestilada. La fracción de citosol fue diluida 1:20 (para los 25 μ L de muestra se añadieron 475 μ l de ddH₂O) y las fracciones de membrana y citoesqueleto se diluyeron 1:50 (10 μ L de muestra en 490 μ l de ddH₂O). Para poder llevar a cabo la cuantificación de proteína, se elaboró una curva patrón de albúmina de suero bovino realizando varias diluciones a partir de una solución stock que se encontraba a una concentración de 1mg/ml:

Volumen de Albúmina a 1mg/ml (μ l)	Volumen de ddH ₂ O (μ l)	Concentración final (μ g/ml)
0	1000	0
10	990	10
20	980	20
30	970	30
40	960	40
50	950	50
60	940	60
70	930	70

Posteriormente, en placas de 96 pozos se colocaron 80 μ L de las concentraciones de albúmina y de las muestras de las fracciones celulares. Cada muestra se colocó por triplicado. Se añadieron 20 μ L del reactivo del kit. Se mezcló e incubó la placa a temperatura ambiente por 20 minutos y se

registraron las lecturas a 595nm en el espectrofotómetro (1420 Multilabel Counter de Wallac). Con los datos obtenidos se elaboró la curva patrón a partir de las concentraciones conocidas de albúmina y se extrapolaron las absorbancias de las muestras problema para obtener el dato de concentración de proteína.

ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

Para analizar del efecto de las citocinas en la expresión y localización de las claudinas, se realizaron ensayos de western blot de cada uno de los tratamientos. A cada una de las muestras obtenidas (citósol, membrana y citoesqueleto) se les adicionó β -Mercaptoetanol a una concentración final del 5% y posteriormente se colocaron en ebullición durante 5min.

A continuación se llevó a cabo una electroforesis desnaturalizante de proteínas: Se cargaron 20 μ g de proteína de cada fracción, y un marcador de peso molecular, en un gel de poliacrilamida al 15% en presencia de SDS, y se aplicó una corriente de 50mA por gel. Al finalizar la electroforesis, se lavaron los geles con Buffer de transferencia y se transfirieron en una cámara semi-seca a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) durante una hora, a 120mA. Se verificó la transferencia tiñendo las membranas con rojo de Ponceau, y luego se lavaron con agua bidestilada. Posteriormente las membranas fueron bloqueadas con una solución al 5% de leche descremada (Bio-Rad) en *Tris-Buffered saline* (TBS) con agitación suave durante una hora, con la finalidad de evitar la unión inespecífica de los anticuerpos. Se realizó un lavado de las membranas con TBS y se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes preparados en 10ml de *Tween20 –Tris Buffered saline* (TTBS) con agitación suave durante toda la noche a 4°C (Tabla 1).

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados

Anticuerpo	Concentración	Marca
Mouse anti Claudina-1	1 μ g/ml	Invitrogen
Rabbit anti Claudina-2	1 μ g/ml	Invitrogen
Rabbit anti Claudina-3	1 μ g/ml	Invitrogen
Mouse anti Claudina-4	1 μ g/ml	Invitrogen
Mouse anti Claudina-5	1 μ g/ml	Invitrogen
Mouse anti α -Actina	1:1000	-

Al día siguiente se realizaron tres lavados con TTBS de 10 min cada uno, y las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (conjugado con peroxidasa de rábano) en TTBS, agitando suavemente y a temperatura ambiente durante dos horas (Tabla 2).

Tabla 2. Anticuerpos secundarios utilizados

Anticuerpo	Dilución	Marca
Goat anti Mouse IgG-HRP	1: 5 000	Invitrogen
Goat anti Rabbit IgG-HRP	1: 500	Invitrogen

Por último, se realizaron tres lavados de 10 min con TTBS y un lavado de 10 min con TBS. La unión de los anticuerpos fue detectada por quimioluminiscencia con el *kit Super signal West Dura extended duration substrate* de Thermo Scientific/Pierce Protein Research Products.

Se analizó la intensidad de las bandas utilizando el software *GelQuant*, y se graficaron como porcentaje respecto al control utilizando el software *Sigma Plot*.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos son presentados como el promedio \pm la desviación estándar. El análisis de datos se realizó mediante el análisis de varianza (ANOVA) de una vía, utilizando el software *SigmaStat*. Un valor de $P \leq 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Efecto de diferentes concentraciones de citocinas en la TER de células LLC-PK₁

Ya que se ha reportado en diversas líneas celulares que las citocinas proinflamatorias afectan la función de barrera de las uniones estrechas, para analizar el efecto del TNF- α , IL-1 β e IFN- γ sobre la función de barrera epitelial en las células LLC-PK₁, después de hacer una medición inicial de la TER se añadieron tres diferentes concentraciones (5, 10 y 20ng/ml) de cada una de las citocinas en el compartimento basolateral de los insertos, y como control se dejaron células sin tratamiento. Se tomó una nueva medición 48 horas después (Figura 11).

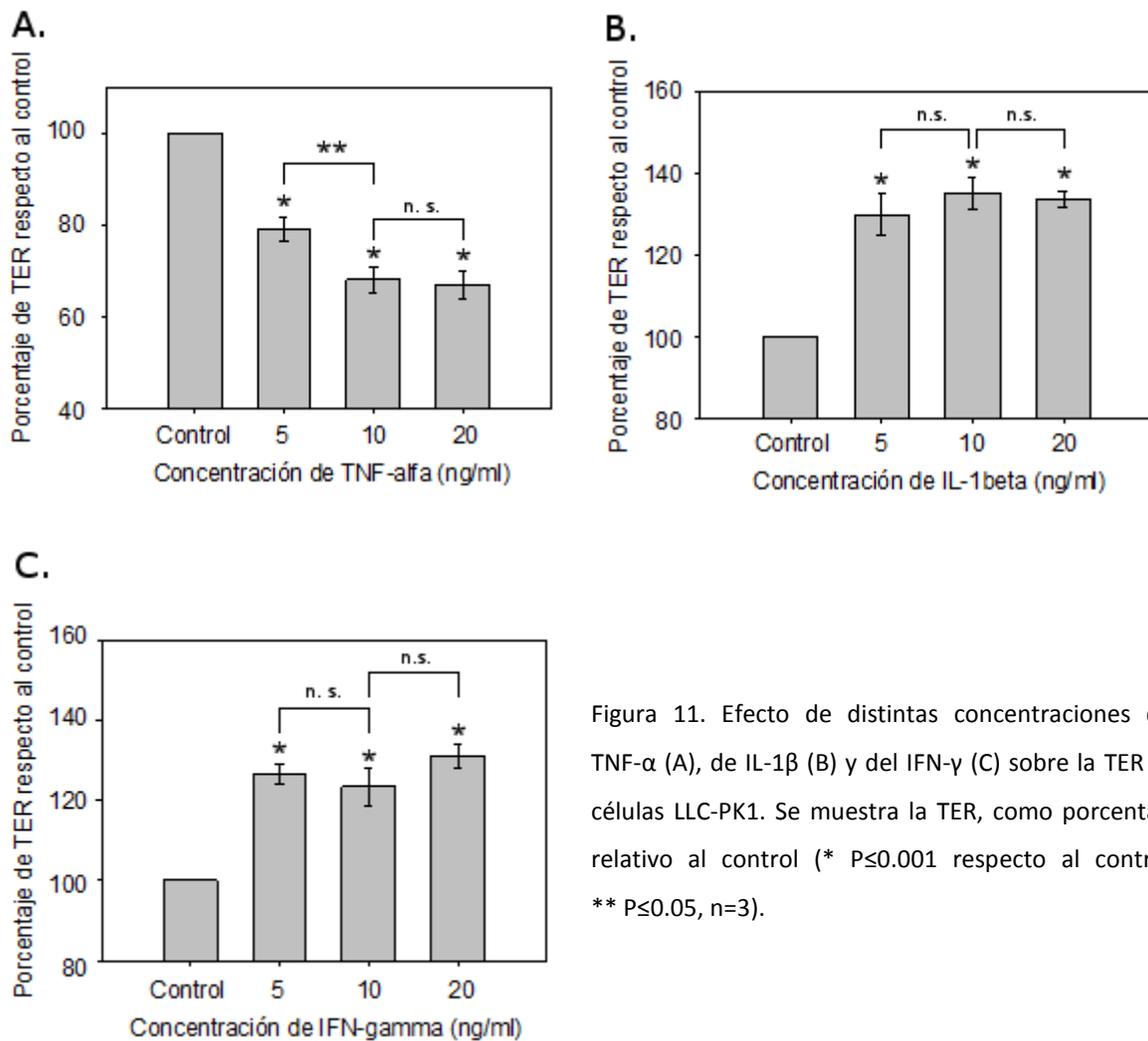


Figura 11. Efecto de distintas concentraciones del TNF- α (A), de IL-1 β (B) y del IFN- γ (C) sobre la TER de células LLC-PK1. Se muestra la TER, como porcentaje relativo al control (* $P \leq 0.001$ respecto al control, ** $P \leq 0.05$, $n=3$).

Se observó que el tratamiento con TNF- α induce una disminución significativa de la TER, y que este efecto es más marcado a partir de la concentración de 10ng/ml, reduciéndose en casi el 40% comparado con la TER control.

En el tratamiento con IL-1 β así como con el IFN- γ , se observó un incremento en la TER de alrededor del 30% y 20% respectivamente, y no hay diferencias significativas entre las distintas concentraciones probadas. Para facilidad de manejo, en los experimentos posteriores se decidió utilizar las tres citocinas a una concentración de 10ng/ml.

Efecto de la aplicación Apical o Basolateral de las citocinas en la TER de células LLC-PK₁

Para observar si existen diferencias en el efecto de las citocinas sobre la TER dependiendo del sitio de aplicación, se aplicaron las citocinas en el compartimento apical o en el basolateral de los insertos Transwell. Se utilizó una concentración de 10ng/ml de cada una de las citocinas y la TER se midió 48 horas después de su aplicación.

Los resultados obtenidos mostraron que en el tratamiento con TNF- α se observa una diferencia significativa entre la aplicación apical y la basolateral, siendo más pronunciada la disminución de la TER al aplicar el TNF- α de manera basolateral (del 40% con respecto al control). Sin embargo, en los tratamientos con IL-1 β y con IFN- γ no se observa diferencia significativa en la TER entre la aplicación apical o basolateral de las citocinas (Figura 12). Con base en lo anterior, en los experimentos posteriores se continuó aplicando las citocinas de manera basolateral.

Efecto individual de las citocinas sobre la TER de células LLC-PK₁ a varios tiempos de tratamiento

Para comprender mejor el efecto de las citocinas sobre la TER de las células LLC-PK₁, se observó el efecto en la TER a diferentes tiempos de tratamiento (24, 48 y 72 horas después de la aplicación de las citocinas). Se utilizó una concentración de 10ng/ml de cada citocina, añadidas de manera basolateral.

Al tratar a las células con el TNF- α se observó una disminución progresiva de la TER, hasta alcanzar un valor de cerca del 50% del control inicial, a las 78h de tratamiento (Figura 13).

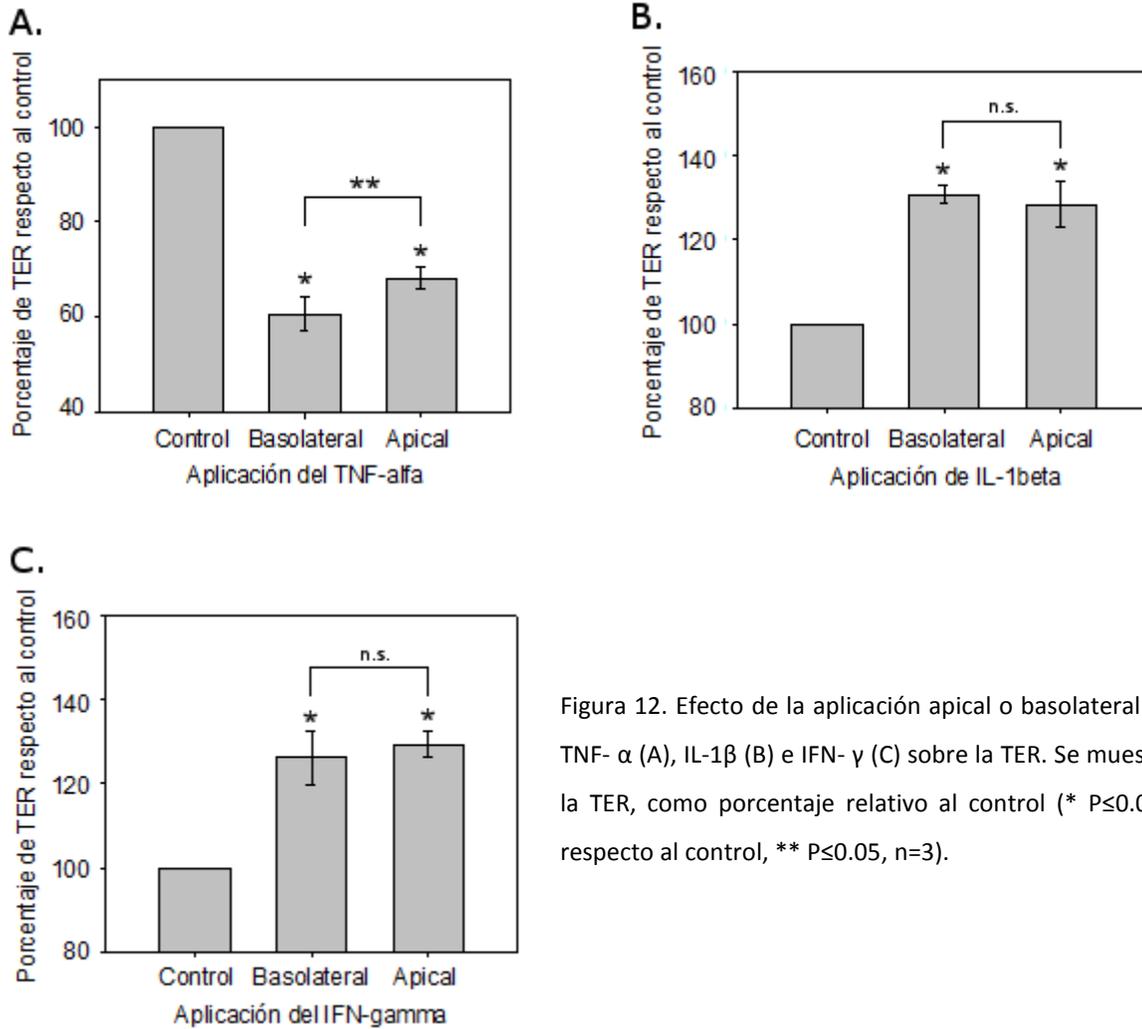


Figura 12. Efecto de la aplicación apical o basolateral de TNF- α (A), IL-1 β (B) e IFN- γ (C) sobre la TER. Se muestra la TER, como porcentaje relativo al control (* $P \leq 0.001$ respecto al control, ** $P \leq 0.05$, $n=3$).

En el tratamiento con IL-1 β , se observa un incremento en la TER, que alcanza a las 48h un aumento máximo de cerca de 30% con respecto al control inicial, y disminuye a las 72h, aunque siempre se mantiene por arriba del control (Figura 14).

El tratamiento con IFN- γ incrementa la TER con un patrón parecido al de la IL-1 β , pero en este tratamiento se observa un aumento de alrededor de 25% desde las 24h de tratamiento, que se mantiene a las 48h y disminuye a las 72h, aunque el valor de la TER sigue siendo mayor que el del control (Figura 15).

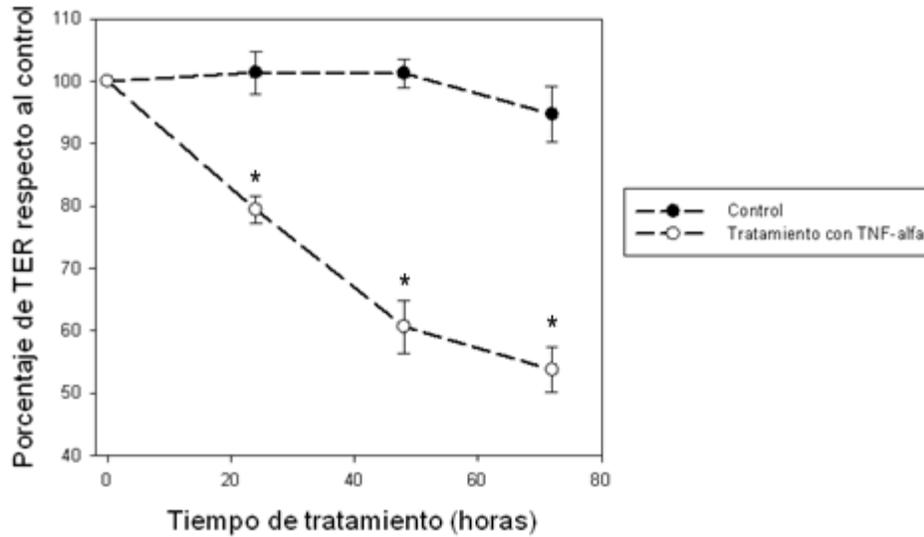


Figura 13. Efecto del TNF- α en la TER de células LLC-PK₁ a diferentes tiempos de tratamiento. Se muestra la TER como porcentaje respecto al control inicial hasta las 72 horas de tratamiento (* P \leq 0.001 respecto al control, n=5).

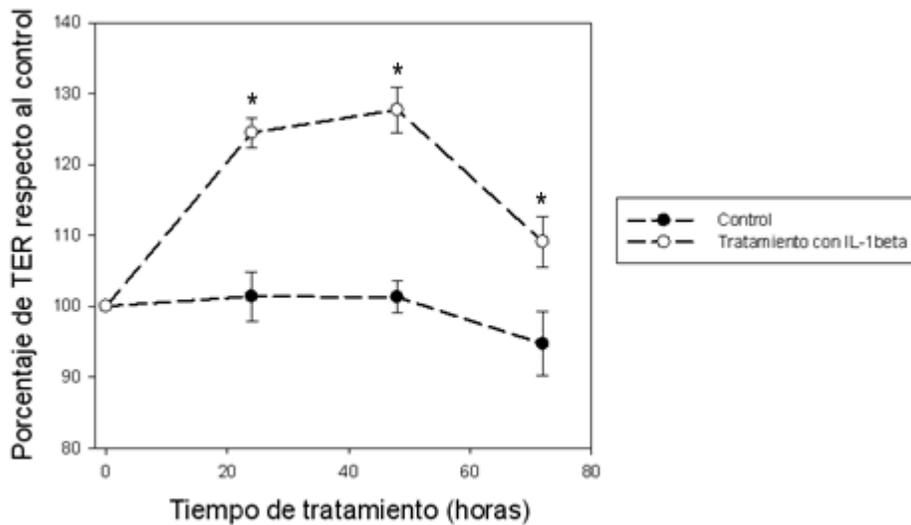


Figura 14. Efecto de IL-1 β en la TER de células LLC-PK₁ a diferentes tiempos de tratamiento. Se muestra la TER como porcentaje respecto al control inicial hasta las 72 horas de tratamiento (* P \leq 0.001 respecto al control, n=5).

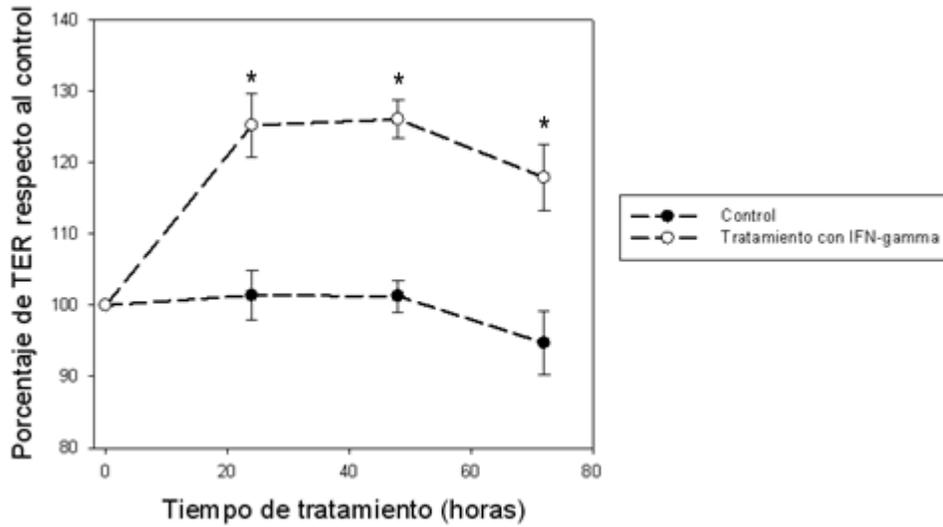


Figura 15. Efecto del IFN- γ en la TER de células LLC-PK₁ a diferentes tiempos de tratamiento. Se muestra la TER como porcentaje respecto al control inicial hasta las 72 horas de tratamiento (* P \leq 0.001 respecto al control, n=5).

Efecto conjunto de TNF- α , IL-1 β e INF- γ en la TER

Debido a que en condiciones fisiológicas las células no se encuentran expuestas a una sola citocina, sino a un conjunto de ellas, se observó el efecto conjunto del TNF- α , IL-1 β e IFN- γ . De la misma manera que en los tratamientos individuales, una vez estabilizada la TER y tomada la medición inicial se añadieron basolateralmente 10ng/ml de cada una de las tres citocinas y se observó el efecto en la TER a diferentes tiempos.

Los resultados mostraron que, al igual que el TNF- α , el tratamiento conjunto indujo una disminución de la TER, aunque en este caso la disminución se observó a partir de las 48h de tratamiento. La disminución máxima de la TER a las 72h fue de alrededor del 30% (Figura 16), mientras que en el tratamiento individual del TNF- α la disminución fue de casi el 50%.

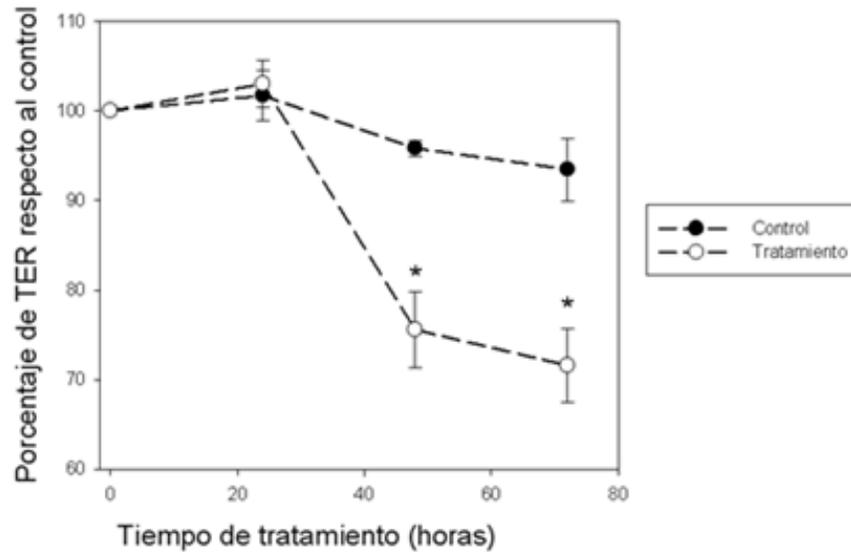


Figura 16. Efecto conjunto de TNF- α , IL-1 β e IFN- γ en la TER de células LLC-PK₁ a diferentes tiempos de tratamiento. Se muestra la TER como porcentaje respecto al control inicial, y la desviación estándar, de células con y sin tratamiento (* P \leq 0.001 respecto al control, n=5).

Efecto del TNF- α en la expresión y localización subcelular de las claudinas

Ya que se observó que las citocinas alteran la función de barrera de las células LLC-PK₁, y dado que la función de barrera es regulada por las proteínas de las UE, particularmente las claudinas, se planteó observar el efecto de las citocinas en la expresión de claudinas y su localización en las distintas fracciones subcelulares. Después de obtener la medición de TER de cada tiempo de tratamiento, se realizó una extracción de proteínas por fracciones subcelulares y se analizó la expresión de claudinas por western blot. Se muestra la expresión de α -actina como control de carga (Figura 17).



Figura 17. Control de carga de α -actina de los tratamientos con TNF- α

Se observó que el tratamiento con TNF- α indujo un aumento en la expresión de claudina-1 en citosol (de alrededor del 50%) a partir de las 48h, mientras que en el citoesqueleto la expresión de claudina-1 se duplicó desde las 24 horas. Sin embargo, no se observan cambios significativos de la expresión de claudina-1 en membrana (Figura 18).

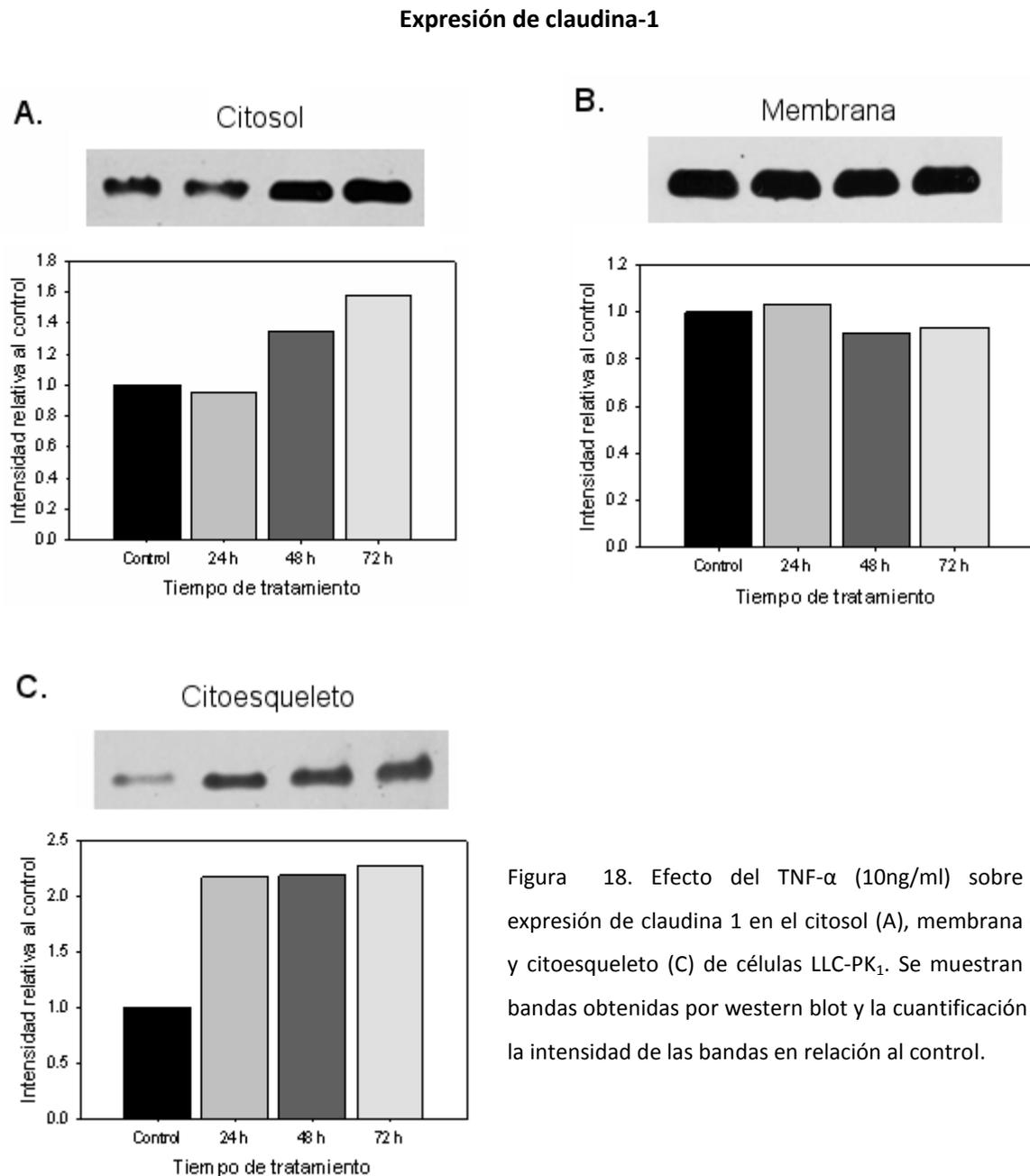


Figura 18. Efecto del TNF- α (10ng/ml) sobre la expresión de claudina 1 en el citosol (A), membrana (B) y citoesqueleto (C) de células LLC-PK₁. Se muestran las bandas obtenidas por western blot y la cuantificación de la intensidad de las bandas en relación al control.

Para el caso de claudina-2, el tratamiento con TNF- α provocó una disminución de su expresión en el citosol (de alrededor del 20%). En la fracción membranal, mientras que en el control prácticamente no se detecta expresión significativa de claudina-2, el tratamiento con TNF- α indujo su expresión desde las 24 horas. En el citoesqueleto se observó una disminución en la expresión a las 24h (de más del 50%) que posteriormente fue aumentando, hasta reestablecerse a las 72h (Figura 19).

Expresión de claudina-2

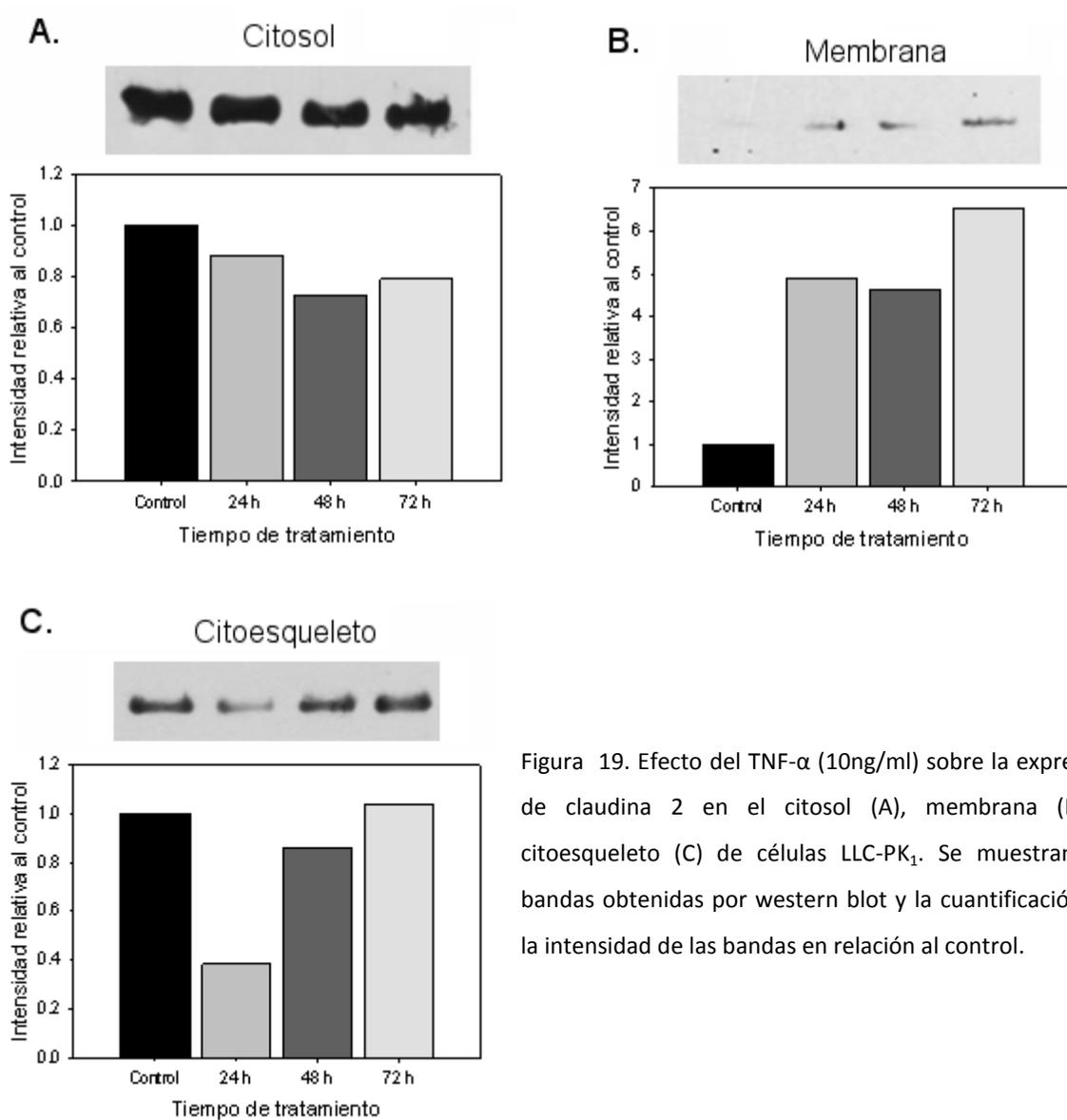


Figura 19. Efecto del TNF- α (10ng/ml) sobre la expresión de claudina 2 en el citosol (A), membrana (B) y citoesqueleto (C) de células LLC-PK₁. Se muestran las bandas obtenidas por western blot y la cuantificación de la intensidad de las bandas en relación al control.

En cuanto a la expresión de claudina-3, el tratamiento con TNF- α indujo en el citosol un aumento (de aproximadamente 20%) en las primeras 48h, y luego una disminución a las 72h (de 20% con respecto al control). En la fracción de membrana, se observa una ligera disminución a las 24h de tratamiento (del 10% aproximadamente), y posteriormente un aumento (de alrededor de 50% respecto al control) a partir de las 48h. De igual manera, en el citoesqueleto se observa una disminución a las 24h (del 30%) seguida de un incremento, de más de 40% a las 72h de tratamiento (Figura 20).

Expresión de claudina-3

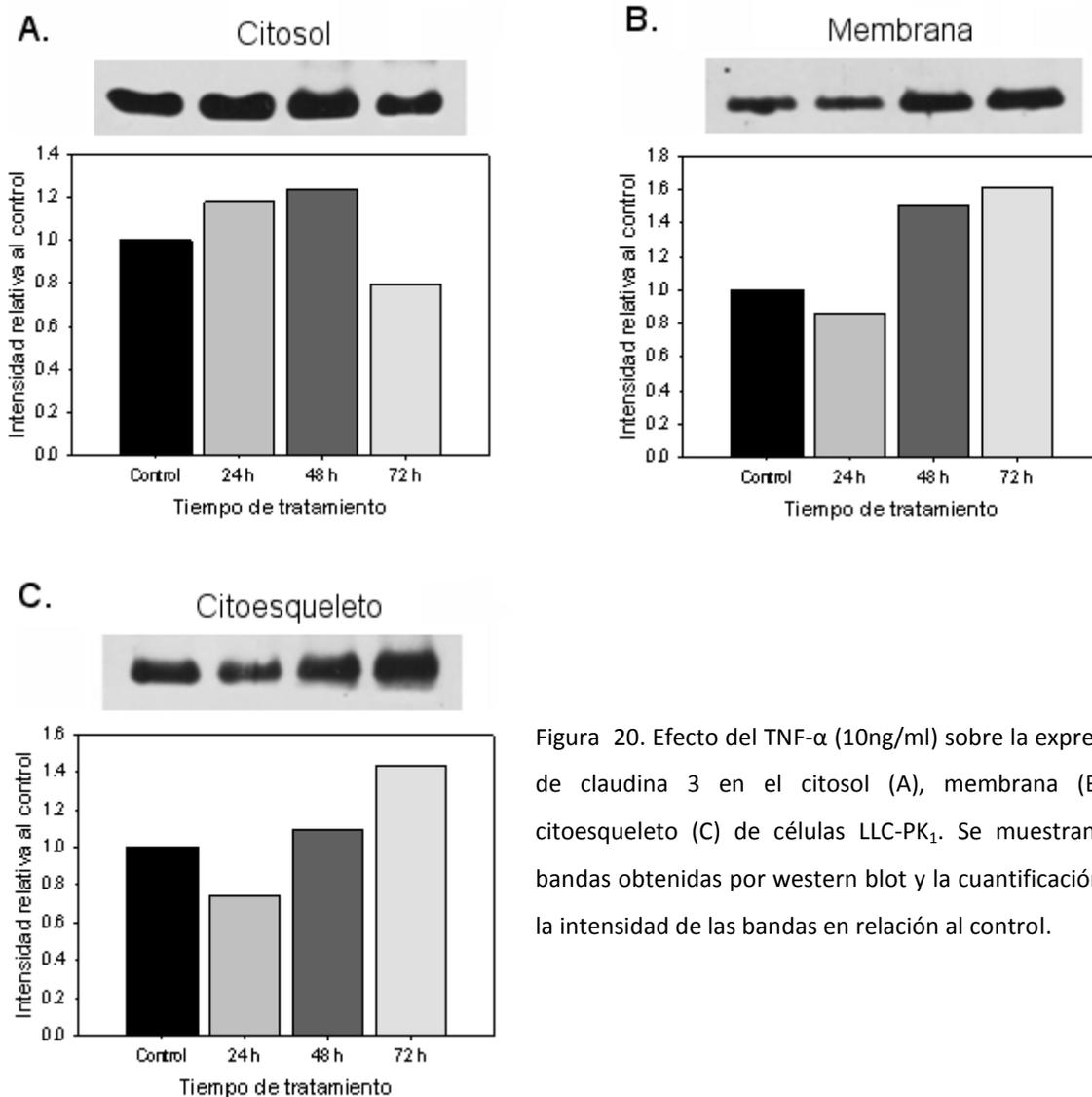


Figura 20. Efecto del TNF- α (10ng/ml) sobre la expresión de claudina 3 en el citosol (A), membrana (B) y citoesqueleto (C) de células LLC-PK₁. Se muestran las bandas obtenidas por western blot y la cuantificación de la intensidad de las bandas en relación al control.

Al tratar a las células con TNF- α se observó un aumento en la expresión de claudina-4 en el citosol (alrededor del 30%) a las 24h y 48h, y también un aumento en el citoesqueleto (donde la expresión de claudina-4 llega a triplicarse para las 72h), mientras que en la fracción de membrana no parece haber cambios significativos (Figura 21).

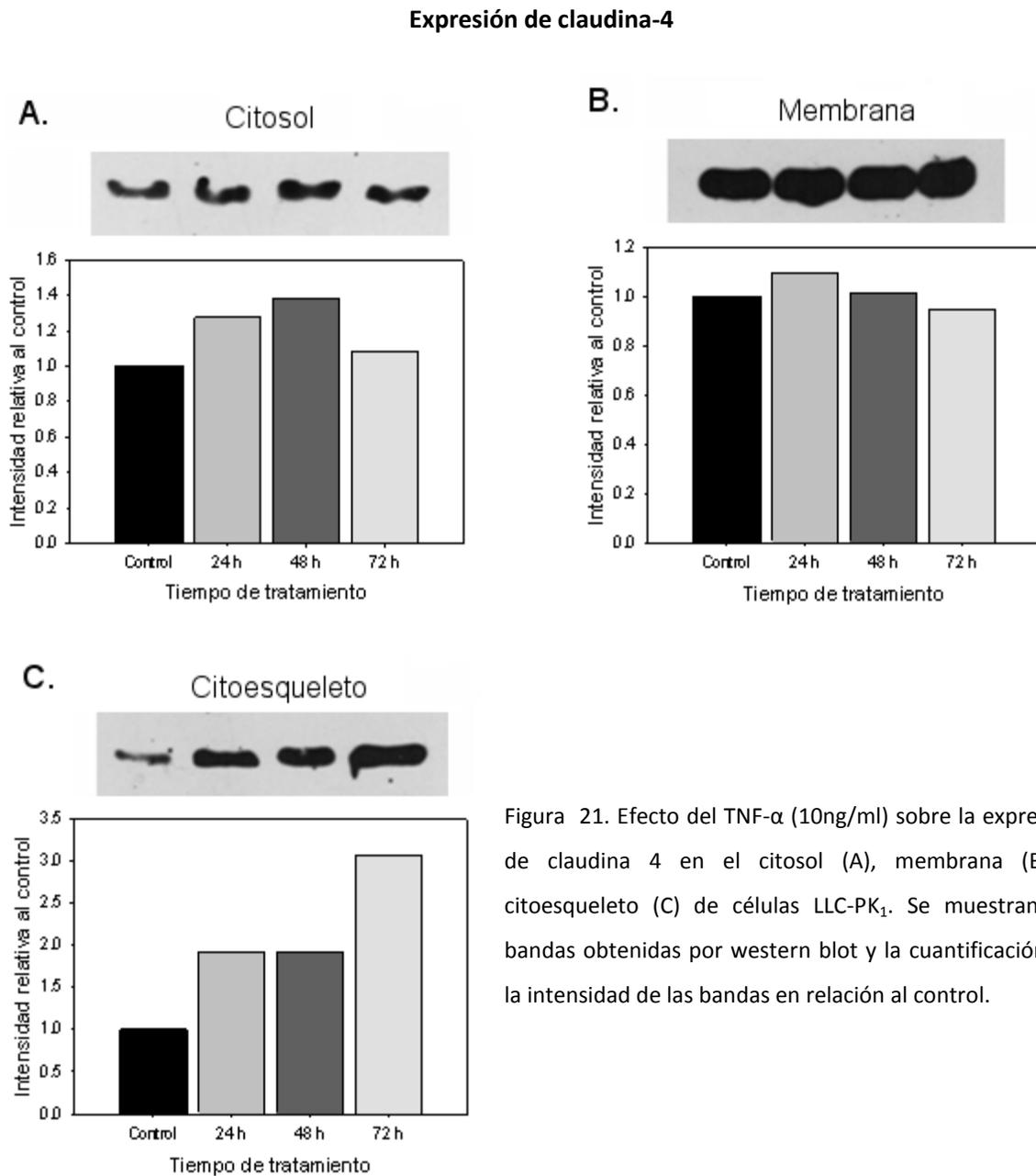


Figura 21. Efecto del TNF- α (10ng/ml) sobre la expresión de claudina 4 en el citosol (A), membrana (B) y citoesqueleto (C) de células LLC-PK₁. Se muestran las bandas obtenidas por western blot y la cuantificación de la intensidad de las bandas en relación al control.

En el caso de claudina-5, no se detectó su expresión en citosol o citoesqueleto, ni en los controles ni en los tratamientos. Solo se detectó expresión de claudina-5 en el control de la fracción membranal, pero el tratamiento con TNF- α parece suprimir completamente su expresión (Figura 22).

Expresión de claudina-5

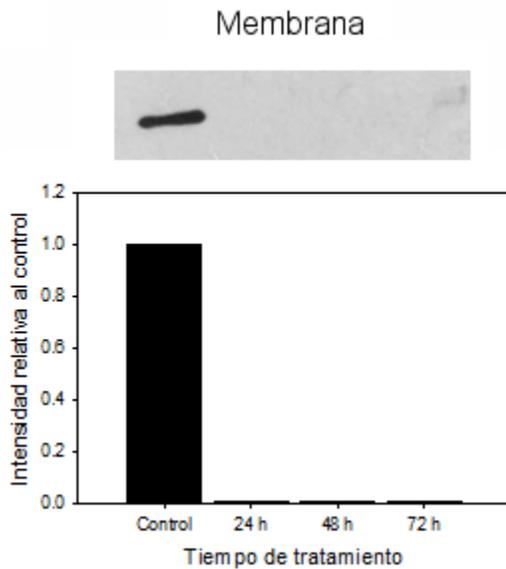


Figura 22. Efecto de TNF- α (10ng/ml) sobre la expresión de claudina 5 en la membrana de células LLC-PK₁. No se detectó expresión significativa de claudina 5 en las fracciones de citosol ni citoesqueleto. Se muestran las bandas obtenidas por western blot y la cuantificación de la intensidad de las bandas en relación al control.

Efecto de IL-1 β en la expresión y localización subcelular de las claudinas

Para observar el efecto de IL-1 β en la expresión de las claudinas, se realizó la extracción de proteínas por fracciones subcelulares y se analizó por western blot. Se muestran los controles de carga de α -actina (Figura 23).

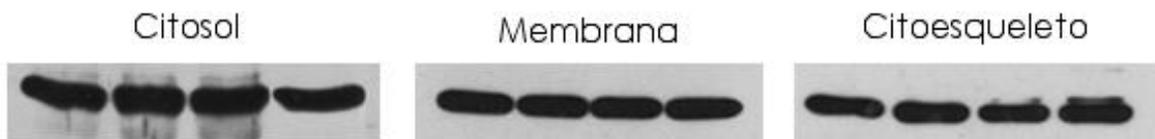


Figura 23. Control de carga de α -actina de los tratamientos con IL-1 β

En cuanto a la expresión de claudina-1, el tratamiento con IL-1 β no produjo cambios significativos en las fracciones de citosol y membrana. En la fracción de citoesqueleto se observó una disminución del 30% a las 24 horas, que posteriormente aumenta y se reestablece a las 72h (Figura 24).

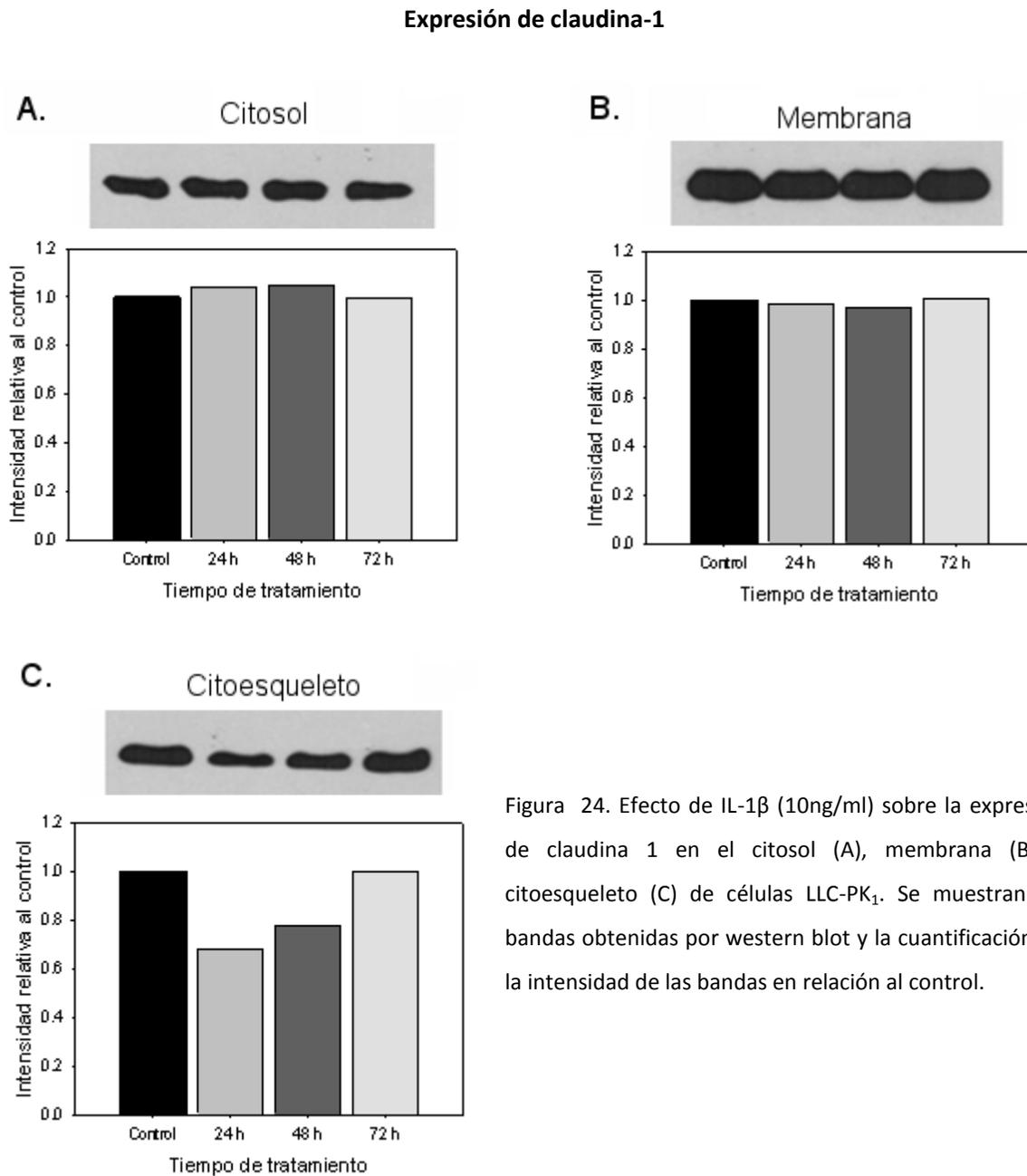


Figura 24. Efecto de IL-1 β (10ng/ml) sobre la expresión de claudina 1 en el citosol (A), membrana (B) y citoesqueleto (C) de células LLC-PK₁. Se muestran las bandas obtenidas por western blot y la cuantificación de la intensidad de las bandas en relación al control.

Al analizar la expresión de claudina-2, se observó que el tratamiento con IL-1 β no afecta significativamente la fracción de citosol, mientras que en el citoesqueleto induce un aumento de la expresión (de casi el 60% a las 72h). No se detectó expresión significativa en la fracción de membrana, ni en el control ni en los tiempos de tratamiento (Figura 25).

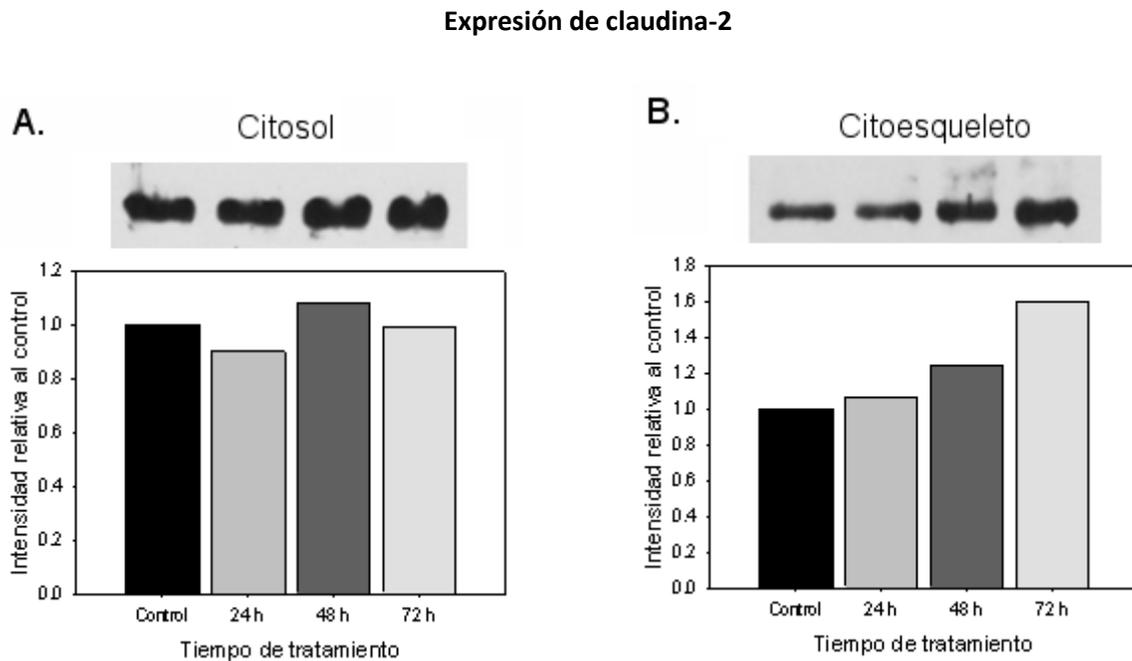


Figura 25. Efecto de IL-1 β (10ng/ml) sobre la expresión de claudina 2 en el citosol (A) y citoesqueleto (B) de células LLC-PK₁. No se detectó expresión significativa de claudina 2 en la fracción membranal. Se muestran las bandas obtenidas por western blot y la cuantificación de la intensidad de las bandas en relación al control.

Se observó para la claudina-3 que el tratamiento con IL-1 β genera en citosol y citoesqueleto una disminución de la expresión a las 24h (del 50%), que tiende a aumentar posteriormente, y en el caso del citoesqueleto, llega a superar el nivel del control a las 72h. En la fracción de membrana, sólo se observa un aumento en la expresión de claudina-3 hasta las 72h del tratamiento, de alrededor del 60% (Figura 26).

Expresión de claudina-3

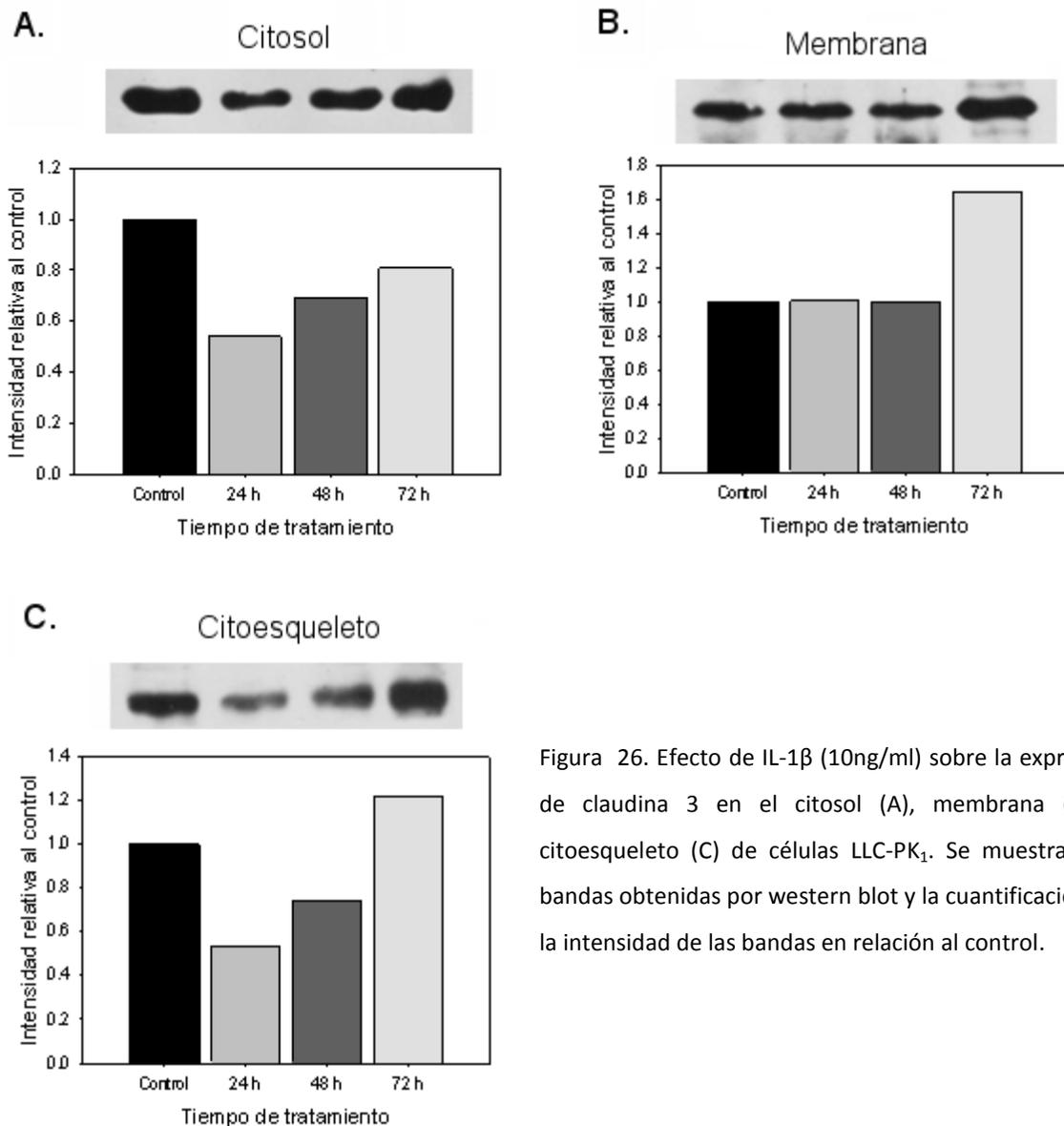


Figura 26. Efecto de IL-1 β (10ng/ml) sobre la expresión de claudina 3 en el citosol (A), membrana (B) y citoesqueleto (C) de células LLC-PK₁. Se muestran las bandas obtenidas por western blot y la cuantificación de la intensidad de las bandas en relación al control.

Al tratar las células con IL-1 β , se observó a las 24h una pequeña disminución en los niveles de claudina-4 en citosol (del 10%). En la membrana se observa un aumento a las 72h de tratamiento con IL-1 β (de aproximadamente 20%). En la fracción de citoesqueleto se observa primero una disminución (del 30%) que tiende a reestablecerse posteriormente, superando el nivel del control a las 72h (Figura 27).

Expresión de claudina-4

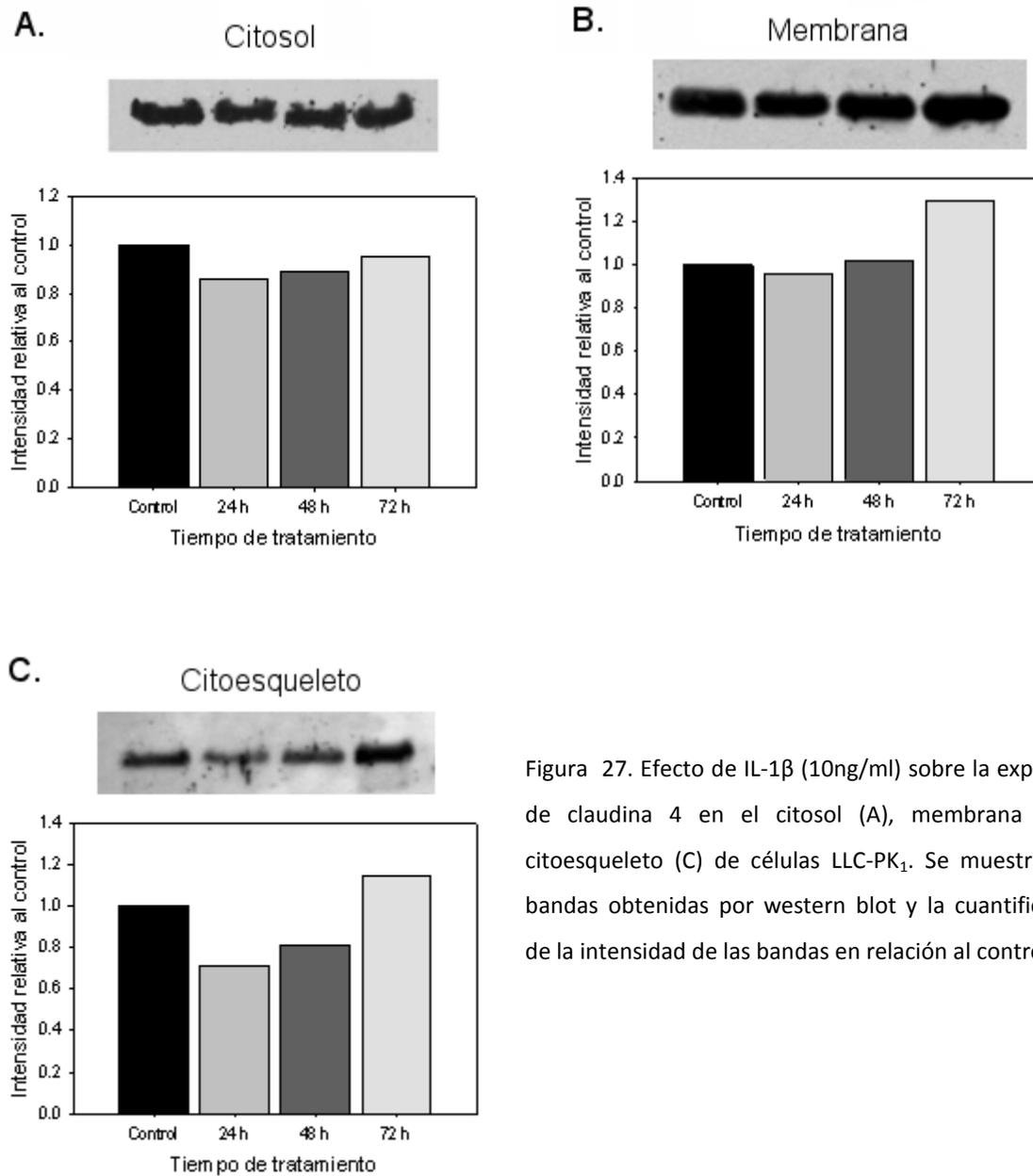


Figura 27. Efecto de IL-1 β (10ng/ml) sobre la expresión de claudina 4 en el citosol (A), membrana (B) y citoesqueleto (C) de células LLC-PK₁. Se muestran las bandas obtenidas por western blot y la cuantificación de la intensidad de las bandas en relación al control.

No se observó expresión de claudina 5 en las fracciones de citosol ni citoesqueleto, ni en el control ni en los tratamientos. En la fracción membranal, se observó que el tratamiento con IL-1 β indujo una disminución a las 24 horas (de alrededor del 60%), y posteriormente aumenta, hasta sobrepasar el valor del control en casi un 30% a las 72h (Figura 28).

Expresión de claudina-5

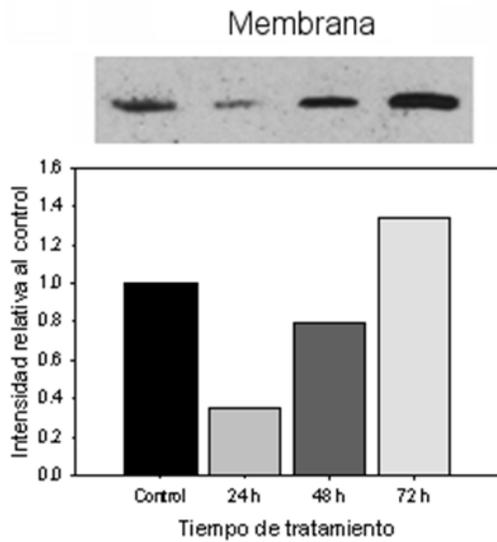


Figura 28. Efecto de IL-1 β (10ng/ml) sobre la expresión de claudina 5 en la membrana de células LLC-PK₁. No se detectó expresión significativa de claudina 5 en las fracciones de citosol ni citoesqueleto. Se muestran las bandas obtenidas por western blot y la cuantificación de la intensidad de las bandas en relación al control.

Efecto del IFN- γ en la expresión y localización subcelular de las claudinas

De igual manera se analizó, mediante extracción de proteínas por fracciones celulares y western blot, el efecto del IFN- γ en la expresión de las claudinas. Se muestra la α -actina como control de carga (Figura 29).



Figura 29. Control de carga de α -actina de los tratamientos con IFN- γ

Se observó que el tratamiento con IFN- γ indujo una disminución en la expresión de claudina-1 en el citosol (del 20%) y citoesqueleto (de alrededor del 40%) a las 24 y 48h, reestableciéndose a las 72h. Por otro lado, en la fracción de membrana se duplicó la expresión de claudina-1 a las 24 y 48h, y disminuye a las 72h (Figura 30).

Expresión de claudina-1

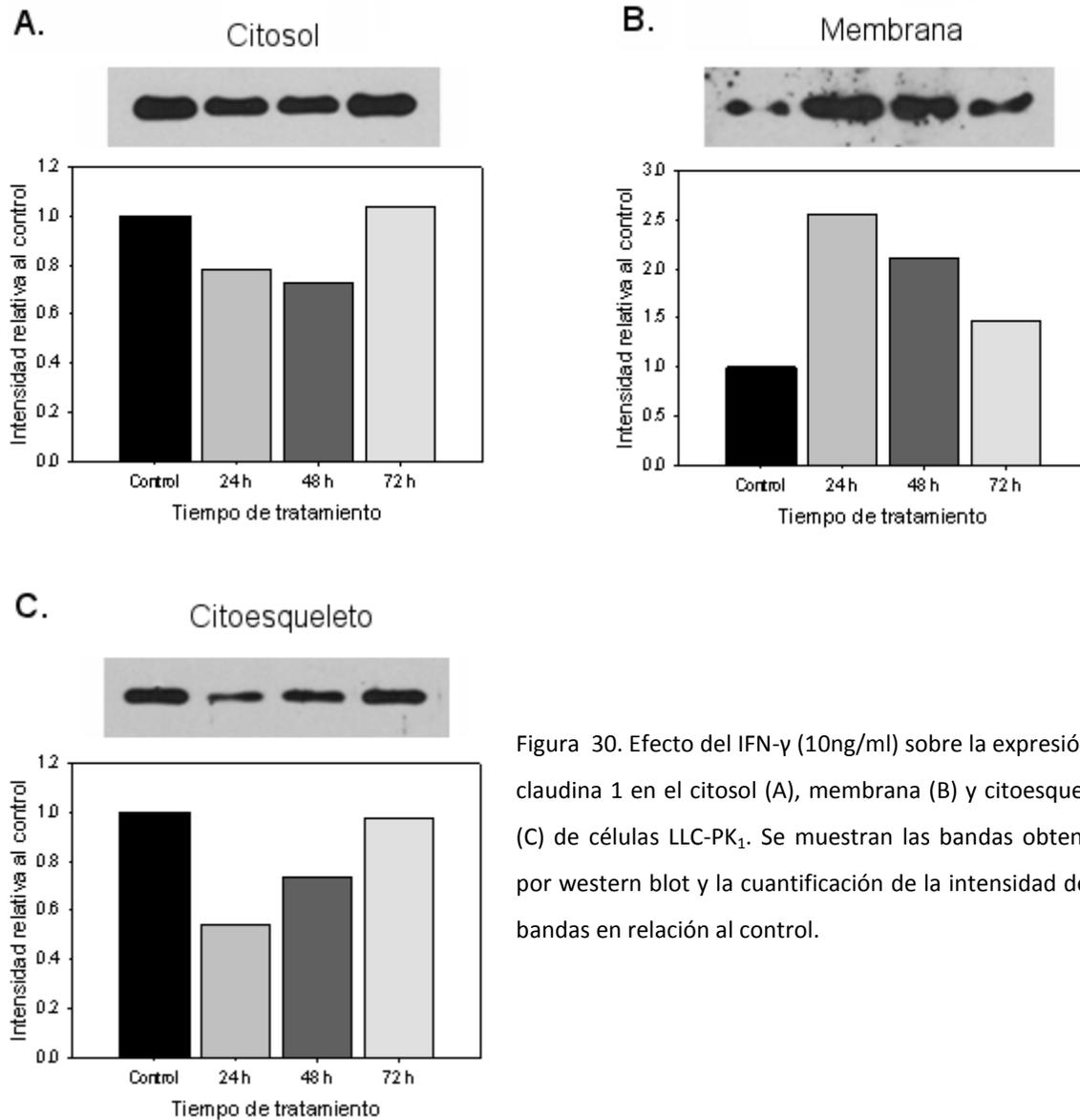


Figura 30. Efecto del IFN- γ (10ng/ml) sobre la expresión de claudina 1 en el citosol (A), membrana (B) y citoesqueleto (C) de células LLC-PK₁. Se muestran las bandas obtenidas por western blot y la cuantificación de la intensidad de las bandas en relación al control.

En cuanto a la expresión de claudina-2 se observó que el tratamiento con IFN- γ indujo, tanto en el citosol como en el citoesqueleto, una disminución a las 24h (de aproximadamente 20%) que posteriormente aumenta, hasta duplicarse en el caso del citosol y triplicarse en el caso del citoesqueleto, a las 72h. En la membrana no se detectó expresión significativa de claudina-2, ni en el control ni en los tratamientos (Figura 31).

Expresión de claudina-2

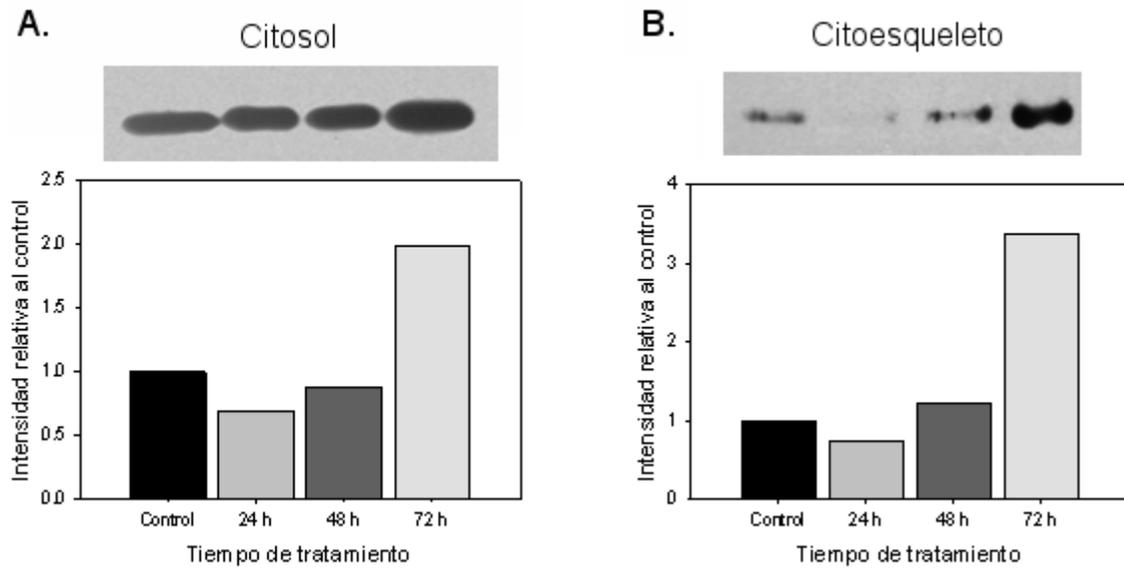


Figura 31. Efecto de IFN- γ (10ng/ml) sobre la expresión de claudina 2 en el citosol (A) y citoesqueleto (B) de células LLC-PK₁. No se detectó expresión significativa de claudina 2 en la fracción membranal. Se muestran las bandas obtenidas por western blot y la cuantificación de la intensidad de las bandas en relación al control.

El tratamiento con IFN- γ indujo un aumento en la expresión de claudina-3 en citosol (de alrededor del 20%). En la membrana se observó una disminución del 20% a las 24 y 48h, seguida de un aumento a las 72h (de casi el 60% con respecto al control). En el citoesqueleto se indujo una disminución del 40% a las 24 horas, que posteriormente tiende a aumentar hasta reestablecerse a las 72h (Figura 32).

Expresión de claudina-3

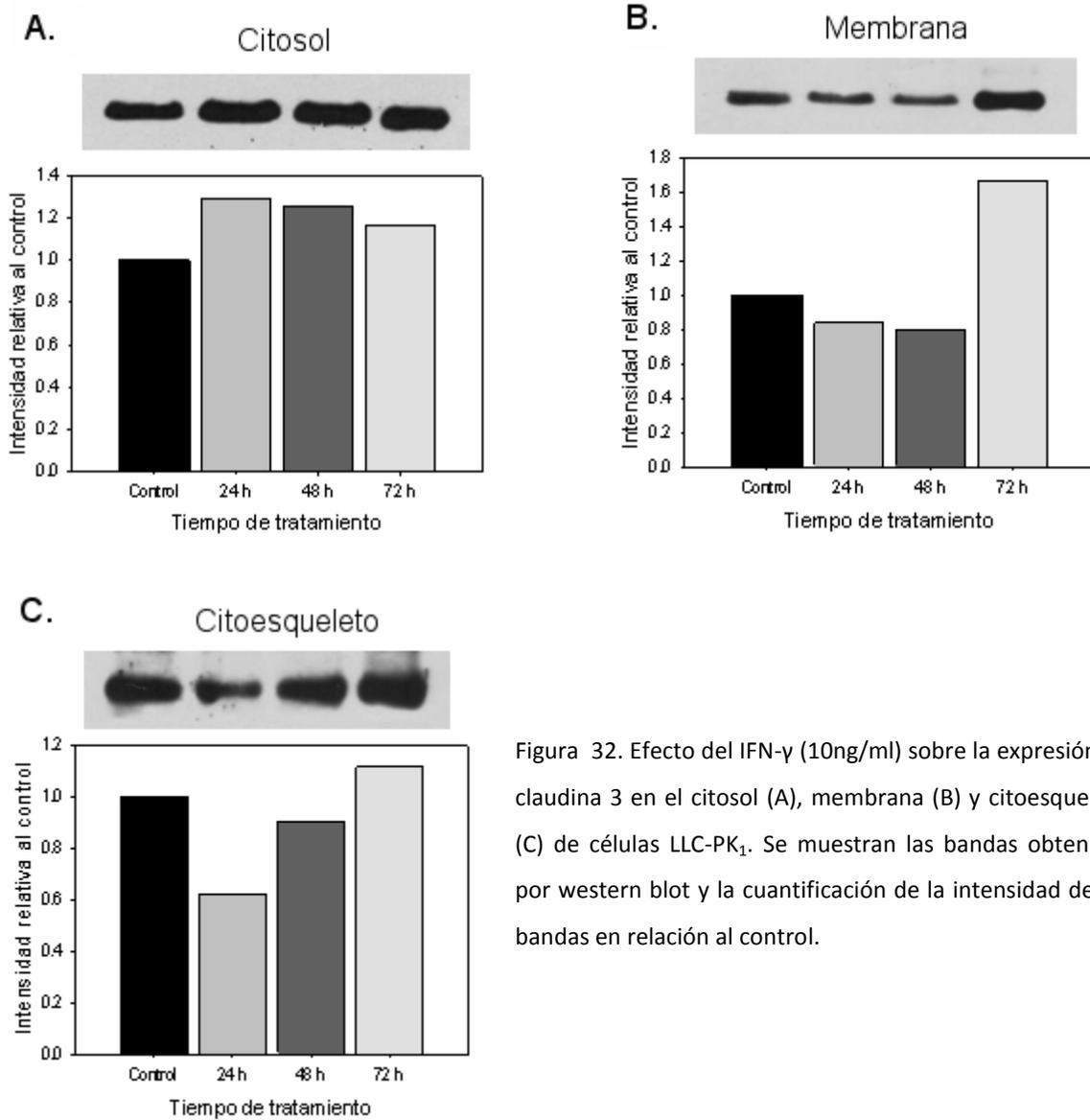


Figura 32. Efecto del IFN- γ (10ng/ml) sobre la expresión de claudina 3 en el citosol (A), membrana (B) y citoesqueleto (C) de células LLC-PK₁. Se muestran las bandas obtenidas por western blot y la cuantificación de la intensidad de las bandas en relación al control.

Para el caso de claudina-4, el IFN- γ induce un aumento de su expresión en el citosol a las 72h de tratamiento (de casi 40%), mientras que en el citoesqueleto induce una disminución (de alrededor del 20%) las primeras 48h de tratamiento y un aumento a las 72h, duplicando la expresión del control. En la fracción de membrana no se observan cambios significativos (Figura 33).

Expresión de claudina-4

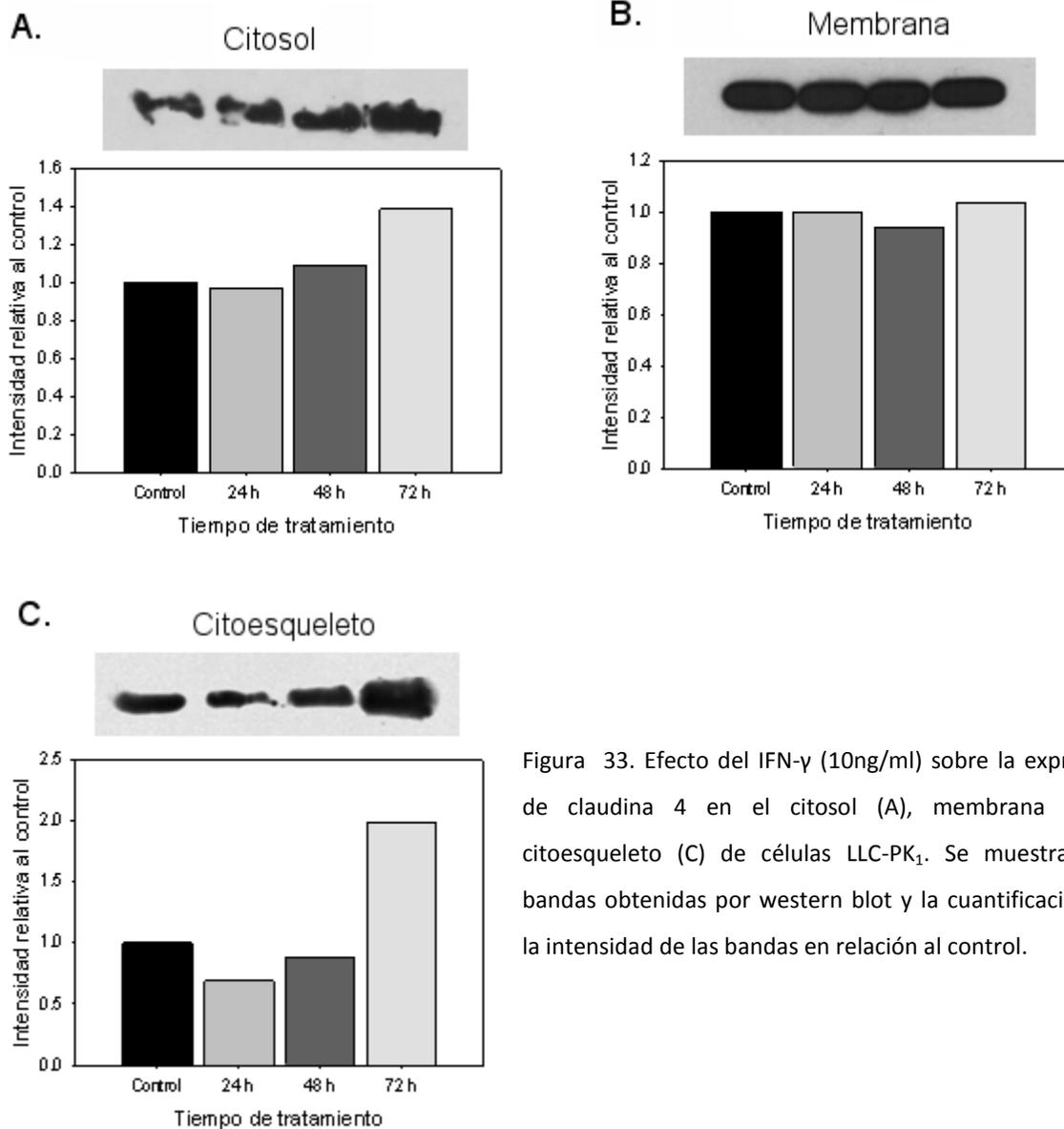


Figura 33. Efecto del IFN- γ (10ng/ml) sobre la expresión de claudina 4 en el citosol (A), membrana (B) y citoesqueleto (C) de células LLC-PK₁. Se muestran las bandas obtenidas por western blot y la cuantificación de la intensidad de las bandas en relación al control.

Cuando las células fueron tratadas con IFN- γ se observó en membrana una disminución de la expresión de claudina 5 (del 30%) a las 48h de tratamiento, que se reestablece para las 72h. No se detectó expresión significativa de claudina-5 en las fracciones de citosol y citoesqueleto, ni en el control ni en los tratamientos (figura 34).

Expresión de claudina-5

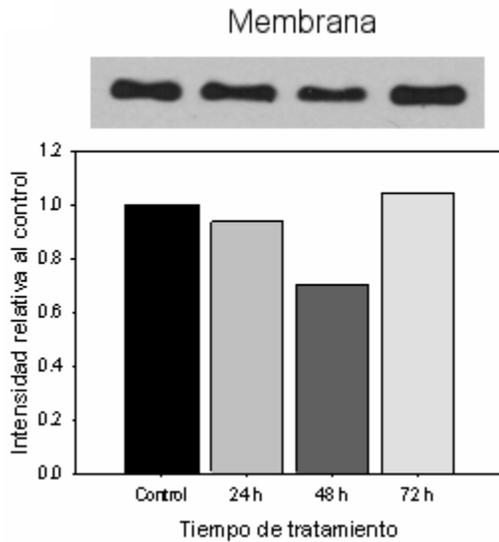


Figura 34. Efecto del IFN- γ (10ng/ml) sobre la expresión de claudina 5 en la membrana de células LLC-PK₁. No se detectó expresión significativa de claudina 5 en las fracciones de citosol ni citoesqueleto. Se muestran las bandas obtenidas por western blot y la cuantificación de la intensidad de las bandas en relación al control.

Efecto conjunto de TNF- α , IL-1 β e INF- γ en la localización subcelular de claudinas.

Para observar el efecto producido por las citocinas en conjunto sobre las claudinas, después de tomar las mediciones de TER se realizó una extracción de proteínas por fracciones subcelulares y se analizó la expresión de claudinas por western blot. Se muestra la α -actina como control de carga (Figura 35).



Figura 35. Control de carga de α -actina de los tratamientos con las tres citocinas en conjunto

Se observó que el tratamiento con las tres citocinas indujo un aumento de claudina-1 en el citosol (de más del 50%) desde las 24h. En el citoesqueleto el tratamiento también indujo un incremento en la expresión de claudina-1, hasta casi duplicar el valor del control a las 72h. En la membrana se observó un ligero aumento (de alrededor del 10%) a las 24h y 48h de tratamiento (Figura 36).

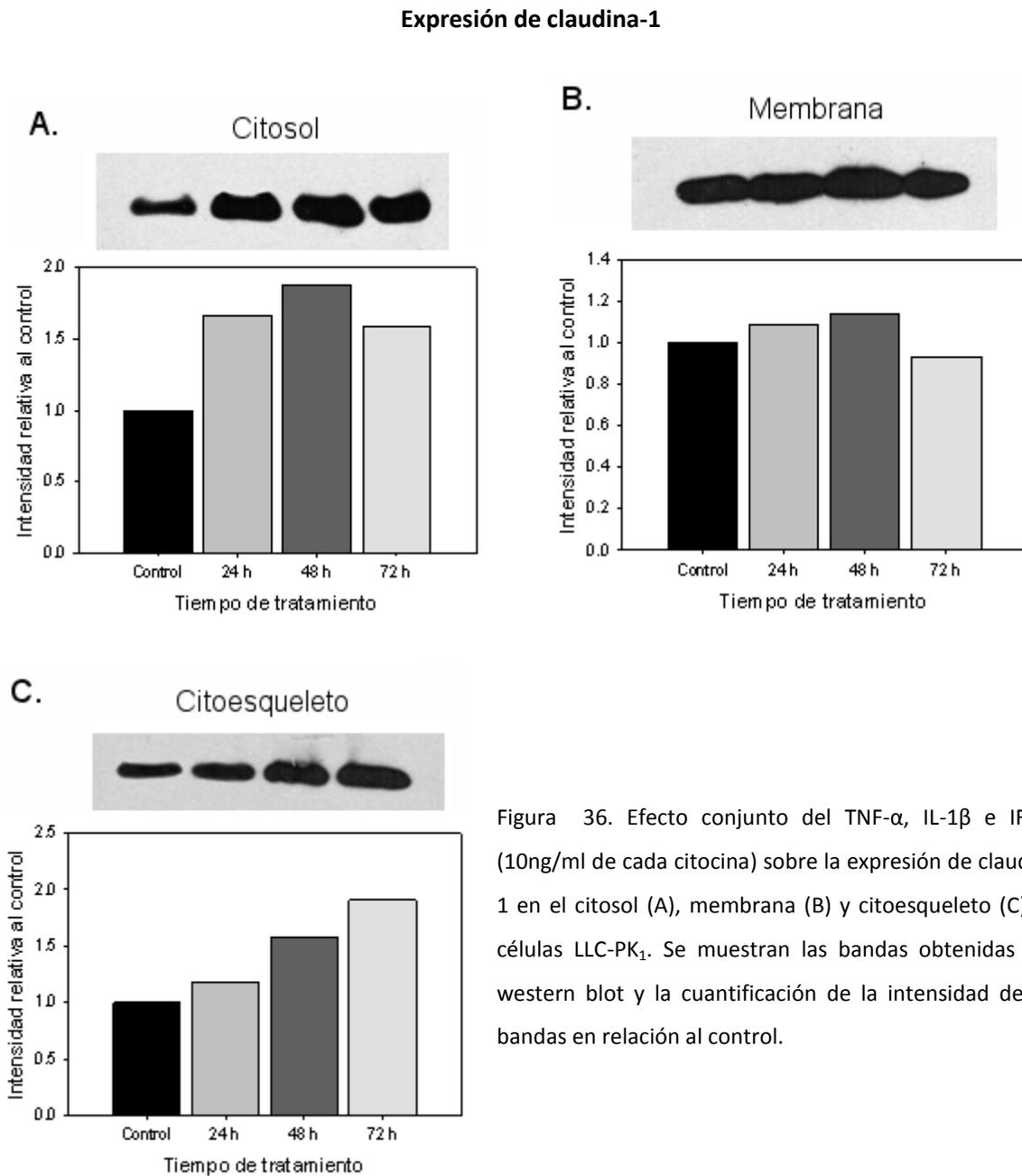


Figura 36. Efecto conjunto del TNF- α , IL-1 β e IFN- γ (10ng/ml de cada citocina) sobre la expresión de claudina 1 en el citosol (A), membrana (B) y citoesqueleto (C) de células LLC-PK₁. Se muestran las bandas obtenidas por western blot y la cuantificación de la intensidad de las bandas en relación al control.

El tratamiento con las tres citocinas indujo una disminución del 40% en la expresión de claudina 2 en el citoesqueleto, mientras que en la fracción citosólica no se observan cambios en la expresión. En la fracción membranal no se observó expresión significativa, ni en el control, ni en los tiempos de tratamiento (Figura 37).

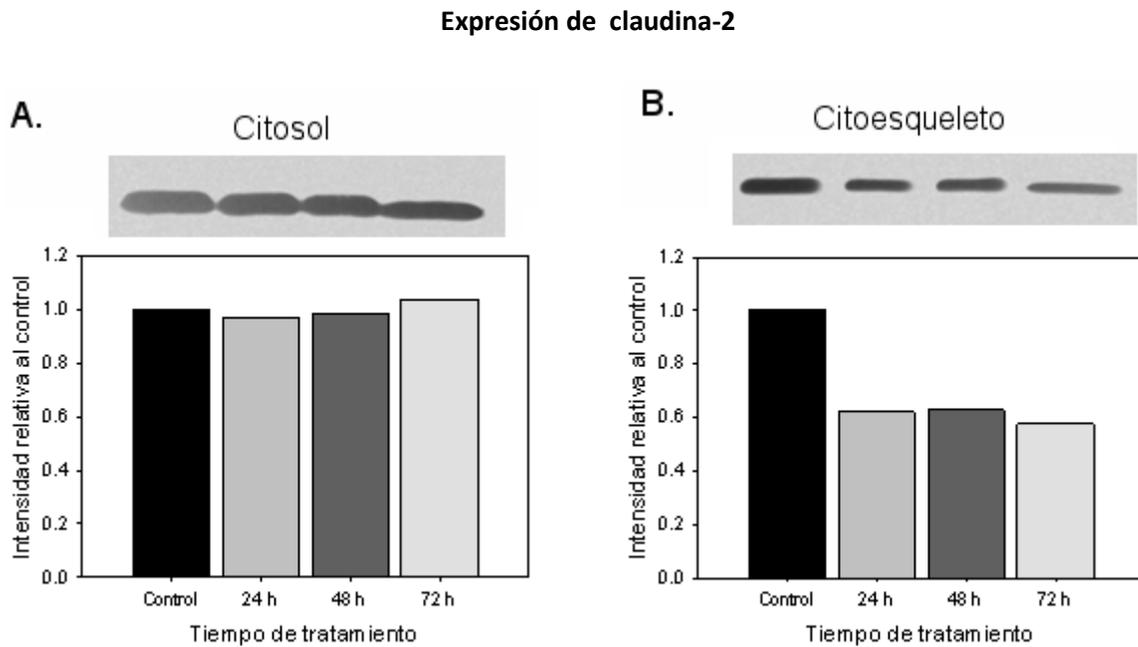


Figura 37. Efecto conjunto del TNF- α , IL-1 β e IFN- γ (10ng/ml de cada citocina) sobre la expresión de claudina 2 en el citosol (A) y citoesqueleto (B) de células LLC-PK₁. No se detectó expresión significativa de claudina 2 en la fracción membranal. Se muestran las bandas obtenidas por western blot y la cuantificación de la intensidad de las bandas en relación al control.

En cuanto a la expresión de claudina-3, se observó que el tratamiento con las tres citocinas indujo un aumento de su expresión en membrana, hasta casi duplicarse a las 72h, y una disminución en la fracción de citoesqueleto (de alrededor del 50%), mientras que en el citosol no se observan cambios significativos (Figura 38).

Expresión de claudina-3

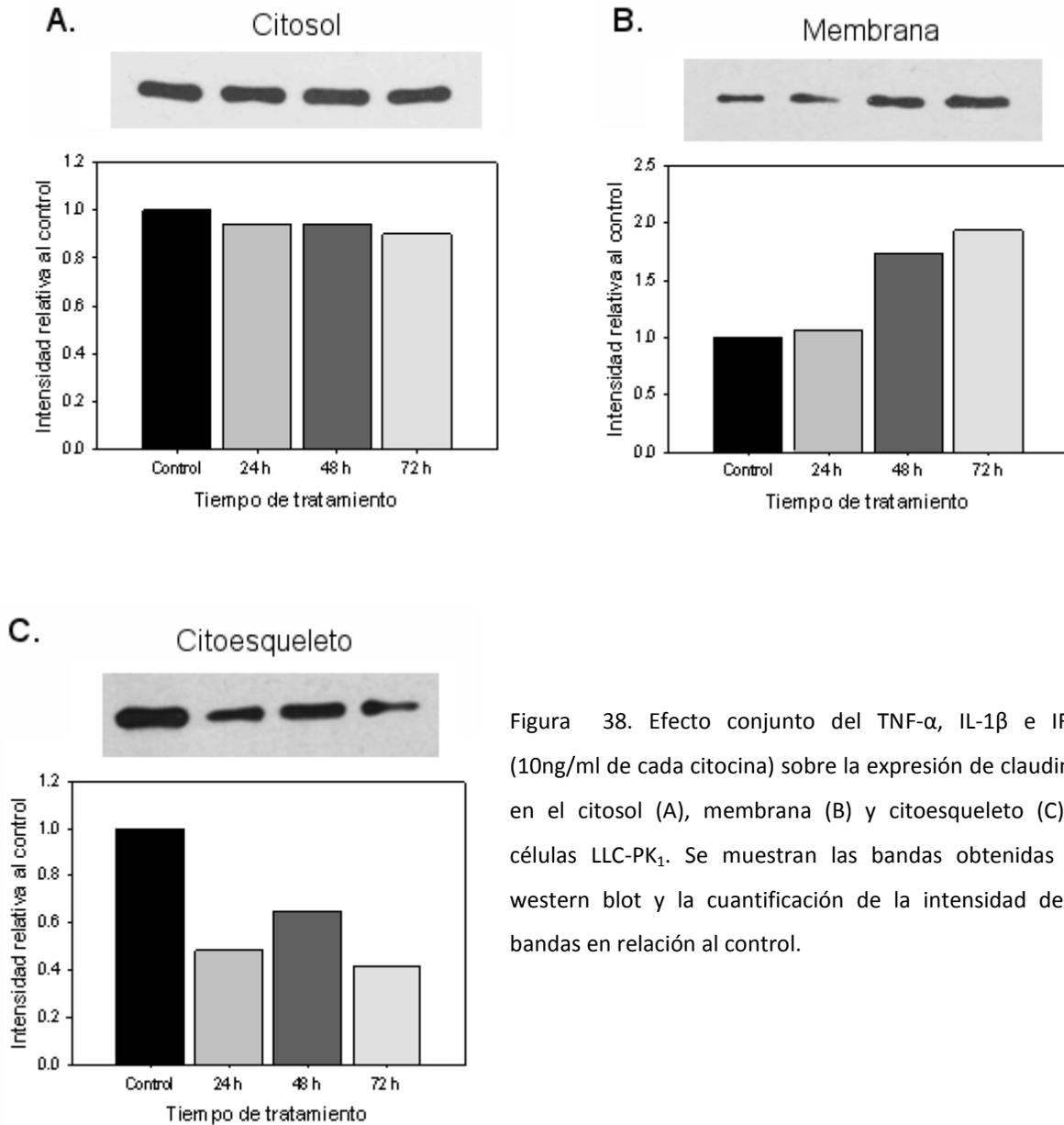


Figura 38. Efecto conjunto del TNF- α , IL-1 β e IFN- γ (10ng/ml de cada citocina) sobre la expresión de claudina 3 en el citosol (A), membrana (B) y citoesqueleto (C) de células LLC-PK₁. Se muestran las bandas obtenidas por western blot y la cuantificación de la intensidad de las bandas en relación al control.

Para la claudina-4, el tratamiento con las 3 citocinas no indujo cambios significativos en las fracciones citosólica y membranal. Sin embargo, se observa un marcado aumento de la expresión de claudina-4 en el citoesqueleto, de más del doble del control, desde las 24h de tratamiento (Figura 39).

Expresión de claudina-4

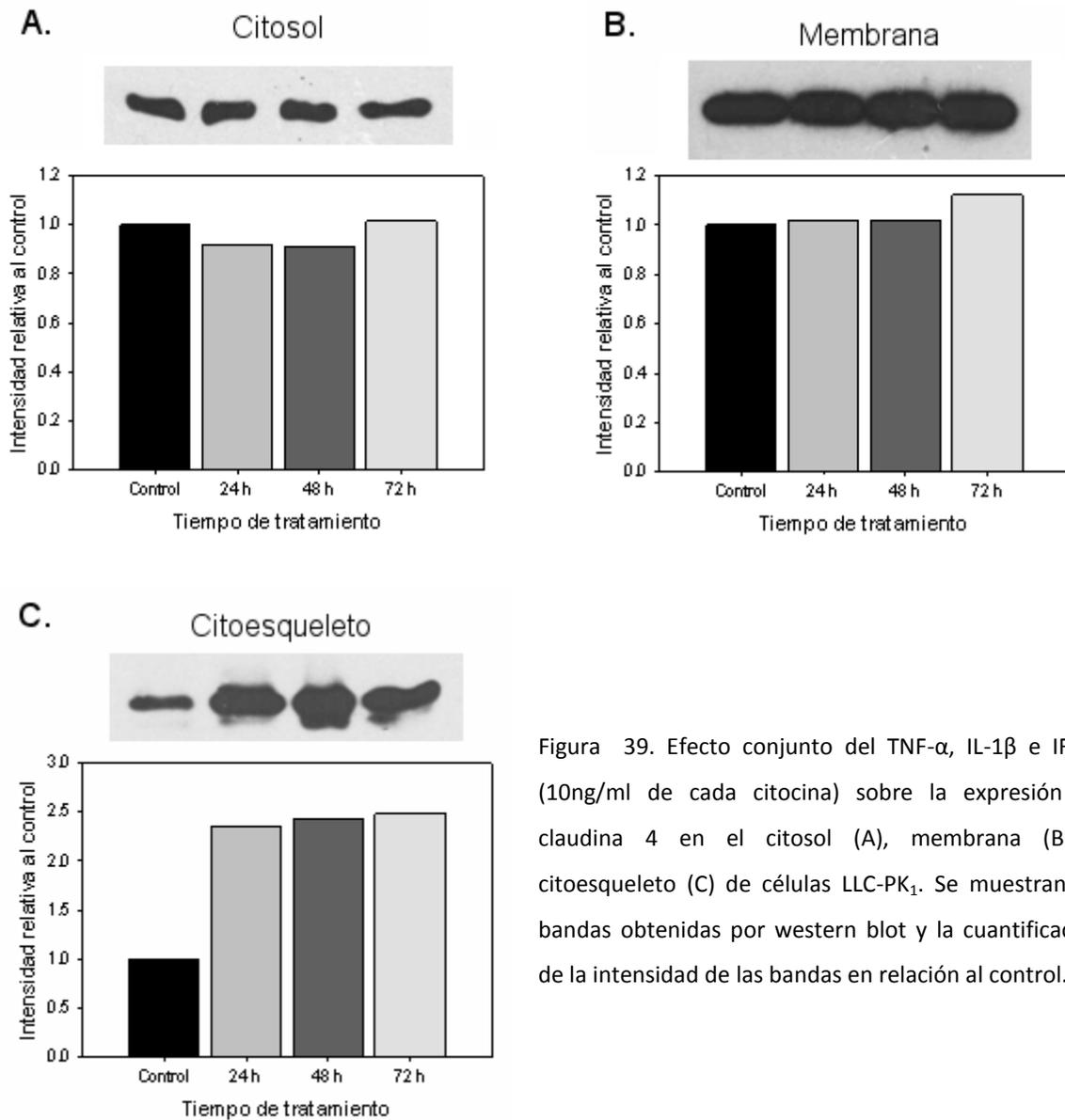


Figura 39. Efecto conjunto del TNF- α , IL-1 β e IFN- γ (10ng/ml de cada citocina) sobre la expresión de claudina 4 en el citosol (A), membrana (B) y citoesqueleto (C) de células LLC-PK₁. Se muestran las bandas obtenidas por western blot y la cuantificación de la intensidad de las bandas en relación al control.

En lo que respecta a claudina-5, no se detectó su expresión en las fracciones de citosol ni citoesqueleto. En la fracción de membrana, se observa que el tratamiento con las 3 citocinas en conjunto indujo una marcada disminución de la expresión de claudina-5 a las 24h de tratamiento (de alrededor del 60%), y suprimió su expresión a partir de las 48h (Figura 40).

Expresión de claudina-5

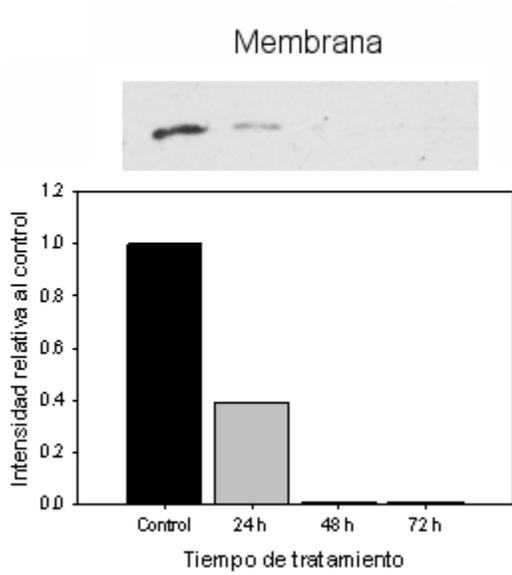


Figura 40. Efecto conjunto del TNF- α , IL-1 β e IFN- γ (10ng/ml de cada citocina) sobre la expresión de claudina 1 en la membrana de células LLC-PK₁. No se detectó expresión significativa de claudina 5 en las fracciones de citosol ni citoesqueleto. Se muestran las bandas obtenidas por western blot y la cuantificación de la intensidad de las bandas en relación al control.

DISCUSIÓN

Efecto de la concentración y el sitio de aplicación de las citocinas en la TER

Las células epiteliales juegan un papel crítico al separar compartimentos fisiológicamente distintos dentro de los órganos y sistemas. Las uniones estrechas son las estructuras encargadas del sellado intercelular, actuando como una barrera para el transporte paracelular de iones y solutos; estas uniones son estructuras dinámicas y están reguladas por diversos estímulos fisiológicos y patológicos⁽⁹⁰⁾.

Durante la reacción inflamatoria se liberan citocinas y quimiocinas que permiten el reclutamiento de células inmunes en los focos inflamatorios, pasando a través de epitelios y endotelios, por lo que debe ocurrir una apertura y resellado de las uniones intercelulares. La inflamación es normalmente un proceso reparador, seguido por una respuesta compensatoria anti-inflamatoria. En ocasiones, por falta de mecanismos compensatorios, esta reacción inflamatoria puede resultar exagerada, o mantenerse por periodos prolongados, dando lugar a cambios patológicos, ya que el aumento de la permeabilidad paracelular genera un incremento en la exposición de los tejidos a antígenos luminales (42, 45, 51).

Se ha reportado que la exposición a citocinas proinflamatorias reduce la integridad de la barrera epitelial y alteran algunas proteínas de las UE (45, 51). Como el efecto de las citocinas sobre las claudinas ha sido poco estudiado, y ya que estas proteínas juegan un papel fundamental en la función de barrera epitelial, se examinó el efecto de tres citocinas (TNF- α , IL-1 β e IFN- γ) sobre la TER (porque es un método confiable para evaluar la integridad de las uniones estrechas) y sobre la expresión y localización subcelular de los primeros 5 miembros de la familia de las claudinas en células LLC-PK₁ (un modelo celular epitelial normal).

Se observó el efecto de distintas concentraciones de citocinas. En el caso del TNF- α , IL-1 β e IFN- γ , la concentración de 10ng/ml es una concentración fisiológicamente relevante, y es además la concentración utilizada en muchos de los estudios que emplean dichas citocinas. Sin embargo, para determinar la concentración óptima para este modelo de estudio, se decidió probar el efecto de tres concentraciones distintas (5, 10 y 20ng/ml) sobre la TER.

En el tratamiento con TNF- α se observa una disminución de la TER que es más pronunciada a partir de la concentración de 10ng/ml y ya no hay diferencia significativa a los 20ng/ml. En los tratamientos con IL-1 β e IFN- γ se observó un incremento en la TER desde los 5ng/ml y no hay diferencias significativas en las otras concentraciones. Para facilidad del manejo de los experimentos, se decidió realizar las demás pruebas utilizando una concentración de 10ng/ml de cada citocina.

Ya que las células LLC-PK₁ forman un epitelio polarizado bien definido, la disponibilidad de receptores de las distintas citocinas podría estar restringida a la superficie apical o a la basolateral de las células, por lo que se procedió a analizar el efecto de las citocinas colocadas en el compartimento apical o en el basolateral de los insertos. Los resultados no mostraron diferencia significativa en la TER en los tratamientos con IL-1 β e IFN- γ , sin embargo en el tratamiento con TNF- α se observó una diferencia significativa, siendo más pronunciado el efecto de la citocina añadida de manera basolateral. Por esto, se decidió aplicar las citocinas de manera basolateral en los demás tratamientos.

Tratamiento con TNF- α

Posteriormente se analizó el efecto del TNF- α a distintos tiempos de tratamiento en la TER y en la expresión de claudinas. Se ha reportado para diversas líneas celulares que el tratamiento con TNF- α induce una disminución en la TER ^(57, 62, 65), lo cual concuerda con los resultados de este estudio, donde se observó que el tratamiento con TNF- α produce una disminución progresiva de la TER hasta llegar a un valor de alrededor del 50% del valor inicial a las 72h de tratamiento. A pesar de que el TNF- α puede inducir apoptosis, se ha observado en varios estudios que esta citocina media sus efectos sobre la permeabilidad paracelular por mecanismos independientes de apoptosis ⁽⁶¹⁾. Por otro lado, en otros estudios con la línea LLC-PK₁ se ha observado que el TNF- α no induce apoptosis a las concentraciones utilizadas en el presente trabajo ^(68, 69). Por lo tanto, la disminución observada en la TER podría atribuirse a cambios en la expresión y/o localización de las claudinas.

Las distintas claudinas cumplen diferentes funciones dentro de las UE, pudiendo agruparse en las formadoras de barrera (que hacen más fuertes las uniones) y las formadoras de canales, (que forman poros selectivos a aniones o cationes, haciendo más laxa la barrera paracelular) ⁽⁹⁶⁾.

Claudina-1 pertenece a las claudinas formadoras de barrera, incrementando la TER de las células y disminuyendo la permeabilidad paracelular, lo cual se ha observado en experimentos de sobreexpresión y silenciamiento ⁽⁹⁶⁾. En estudios utilizando ratones Knockout (KO) para esta proteína, se concluyó que claudina-1 es fundamental en las uniones de epitelios como el de la piel, ya que estos ratones mueren de deshidratación cutánea poco después de nacer ⁽⁹⁷⁾. En nuestro estudio se observó que el tratamiento con TNF- α conllevó a un aumento en la expresión de claudina-1 en las fracciones de citosol y citoesqueleto, pero no se observan cambios en la fracción de membrana, lo que concuerda con estudios previos realizados en la línea IEC-18 ⁽⁶¹⁾. Esto podría sugerir que el TNF- α induce la síntesis de claudina-1, probablemente como un mecanismo compensatorio ante los cambios que están disminuyendo la TER, sin embargo se requiere de algo más para que la proteína sintetizada pueda localizarse correctamente en la membrana celular. Una posible explicación sería alguna modificación postraduccional, pues se ha visto que la fosforilación induce la localización membranal o citosólica de las claudinas ^(37, 38). Ya que la claudina-1 no se redistribuye a la fracción membranal, se puede sugerir que no está contribuyendo a aumentar la TER, puesto que se requiere que las claudinas se ubiquen en la membrana para cumplir con su función de barrera.

Se observó también que este tratamiento parece inducir una redistribución de claudina-2 a la membrana plasmática, pues no se detectaba expresión significativa en el control, y se observa expresión desde las 24h de tratamiento. Se ha reportado en varias líneas celulares que el aumento en la expresión de claudina 2 induce una disminución de la TER sin afectarse el flujo paracelular de moléculas no cargadas ⁽⁹⁸⁾. Los estudios han demostrado que claudina-2 media este efecto induciendo la formación de canales paracelulares selectivos a cationes ⁽⁹⁶⁾. Esto indica que la disminución de la TER observada en el tratamiento con TNF- α de este estudio podría deberse, al menos en parte, a la redistribución de claudina-2 a la membrana y la subsecuente formación de canales de cationes.

A pesar de que claudina-3 se expresa en muchos tipos epiteliales, como en pulmón, piel, riñón, intestino y en endotelios, su función dentro de las UE aun no está muy clara. En un estudio con células MDCK se observó que claudina-3 actúa como formadora de barrera, incrementando la TER, pero que este efecto depende de los niveles de expresión de claudina-2 ⁽⁹⁹⁾. Por el contrario, varios estudios con otras líneas celulares sugieren que claudina-3 parece no tener efecto directo en la TER, o que su efecto puede ser fácilmente reemplazado por otras claudinas ^(100, 101), y en otros

trabajos se sugiere que claudina-3 podría influir más bien en la permeabilidad a moléculas no cargadas⁽¹⁰²⁾. En el presente trabajo se observó que el tratamiento con TNF- α indujo un aumento en la expresión de claudina-3 en citoesqueleto y membrana. Dado que se observó una disminución en la resistencia, se plantea que en este modelo de estudio, claudina-3, aunque se encuentra aumentada en membrana, no está contribuyendo a la función de barrera epitelial, al menos en cuanto a la permeabilidad de iones. Claudina-3 también podría estar contribuyendo a la barrera contra moléculas pequeñas no cargadas, pero en el presente trabajo no se evaluó dicho parámetro.

Claudina-4 es una proteína formadora de barrera. Se ha observado que su sobreexpresión incrementa la TER en varias líneas celulares y se ha propuesto que ejerce este efecto disminuyendo la permeabilidad a cationes⁽¹⁰⁰⁾, aunque también se ha sugerido que tiene un papel importante en la función de barrera contra moléculas pequeñas no cargadas⁽¹⁰²⁾. En este estudio se observó que el tratamiento con TNF- α aumentó la expresión de claudina-4 en citosol y citoesqueleto sin modificar la expresión en membrana. Aquí podría estar ocurriendo algo similar que con claudina-1, un aumento en la expresión de la proteína como mecanismo compensatorio, aunque no se está incorporando correctamente en la membrana celular.

Claudina-5 se expresa en varios tipos celulares epiteliales, y es un componente importante de muchos endotelios. Claudina-5 es ahora reconocida como la proteína más importante involucrada en mantener la función de la barrera hematoencefálica⁽¹⁰³⁾. Esta proteína se agrupa con las formadoras de barrera, contribuyendo al sellado de las UE. En varios tipos celulares se ha demostrado que su sobreexpresión disminuye el flujo paracelular y su silenciamiento lo incrementa⁽¹⁰⁴⁾. En este estudio se observó a claudina-5 únicamente en la membrana celular, y el tratamiento con TNF- α parece suprimir su expresión. Dado que esta claudina es formadora de barrera, es muy posible que la disminución en la TER observada con el tratamiento con TNF- α se deba en parte, tanto a la supresión de claudina-5 en la membrana, como al incremento de claudina-2.

Tratamiento con IL-1 β

En varias líneas celulares se ha reportado una disminución de la TER al ser expuestas a IL-1 β ^(72, 75, 76). Sin embargo en otros tipos celulares, como en queratinocitos humanos, se ha observado un

incremento en la TER al ser tratados con esta interleucina ⁽⁷⁷⁾. Esto muestra que la respuesta de los epitelios a las citocinas es compleja, y varía entre líneas celulares. En el presente trabajo se observó que la IL-1 β induce en las células LLC-PK₁ un incremento en la TER desde las 24h de tratamiento, alcanzando un máximo de alrededor de 30% a las 48h y posteriormente tiende a disminuir.

En cuanto a la expresión de claudinas formadoras de barrera, en el tratamiento con IL-1 β no se observaron cambios significativos en la expresión de claudina-1; claudina-4 presenta un ligero aumento en su expresión en membrana y citoesqueleto a las 72h de tratamiento, cuando la TER ya tendía a disminuir; con claudina-5 se observó en membrana una disminución a las 24h y posteriormente un aumento hasta sobrepasar el valor del control.

En cuanto a la claudina-2, formadora de canales de cationes, el tratamiento con IL-1 β induce un aumento en la expresión en citoesqueleto, sin modificar la expresión en citosol, y en la membrana no es detectable ni en el control ni en los tiempos de tratamiento.

Con claudina-3, se observó en las fracciones de citosol y citoesqueleto primero una disminución a las 24h y posteriormente un incremento, aunque en la fracción de membrana solo se ve un incremento a las 72h, cuando la TER ya había comenzado a disminuir.

De manera que, tomando en cuenta todo lo anterior, el efecto observado en la TER con el tratamiento con IL-1 β no parece correlacionar con las funciones reportadas para las claudinas estudiadas. Dado que las claudinas son una familia grande de proteínas y se ha mostrado que son determinantes en la selectividad del flujo paracelular, es posible que el efecto observado en la TER se deba a cambios en la expresión y/o localización de otros miembros de esta familia, no analizados en el presente trabajo.

Tratamiento con IFN- γ

En varios modelos de cultivo celular, el tratamiento con IFN- γ incrementa la permeabilidad paracelular, disminuyendo la TER ⁽⁷⁹⁻⁸²⁾. Sin embargo, se ha visto que en algunos tipos celulares, como las células del epitelio aéreo, el IFN- γ tiene propiedades antiinflamatorias y promueve la función de barrera ⁽⁴⁵⁾. En este estudio se observó un incremento en la TER desde las 24h (de más del 20%) con el tratamiento con IFN- γ que se mantiene a las 48 horas y posteriormente disminuye.

En cuanto al patrón de expresión de claudinas, se observa un aumento en la expresión de claudina-1 en membrana a las 24 y 48h de tratamiento, mientras que se observa una disminución en citosol y citoesqueleto, y los niveles de las tres fracciones se restablecen a las 72h. Esto sugiere que el tratamiento con IFN- γ induce la redistribución de claudina-1 a la membrana, lo que contribuye al aumento de la TER observado, aunque el efecto es transitorio.

También se observó con este tratamiento un aumento en la expresión de claudina-2 a las 72h en las fracciones de citosol y citoesqueleto, pero no se observa expresión en membrana ni en el control ni en ningún tiempo de tratamiento, por lo que ésta claudina no está contribuyendo para la función de barrera epitelial. Para el caso de claudina-3, se observó un aumento de la expresión en citosol, mientras que en membrana y citoesqueleto generó una disminución a las 24h y 48h y un aumento a las 72h.

La expresión de claudina-4 aumenta en citosol y citoesqueleto en el tratamiento con IFN- γ , pero no cambia la expresión en membrana, lo que podría indicar un aumento en la síntesis de la proteína, pero que ésta no se está redistribuyendo correctamente a la membrana, como se mencionó anteriormente, quizá debido a modificaciones post-traduccionales. Claudina-5 se detectó sólo en la fracción membranal, pero no se observaron cambios en su expresión con el tratamiento con IFN- γ .

Por lo tanto parece que sólo claudina-1 está contribuyendo al efecto observado en la TER al tratar a las células con IFN- γ .

Tratamiento conjunto con TNF- α , IL-1 β e IFN- γ

Debido a que los epitelios *in situ* no se encuentran expuestos a una sola citocina, sino a un conjunto de ellas, se realizó un tratamiento combinado con TNF- α , IL-1 β e IFN- γ para observar el efecto conjunto que producen. En el presente trabajo se observó que con el tratamiento conjunto, la TER se mantuvo en los niveles del control a las 24h, presentando posteriormente una disminución, de alrededor del 30% del valor inicial a las 72h de tratamiento.

El efecto en la TER observado en este tratamiento es parecido al producido por el TNF- α , sin embargo el efecto se observa a partir de las 48h y la disminución de la TER es menor en el

tratamiento conjunto que en el tratamiento individual, lo que nos indica que estas citocinas están presentando efectos antagónicos entre sí, aunque predominó el efecto del TNF- α .

Posteriormente se analizó la expresión y localización de claudinas con el tratamiento conjunto, y se observó un aumento en la expresión de claudina-1 en citosol y citoesqueleto, pero sin cambios en la expresión en membrana. Estos resultados son concordantes con otros estudios, donde al utilizar una combinación de estas mismas citocinas se observó en células Caco-2 que el tratamiento disminuye la función de barrera epitelial y aumenta la expresión de claudina-1, pero deslocalizada de la membrana celular ⁽⁹¹⁻⁹³⁾. Como se mencionó anteriormente, el aumento en la expresión de claudina-1 puede ser una especie de mecanismo compensatorio ante las alteraciones de las UE, pero al no ser incorporada correctamente a la fracción membranal, no contribuye a la función de barrera.

En cuanto a la expresión de claudina-2, se observó que el tratamiento conjunto indujo una disminución en citoesqueleto, sin afectar significativamente los niveles en citosol, pero a diferencia del tratamiento con TNF- α solo, en el tratamiento conjunto no se detectó expresión de claudina-2 en membrana. Dado que claudina -2 es formadora de canales de cationes, su ausencia de la fracción membranal podría en parte explicar por qué la disminución de la TER es menor en el tratamiento conjunto que en el individual con TNF- α .

Para claudina-3 se observó una disminución en la expresión en citoesqueleto y un aumento en membrana. Dado que el efecto observado en la TER fue una disminución, y no se ha reportado que claudina-3 sea formadora de canales de iones, parece que claudina-3 no está influyendo en la función de barrera en este modelo de estudio. Para claudina-4 se observó un aumento en la expresión en citoesqueleto, pero sin alterarse los niveles en membrana.

Finalmente, con el tratamiento conjunto se observó expresión de claudina-5 únicamente en la fracción membranal, en el control y en las 24 horas de tratamiento, pero se suprime su expresión a partir de las 48h de tratamiento. Esto correlaciona con el efecto observado en la TER, lo que sugiere que la ausencia de claudina-5 en membrana es la responsable, al menos en parte, de la disminución de la TER observada al tratar a las células con las tres citocinas.

CONCLUSIONES

- Los tratamientos con TNF- α , IL-1 β e IFN- γ alteran la función de barrera epitelial de las células LLC-PK1 y la expresión de claudinas en dichas células.
- El tratamiento con TNF- α indujo una disminución de la TER, asociada posiblemente a la supresión de la expresión de claudina-5 en la fracción membranal, y a la redistribución de claudina-2 a dicha fracción celular.
- En el tratamiento con IL-1 β se observa un incremento en la TER. Aunque este tratamiento induce cambios en la expresión y localización de varias claudinas, el aumento en la TER no correlaciona con dichos cambios, por lo que éste puede deberse a cambios en otras proteínas no analizadas en el presente estudio.
- El tratamiento con IFN- γ indujo un incremento en la TER, asociado con un aumento en la expresión de claudina-1 en la membrana celular.
- En el tratamiento conjunto con las tres citocinas, la TER se mantuvo alrededor del nivel del control hasta las 24h de tratamiento, y posteriormente disminuye. Este efecto parece deberse a la expresión de claudina-5 en membrana, que se observa en el control y a las 24h de tratamiento, pero se suprime a partir de las 48h de tratamiento.

Referencias:

1. Alberts, B., Jhonson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. 2004. *Biología Molecular de la Célula*. 4ª edición. Ediciones Omega. España. 1463pp.
2. Gupta, I.R. and Ryan, A.K.. 2010. Claudins: unlocking the code to tight junction function during embryogenesis and in disease. *Clin Genet*. 77(4):314-25.
3. Lal-Nag, M. and Morin, P.J. 2009. The claudins. *Genome Biol*. 10(8):235.
4. Zavala-Zendejas, V. y Rendón-Huerta, E. 2008. Alteración de la integridad de las uniones estrechas en el desarrollo del cáncer. El papel de las claudinas. *Bioquímica*. 33(1):19-29
5. Anderson, J.M. 2001. Molecular Structure of Tight Junctions and Their Role in Epithelial Transport. *News Physiol. Sci*. 16: 126-130
6. Cavey, M. and Lecuit, T. 2009. Molecular Bases of Cell–Cell Junctions Stability and Dynamics. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1:a002998
7. Niessen, C.M. 2007. Tight Junctions/Adherens Junctions: Basic Structure and Function. *Journal of Investigative Dermatology*. 127: 2525–2532
8. Klaus Ebnet, K. 2008. Organization of multiprotein complexes at cell–cell junctions. *Histochem Cell Biol*. 130:1–20
9. Hartsock, A., and Nelson, W.J. 2008. Adherens and Tight Junctions: Structure, Function and Connections to the Actin Cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta*. 2008 March ; 1778(3): 660–669.
10. Green, K.J. and Jones, J.C R. 1996. Desmosomes and hemidesmosomes: structure and function of molecular components. *FASEB J*. 10: 871-881
11. Delva, E., Tucker, D.K., Kowalczyk, A.P. 2009. The Desmosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1:a002543
12. Borradori, L. y Sonnenberg, A. 1999. Structure and Function of Hemidesmosomes: More Than Simple Adhesion Complexes. *J Invest Dermatol*. 112: 411-418
13. Goodenough, D.A. and Paul, D.L. 2009. Gap Junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1:a002576
14. Giepmans, B.N.G. 2004. Gap junctions and connexin-interacting proteins. *Cardiovascular Research*. 62 :233– 245
15. Alexander, D.B., Goldberg, G.S. 2003. Transfer of biologically important molecules between cells through gap junction channels. *Curr Med Chem*, 10: 2045-58.

16. Singh, A.B., A. Sharma y P. Dhawan. 2010. Claudin family of proteins and cancer: an overview. *J Oncol.* 2010:541957.
17. Furuse, M. 2010. Molecular Basis of the Core Structure of Tight Junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2:a002907
18. Balda, M.S. and Matter, K. 2008. Tight junctions at a glance. *Journal of Cell Science.* 121: 3677-3682
19. Chiba, H., M. Osanai, M. Murata, T. Kojima y N. Sawada. 2008. Transmembrane proteins of tight junctions. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1778: 588-600
20. Nusrat, A., Turner, J.R. and Madara, J.L. 2000. Molecular Physiology and Pathophysiology of Tight Junctions IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 279: G851–G857
21. Angelow, S., R. Ahlstrom y A. Yu. 2008. Biology of claudins. *Am J Physiol Renal Physiol.* 295: F867-F876
22. Green, K. J., Getsios, S., Troyanovsky, S. and Godsel, L.M. 2010. Intercellular Junction Assembly, Dynamics, and Homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2:a000125
23. Feldman, G.J., Mullin, J.M., Ryan, M.P. 2005. Occludin: Structure, function and regulation. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 57: 883– 917
24. Van Itallie, C.M., Fanning, A.S., Holmes, J. and Anderson, J.M. 2010. Occludin is required for cytokine-induced regulation of tight junction barriers. *Journal of Cell Science.* 123(16): 2844-2852
25. González-Mariscal, L., Betanzos, A., Nava, P. and Jaramillo B.E. 2003. Tight junction proteins. *Progress in Biophysics & Molecular Biology.* 81: 1–44
26. Ebnet, K., Suzuki, A., Ohno, S. and Vestweber, D. 2004. Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions?. *Journal of Cell Science.* 117(1): 19-29
27. Förster, C. 2008. Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochem Cell Biol.* 130: 55–70
28. Bazzoni, G. 2003. The JAM family of junctional adhesion molecules. *Current Opinion in Cell Biology.* 15: 525–530
29. Fanning, A., Mitic, L.L. and Anderson, J.M. 1999. Transmembrane Proteins in the Tight Junction Barrier. *J Am Soc Nephrol.* 10: 1337–1345.
30. Ikenouchi, J., Sasaki, H., Tsukita, S., Furuse, M. and Tsukita, S. 2008. Loss of Occludin Affects Tricellular Localization of Tricellulin. *Molecular Biology of the Cell.* 19: 4687–4693

31. Krug, S.M., Amasheh, S., Richter, J.F., Milatz, S., Günzel, D., Westphal, J.K., Huber, O., Schulzke, J.D. and Fromm, M. 2009. Tricellulin Forms a Barrier to Macromolecules in Tricellular Tight Junctions without Affecting Ion Permeability. *Molecular Biology of the Cell*. 20: 3713–3724
32. Ikenouchi, J., Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., Tsukita, S. and Tsukita, S. 2005. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *Journal of Cell Biology*. 171(6): 939–945
33. Westphal, J.K., Dörfel, M.J., Krug, S.M., Cording, J.D., Piontek, J., Blasig, I.E., Tauber, R., Fromm, M. and Huber, O. 2010. Tricellulin forms homomeric and heteromeric tight junctional complexes. *Cell. Mol. Life Sci*. 67: 2057–2068
34. Will, C., Fromm, M. and Müller, D. 2008. Claudin Tight Junction Proteins: Novel Aspects in Paracellular Transport. *Peritoneal Dialysis International*. 28(6): 577–584
35. Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K. and Tsukita, S. 1998. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol*. 141: 1539–1550
36. Turksen, K. and Troy, T.C. 2004. Barriers built on claudins. *Journal of Cell Science*. 117 (12): 2435–2447
37. Anderson, J.M. y C.M. Van Itallie. 2009. Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1:a002584
38. Findley, M.K. and Koval, M. 2009. Regulation and roles for claudin-family tight junction proteins. *IUBMB Life*. 61(4): 431–437
39. Hewitt, K., R. Agarwal y P. Morin. 2006. The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. *BMC Cancer*. 6:186
40. Bauer, H., Zweimueller-Mayer, J., Steinbacher, P., Lametschwandtner, A. and Bauer, H.C. 2010. The Dual Role of Zonula Occludens (ZO) Proteins. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 1-11
41. Funke, L., Dakoji, S. and Bredt, D.S. 2005. Membrane-Associated Guanylate Kinases Regulate Adhesion and Plasticity at Cell Junctions. *Annu. Rev. Biochem*. 74: 219–45
42. Abbas A. K., Litchman A. H. and Pillai, S. 2008. Inmunología celular y molecular. 6ª edición. *ELSEVIER*. España. 566 pp
43. Sprague, A.H. and Khalil, R.A. 2009. Inflammatory Cytokines in Vascular Dysfunction and Vascular Disease. *Biochem Pharmacol*. 78(6): 539–552

44. Marcela Aguilar Yepes, Marisol Rojas Moreno. 2008. *Relación entre las concentraciones de citocinas factor de necrosis tumoral-alfa, interleucina 1, interleucinas 6 (FNT- α , IL-1, IL-6) y la protein C reactiva ultrasensible (PCR-us) en pacientes con sepsis*. Tesis. Pontificia Universidad Javeriana. Bogota D.C.
45. Capaldo C. y A. Nusrat. 2009. Cytokine regulation of tight junctions. *Biochim Biophys Acta*. 1788(4):864-71.
46. Zhang, JM. and An, J. 2007. Cytokines, Inflammation and Pain. *Int Anesthesiol Clin*. 45(2): 27–37
47. Kindt, T.J., Goldsby, R.A. y Osborne, B.A. 2007. *Inmunología de Kuby*. 6ª edición. McGraw-Hill Interamericana. México. 574pp
48. Dinarello, C. A. 2000. Proinflammatory Cytokines. *Chest*. 118:503-508
49. Al-Sadi, R., Boivin, M. and Ma, T. 2009. Mechanism of cytokine modulation of epithelial tight junction barrier. *Frontiers in Bioscience*. 14: 2765-2778.
50. Utech M., R. Mennigen y M. Bruewer. 2010. Endocytosis and recycling of tight junction proteins in inflammation. *J Biomed Biotechnol*. 2010:484987.
51. McKay D. y A. Baird. 1999. Cytokine regulation of epithelial permeability and ion transport. *Gut*. 44(2):283-9.
52. Tsujimoto, H., Ono, S., Ichikura, T., Matsumoto, Y., Yamamoto, J. and Hase, K. 2010. Roles of inflammatory cytokines in the progression of gastric cancer: friends or foes?. *Gastric Cancer*. 13: 212–221
53. Al-Sadi, R.M. and Ma, T.Y. 2007. IL-1beta causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *J Immunol*. 178(7): 4641-4649
54. Sheikh, S. Z., Matsuoka, K., Kobayashi, T., Li, F., Rubinas, T. and Plevy, S. E. 2010. Cutting Edge: IFN- γ Is a Negative Regulator of IL-23 in Murine Macrophages and Experimental Colitis. *J Immunol*. 184(8): 4069–4073
55. Goldblum, S.E., Ding, X. and Campbell-Washington, J. 1993. TNF-alpha induces endothelial cell F-actin depolymerization, new actin synthesis, and barrier dysfunction. *Am J Physiol*. 264(4 Pt 1): C894-905.
56. Blum, M.S., Toninelli, E., Anderson, J.M., Balda, M.S., Zhou, J., O'Donnell, L., Pardi, R. and Bender, J.R. 1997. Cytoskeletal rearrangement mediates human microvascular endothelial tight junction modulation by cytokines. *Am J Physiol*. 273(1 Pt 2): H286-294

57. Ma, T.Y., Iwamoto, G.K., Hoa, N.T., Akotia, V., Pedram, A., Boivin, M.A. and Said H.M. 2004. TNF-alpha-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF-kappa B activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 286(3): G367-76
58. Mashukova, A., Wald, F.A. and Salas, P.J. 2011. Tumor necrosis factor alpha and inflammation disrupt the polarity complex in intestinal epithelial cells by a posttranslational mechanism. *Mol Cell Biol.* 31(4): 756-765.
59. Cui, W., Li, L.X., Sun, C.M., Wen, Y., Zhou, Y., Dong, Y.L. and Liu, P. 2010. Tumor necrosis factor alpha increases epithelial barrier permeability by disrupting tight junctions in Caco-2 cells. *Braz J Med Biol Res.* 43(4): 330-337
60. Li, N., Gu, L., Qu, L., Gong, J., Li, Q., Zhu, W., and Li, J. 2010. Berberine attenuates pro-inflammatory cytokine-induced tight junction disruption in an in vitro model of intestinal epithelial cells. *Eur J Pharm Sci.* 40(1):1-8.
61. Poritz, L.S., Harris, L.R., Kelly, A.A. and Koltun, W.A. 2011. Increase in the Tight Junction Protein Claudin-1 in Intestinal Inflammation. *Dig Dis Sci.* [Epub ahead of print]
62. Kondo, J., Sato, F., Kusumi, T., Liu, Y., Motonari, O., Sato, T. and Kijima, H. 2008. Claudin-1 expression is induced by tumor necrosis factor- α in human pancreatic cancer cells. *International Journal of Molecular Medicine.* 22: 645-649
63. Poritz, L.S., Garver, K.I., Tilberg, A.F. and Koltun, W.A. 2004. Tumor necrosis factor alpha disrupts tight junction assembly. *J Surg Res.* 116(1):14-18
64. Amasheh, M., Fromm, A., Krug, S.M., Amasheh, S., Andres, S., Zeitz, M., Fromm, M. and Schulzke, J.D. 2010. TNFa-induced and berberine-antagonized tight junction barrier impairment via tyrosine kinase, Akt and NFkB signaling. *J Cell Sci.* 123(23): 4145- 4155
65. Avelaira, C.A., Lin, C.M., Abcouwer, S.F., Ambrósio, A.F. and Antonetti, D.A. 2010. TNF- α signals through PKC ζ /NF- κ B to alter the tight junction complex and increase retinal endothelial cell permeability. *Diabetes.* 59(11): 2872-2882
66. Ozaki, H., Ishii, K., Horiuchi, H., Arai, H., Kawamoto, T., Okawa, K., Iwamatsu, A. and Kita, T. 1999. Cutting edge: combined treatment of TNF-alpha and IFN-gamma causes redistribution of junctional adhesion molecule in human endothelial cells. *J Immunol.* 163(2): 553-557
67. Grant-Tschudy, K.S. and Wira, C.R. 2005. Paracrine mediators of mouse uterine epithelial cell transepithelial resistance in culture. *J Reprod Immunol.* 67(1-2): 1-12

68. Mullin, J.M. and Snock, K.V. 1990. Effect of tumor necrosis factor on epithelial tight junctions and transepithelial permeability. *Cancer Res.* 50(7): 2172-2176
69. Marano, C.W., Laughlin, K.V., Russo, L.M., Peralta-Soler, A. and Mullin, J.M. 1993. Long-term effects of tumor necrosis factor on LLC-PK1 transepithelial resistance. *J Cell Physiol.* 157(3): 519-527
70. Song, H.L., Lv, S. and Liu, P. 2009. The roles of tumor necrosis factor-alpha in colon tight junction protein expression and intestinal mucosa structure in a mouse model of acute liver failure. *BMC Gastroenterol.* 9:70
71. Marchiando, A.M., Shen, L., Graham, W.V., Weber, C.R., Schwarz, B.T., Austin, J.R., Raleigh, D.R., Guan, Y., Watson, A.J., Montrose, M.H. and Turner, J.R. 2010. Caveolin-1-dependent occludin endocytosis is required for TNF-induced tight junction regulation in vivo. *J Cell Biol.* 189(1): 111-126
72. Kimura, K., Teranishi, S. and Nishida, T. 2009. Interleukin-1beta-induced disruption of barrier function in cultured human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 50(2): 597-603
73. Duffy, H.S., John, G.R., Lee, S.C., Brosnan, C.F. and Spray, D.C. 2000. Reciprocal regulation of the junctional proteins claudin-1 and connexin43 by interleukin-1beta in primary human fetal astrocytes. *J Neurosci.* 20(23): RC114
74. Rozlomiya, V.L. and Markov, A.G. 2010. Effect of interleukin-1 β on the expression of tight junction proteins in the culture of HaCaT keratinocytes. *Bull Exp Biol Med.* 149(3): 280-283
75. Abe, T., Sugano, E., Saigo, Y. and Tamai, M. 2003. Interleukin-1beta and barrier function of retinal pigment epithelial cells (ARPE-19): aberrant expression of junctional complex molecules. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44(9): 4097-4104
76. Lapointe, T.K., O'Connor, P.M., Jones, N.L., Menard, D. and Buret, A.G. 2010. Interleukin-1 receptor phosphorylation activates Rho kinase to disrupt human gastric tight junctional claudin-4 during Helicobacter pylori infection. *Cell Microbiol.* 12(5): 692-703
77. Kirschner, N., Poetzl, C., Von den Driesch, P., Wladykowski, E., Moll, I., Behne, M.J. and Brandner, J.M. 2009. Alteration of tight junction proteins is an early event in psoriasis: putative involvement of proinflammatory cytokines. *Am J Pathol.* 175(3): 1095-1106
78. Youakim, A. and Ahdieh, M. 1999. Interferon-gamma decreases barrier function in T84 cells by reducing ZO-1 levels and disrupting apical actin. *Am J Physiol.* 276(5 Pt 1): G1279-1288

79. Bruewer, M., Luegering, A., Kucharzik, T., Parkos, C.A., Madara, J.L., Hopkins, A.M. and Nusrat A. 2003. Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *J Immunol.* 171(11): 6164-6172
80. Bruewer, M., Utech, M., Ivanov, Al., Hopkins, A.M., Parkos, C.A. and Nusrat, A. 2005. Interferon-gamma induces internalization of epithelial tight junction proteins via a macropinocytosis-like process. *FASEB J.* 19(8): 923-933
81. Boivin, M.A., Roy, P.K., Bradley, A., Kennedy, J.C., Rihani, T. and Ma, T.Y. 2009. Mechanism of interferon-gamma-induced increase in T84 intestinal epithelial tight junction. *J Interferon Cytokine Res.* 29(1): 45-54
82. Willemsen, L.E., Hoetjes, J.P., Van Deventer, S.J. and Van Tol, E.A. 2005. Abrogation of IFN-gamma mediated epithelial barrier disruption by serine protease inhibition. *Clin Exp Immunol.* 142(2):275-284
83. Minagar, A., Long, A., Ma, T., Jackson, T.H., Kelley, R.E., Ostanin, D.V., Sasaki, M., Warren, A.C., Jawahar, A., Cappell, B. and Alexander, J.S. 2003. Interferon (IFN)-beta 1a and IFN-beta 1b block IFN-gamma-induced disintegration of endothelial junction integrity and barrier. *Endothelium.* 10(6):299-307
84. Feng, J., Ito, M., Ichikawa, K., Isaka, N., Nishikawa, M., Hartshorne, D.J. and Nakano, T. 1999. Inhibitory phosphorylation site for Rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase. *J Biol Chem.* 274(52): 37385-37390
85. Tedelind, S., Ericson, L.E., Karlsson, J.O. and Nilsson, M. 2003. Interferon-gamma down-regulates claudin-1 and impairs the epithelial barrier function in primary cultured human thyrocytes. *Eur J Endocrinol.* 149(3): 215-221
86. Ahdieh, M., Vandenbos, T. and Youakim, A. 2001. Lung epithelial barrier function and wound healing are decreased by IL-4 and IL-13 and enhanced by IFN-gamma. *Am J Physiol Cell Physiol.* 281(6):C2029-2038
87. Coyne, C.B., Vanhook, M.K., Gambling, T.M., Carson, J.L., Boucher, R.C. and Johnson, L.G. 2002. Regulation of airway tight junctions by proinflammatory cytokines. *Mol Biol Cell.* 13(9): 3218-3234
88. Mankertz, J., Tavalali, S., Schmitz, H., Mankertz, A., Riecken, E. O., Fromm, M., and Schulzke, J. D. 2000. Expression from the human occludin promoter is affected by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma. *J Cell Sci.* 113: 2085–2090

89. Baker, O.J., Camden, J.M., Redman, R.S., Jones, J.E., Seye, C.I., Erb, L. and Weisman, G.A. 2008. Proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma alter tight junction structure and function in the rat parotid gland Par-C10 cell line. *Am J Physiol Cell Physiol.* 295(5): C1191-201
90. Patrick, D.M., Leone, A.K., Shellenberger, J.J., Dudowicz, K.A. and King, J.M. 2006. Proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma modulate epithelial barrier function in Madin-Darby canine kidney cells through mitogen activated protein kinase signaling. *BMC Physiol.* 6:2.
91. Han, X., Fink, M.P. and Delude, R.L. 2003. Proinflammatory cytokines cause NO*-dependent and -independent changes in expression and localization of tight junction proteins in intestinal epithelial cells. *Shock.* 19(3): 229-237
92. Sappington, P.L., Han, X., Yang, R., Delude, R.L. and Fink, M.P. 2003. Ethyl pyruvate ameliorates intestinal epithelial barrier dysfunction in endotoxemic mice and immunostimulated caco-2 enterocytic monolayers. *J Pharmacol Exp Ther.* 304(1): 464-476
93. Costantini, T.W., Deree, J., Loomis, W., Putnam, J.G., Choi, S., Baird, A., Eliceiri, B.P., Bansal, V. and Coimbra, R. 2009. Phosphodiesterase inhibition attenuates alterations to the tight junction proteins occludin and ZO-1 in immunostimulated Caco-2 intestinal monolayers. *Life Sci.* 84(1-2): 18-22
94. Skrovanek, S., Valenzano, M.C., and Mullin, J.M. 2007. Restriction of sulfur-containing amino acids alters claudin composition and improves tight junction barrier function. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 293: R1046-R1055
95. Saunders, M. 2009. Transplacental transport of nanomaterials. *WIREs: Nanomed Nanobiotech.* 1(6): 671-684
96. Mankertz, J., Amasheh, M., Krug, S.M., Fromm, A., Amasheh, S., Hillenbrand, B., Tavalali, S., Fromm, M. and Schulzke, J.D. 2009. TNFalpha up-regulates claudin-2 expression in epithelial HT-29/B6 cells via phosphatidylinositol-3-kinase signaling. *Cell Tissue Res.* 336(1):67-77
97. Furuse, M., Hata, M., Furuse, K., Yoshida, Y., Haratake, A., Sugitani, Y., Noda, T., Kubo, A. and Tsukita, S. 2002. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol.* 156:1099-1111

98. Amasheh, S., Meiri, N., Gitter, A.H., Schöneberg, T., Mankertz, J., Schulzke, J.D. and Fromm, M. 2002. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci.* 115(Pt 24):4969-76.
99. Milatz, S., Krug, S.M., Rosenthal, R., Günzel, D., Müller, D., Schulzke, J.D., Amasheh, S. and Fromm, M. 2010. Claudin-3 acts as a sealing component of the tight junction for ions of either charge and uncharged solutes. *Biochim Biophys Acta.* 1798(11):2048-57
100. Ikari, A., Atomi, K., Takiguchi, A., Yamazaki, Y., Hayashi, H., Hirakawa, J. and Sugatani, J. 2012. Enhancement of cell-cell contact by claudin-4 in renal epithelial madin-darby canine kidney cells. *J Cell Biochem.* 113(2):499-507
101. Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H. and Tsukita, S. 2001. Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin–Darby canine kidney I cells. *J. Cell Biol.* 153:263–272.
102. Michikawa, H., Fujita-Yoshigaki, J. and Sugiya, H. 2008. Enhancement of barrier function by overexpression of claudin-4 in tight junctions of submandibular gland cells. *Cell Tissue Res.* 334(2):255-64
103. Kashiwamura, Y., Sano, Y., Abe, M., Shimizu, F., Haruki, H., Maeda, T., Kawai, M. and Kanda, T. 2011. Hydrocortisone enhances the function of the blood-nerve barrier through the up-regulation of claudin-5. *Neurochem Res.* 36(5):849-55
104. Helms, H.C., Waagepetersen, H.S., Nielsen, C.U. and Brodin, B. 2010. Paracellular tightness and claudin-5 expression is increased in the BCEC/astrocyte blood-brain barrier model by increasing media Buffer capacity during growth. *AAPS J.* 12(4):759-770

ANEXOS

Medios y Reactivos utilizados

Medio de cultivo α -MEM

Disolver un sobre del medio en aproximadamente 800 mL de agua

Adicionar 2 g de NaHCO₃ y disolver

Ajustar a pH = 7.4

Levar a 1 L de volumen con agua

Esterilizar por filtración

Suplementos para el medio de cultivo

Por cada 100 mL de medio ALFA-MEM solo adicionar:

1.0 mL de L-Glutamina de GIBCO 200 mM (2mM)

1.0 mL de Penicilina/Estreptomicina de GIBCO 10,000U/mL/10,000 μ g/mL (100U/mL/100 μ g/mL)

10.0 mL de Suero Fetal Bovino de GIBCO (10%)

PBS

Pesar 9.6 g de PBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) de GIBCO

Disolver en 900 mL de agua

Ajustar el pH a 7.5

Aforar con ddH₂O, esterilizar por filtración y guardar en refrigeración.

Buffer A

- 0.242 g de Tris base (PM = 121.14 g/mol, C₄H₁₁NO₃) de SIGMA (20 mM)
- 4.506 g de Dextrosa Anhidra (PM = 180.16 g/mol, C₆H₁₂O₆) de SIGMA (0.25 M)

- 0.38 g de EGTA (PM = 380.4 g/mol, C₁₄H₂₄N₂O₁₀) de SIGMA (10 mM)
- 0.058 g de EDTA (PM = 292.2 g/mol, C₁₀H₁₆N₂O₈) de SIGMA (2 mM)

Disolver los compuestos en 50 mL de agua y ajustar el pH a 7.5

Aforar a 100 mL con agua

Almacenar en Refrigeración

Buffer de Lisis

- 0.8766 g de NaCl (150 mM)
- 0.6057 g de Tris base (PM = 121.14 g/mol, C₄H₁₁NO₃) de SIGMA (50 mM)
- 0.038 g de EGTA (PM = 380.4 g/mol, C₁₄H₂₄N₂O₁₀) de SIGMA (1 mM)
- 0.029 g de EDTA (PM = 292.2 g/mol, C₁₀H₁₆N₂O₈) de SIGMA (1 mM)
- 1.0 mL de IGEPAL (1%)
- 1.0 mL de Solución de Desoxicolato de Sodio al 10% (0.1%)
- 0.1 g de Duodecil Sulfato de Sodio (SDS) (0.1%)

Disolver los compuestos y ajustar el pH

Aforar a 100 mL con agua

Almacenar en Refrigeración

Inhibidores para Buffer A y Buffer de Lisis

Antes de emplear adicionar los siguientes inhibidores, por cada mL de Buffer:

- Leupeptina (20 μ g/mL): 4 μ L de la solución 5 mg/mL
- Coctail de Inhibidores de Fosfatasas I de SIGMA (dil 1:100): 10 μ L
- Coctail de Inhibidores de Fosfatasas II de SIGMA (dil 1:100): 10 μ L
- Inhibidor de Tripsina de SIGMA (1mg/mL): 1 mg
- Aprotinina (10 μ g/mL): 10 μ L de la solución 1 mg/mL

Buffer de Laemli 4X

- 20 mL de SDS al 10% (4%)
- 12.5 mL de Tris 0.5 M pH = 6.8 (0.125M)
- 10 mL de Glicerol (20%)
- 0.02 g de Azul de Bromofenol (0.04%)

Disolver y aforar a 50 mL

Almacenar en congelación

Acrilamida 30.8%

- 30 g de Acrilamida (BIO-RAD) (30%)
- 0.8 g de Bis N, N'- metilen bis acrilamida (BIO-RAD) (0.8%)

Disolver poco a poco la acrilamida en 50 mL de ddH₂O

Posteriormente disolver la bis acrilamida.

Llevar a 100 mL con ddH₂O y guardar en refrigeración

Tris 1.5 M

Disolver 18.17g de Tris en 50 mL de agua

Ajustar el pH a 8.8

Aforar a 100mL

Tris 0.5 M

Disolver 6.056g de Tris en 50 mL de agua

Ajustar el pH a 6.8

Aforar a 100mL

Buffer para Electroforesis 1X

- 3.0325 g de Tris (25 mM)
- 14.4125 g de Glicina (192 mM)
- 1 g de SDS (0.1%)

Disolver en 700mL de agua

Ajustar el pH a 8.3

Aforar a 1L

Buffer de Transferencia

- 3.03 g de Tris (25 mM)
- 14.4 g de Glicina (192 mM)
- 200 mL de Metanol (20%)

Disolver y aforar a 1L

Guardar en refrigeración.

TBS 1X

- 2.423 g de Tris (20 mM)
- 8 g de NaCl (136 mM)

Disolver en 700mL

Ajustar el pH a 7.6

Aforar con ddH₂O y guardar en refrigeración.

TTBS 1X

Por cada 1L de TBS 1X, adicionar 1 mL de Tween 20 (0.1%)