



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Carrera de Biología

**EXPRESIÓN DE CLAUDINAS DURANTE LA
PROLIFERACIÓN Y LA DIFERENCIACIÓN DE LOS
QUERATINOCITOS CORNEALES RCE1 (5T5).**

TESIS

Que para obtener el título de Biólogo

Presenta

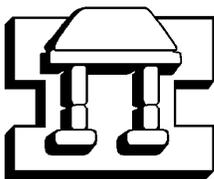
María Teresa Ortiz Melo

Director de Tesis

Dr. Federico Castro
Muñoz Ledo

Sinodales

Biol. José del Carmen Benítez F.
M. en C. Martha Ofelia Salcedo A.
Dr. Elías Piedra Ibarra
M. en C. Irma Elena Dueñas G.



IZTACALA

Los Reyes Iztacala, Edo. de México, 2009



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.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis papás, porque siempre me han apoyado en todo lo que decido hacer. Porque gracias a ustedes puedo alcanzar este primer gran sueño y con la seguridad que me han dado, confío que vendrán muchos más.

AGRADECIMIENTOS

A mi papá por enseñarme a maravillarme de las cosas y a ver la vida a través de los ojos de la Biología. Muchas gracias por permitirme ser tu amiga y colega.

A mi mamá por estar siempre dispuesta a escuchar mis enojos y lamentos. Gracias por enseñarme que las cosas se deben hacer bien y con empeño.

A mis hermanos Gerardo y Sandra, por su ayuda, ocurrencias, discusiones, apoyo y demás singularidades que hacen de la cotidianidad algo especial.

A mis abuelos Mari, Pepe, Matilde y Adolfo, porque de ustedes he aprendido muchas cosas. Gracias por preocuparse por mi bienestar y por ser mis abuelos, los cuatro son muy especiales para mí.

A Nelly Martínez, por llegar a mi vida, por quedarte y por todos los regaños y llamadas de atención que no me dejan perderme. Gracias por estar siempre para mí, por ayudarme a ser una persona con decisión y confianza en mi misma, por retarme a ser mejor cada día. Gracias por todo tu apoyo y paciencia.

A Marisol Martínez por creer en mí de la manera en que lo haces, esto ha sido clave para mí. Gracias Mari.
Gracias también a toda la familia Martínez Reyes, y demás integrantes, que me abrieron la puerta de su casa y me han brindado su cariño y apoyo.

A Eber Gómez, por rescatarme no sólo de una insolación, sino de mi misma, por ayudarme a ser más fuerte. Por ser mucho más que mi compañero de al lado, gracias por ser mi colega, por lo que me has enseñado. Y porque a pesar de ser un fuerte competidor, eres mi mejor amigo.

A Rita, Ariadna, Lupita y Liliana, por su amistad. Me encantó que hayamos formado una familia. Las clases, las prácticas y la escuela en general, no hubieran sido igual sin ustedes. Gracias por formar parte del "Equipi" y quedarse conmigo.

A Marisol de la Mora, por aparecer siempre en el momento más indicado para demostrarme que las cosas sí se pueden hacer en el momento deseado, sólo es cosa de tomar la decisión y poner manos a la obra.

A Josefina Vázquez y Rafael Quintanar, por ser mis maestros de la primera materia del primer día de clases del primer semestre de la carrera, por recibirme en su laboratorio y por seguir siendo mis maestros y amigos.

A Martha y Sergio González por que con sus enseñanzas me hicieron voltear la mirada hacia la Biología Celular. Gracias también por su amistad, cariño y todo el apoyo.

A Elías Piedra por la entrañable amistad. Por los consejos y conversaciones, por esa admiración tan contagiosa por los procesos biológicos. Gracias por la fe y motivación.

A Tzasná y Margarita, por los llamados de atención. Pero sobre todo por brindarme un lugar acogedor en su laboratorio y corazón. Gracias por todo su apoyo.

A Erika, Columba, Clara y Rocío, por brindarme su confianza, amistad y apoyo. Por todas las facilidades, enseñanzas y ayuda para la realización de la tesis y sobre todo por crear un ambiente amigable y comfortable en el laboratorio.

Por supuesto, al Dr. Federico Castro, primero que nada, por recibirme en su laboratorio, por su sinceridad, comprensión y apoyo. Gracias por ser un buen maestro, tutor y amigo. Muchas gracias por la confianza y por hacer del trabajo un reto emocionante y divertido.

Gracias a todos ustedes y a tantas personas que estuvieron implicadas de una u otra manera en que pudiera conseguir este logro.

Gracias por marcar mi vida, espero que continúen siempre en ella.

Este trabajo fué financiado en parte a través del donativo número 54249 otorgado al Dr
Federico Castro Muñoz Ledo por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
(CONACyT)

Esta Tesis de Investigación fue realizada en el **Laboratorio No. 28** del **Departamento de Biología Celular** del **Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV)**.

Este trabajo fue financiado en parte por el apoyo Número 104801 del Programa de Apoyo para Investigadores Nacionales para el Fortalecimiento de Actividades de Tutoría y Asesoría de Estudiantes de Nivel Licenciatura del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
JUSTIFICACIÓN	9
OBJETIVOS	11
Objetivo general.....	11
Objetivos particulares	11
MATERIALES Y MÉTODOS	12
Líneas celulares y condiciones de cultivo.	12
Microscopía electrónica de transmisión.	12
Medición de Resistencia Eléctrica Transepitelial.....	12
Diseño de oligonucleótidos de RT-PCR específicos para especies de Claudina, Ocludina y ZO-1.	13
Aislamiento de RNA total.	14
Síntesis de cDNA.....	14
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	14
Cuantificación de los productos de PCR.....	15
Anticuerpos.....	17
Inmunolocalización de Claudina, Ocludina y ZO-1	17
RESULTADOS	18
Las células RCE1(5T5) forman un epitelio con uniones estrechas y expresan a las claudinas 1, 2 y 4.....	18
Patrón de expresión de las claudinas 1, 2 y 4, durante el crecimiento y la diferenciación de las células RCE1 en cultivo.....	25
Inmunolocalización de Cldn, Ocln y ZO-1	30
DISCUSIÓN	34
CONCLUSIONES	41
REFERENCIAS	42

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Primers utilizados para el RT-PCR semicuantitativo en células RCE1.....	16
Tabla 2. Comparación de Resistencia Transepitelial entre varios epitelios.....	35
Figura 1. Micrográficas electrónicas de transmisión de epitelios formados por células RCE1.....	20
Figura 2. Multiplato con insertos de membrana de poliéster, en los que se cultivaron las células RCE1 para medir la Resistencia Eléctrica Transepitelial.....	21
Fig. 3. Medida de la Resistencia Transepitelial (TER) en células RCE1 y MDCK.....	21
Fig. 4. Electroforesis de las muestras de RNA total obtenid.....	23
Fig. 5. Productos de RT-PCR obtenidos para Cldn-1, Cldn-3, Cldn-2, Cldn-4 y Cldn-7 en Riñón de ratón, Fibroblastos, Cristalino de Conejo y células RCE1.....	23
Fig. 6 Productos de RT-PCR para ZO-1 y Ocln obtenidos a partir de RNA de células RCE-1.....	24
Fig. 7 Niveles relativos de mRNA de LDH, K16 y Cldn-1 en células RCE1 durante la proliferación y diferenciación del cultivo D) Curva de expresión de Cldn-1 en células RCE1.....	27
Fig. 8 Niveles relativos de mRNA de LDH, K16 y Cldn-2 en células RCE1 durante la proliferación y diferenciación del cultivo D) Curva de expresión de Cldn-2 en células RCE1.....	28
Fig. 9 Niveles relativos de mRNA de LDH, K16 y Cldn-4 en células RCE1 durante la proliferación y diferenciación del cultivo D) Curva de expresión de Cldn-4 en células RCE1.....	29
Fig. 10. Inmunolocalización de Claudina en células RCE1.....	31
Fig. 11. Inmunolocalización de Ocludina en células RCE-1. A y B) Vista superior de la localización de Ocludina. C) Vista superior y D) corte óptico transversal de la misma célula.....	32
Fig. 12. Inmunolocalización de ZO-1 en células RCE-1.....	33

RESUMEN

Los epitelios son tejidos de protección que forman una barrera aislante del ambiente externo. Su integridad se mantiene gracias a complejos de unión intercelular que pueden dividirse en tres tipos: uniones estrechas, uniones adherentes y desmosomas. Diversas proteínas transmembranales que constituyen a estos complejos de unión están unidas a componentes del citoesqueleto. Una vez ensamblados, éstos complejos participan en la regulación de procesos tan diversos como la transcripción, la proliferación y el establecimiento de la polaridad celular. La unión estrecha se encuentra en la parte apical de células epiteliales y endoteliales polarizadas, y constituye una barrera que regula el transporte paracelular de solutos y restringe la difusión lateral de lípidos y proteínas membranales, manteniendo la polaridad celular. Es un complejo multimolecular formado por proteínas integrales, proteínas asociadas a la membrana y un proteínas citoplasmáticas y nucleares. Entre las proteínas integrales de la unión estrecha están las claudinas, familia constituida por 24 miembros que se expresan de manera tejido-específica. Puesto que la biogénesis de las uniones estrechas durante el desarrollo del epitelio corneal no está bien caracterizada, se estudió la presencia de uniones estrechas y los tipos de claudinas asociadas durante el crecimiento y la diferenciación de los queratinocitos de la línea celular de epitelio corneal de conejo RCE1(5T5). El estudio se llevó a cabo por RT-PCR de punto final y mediante RT-PCR-semicuantitativo. Los resultados fueron apoyados por experimentos de inmunolocalización de las proteínas correspondientes. Asimismo se determinó si otras proteínas de la unión estrecha: ZO-1 y ocludina, están presentes en los queratinocitos RCE1. Encontramos que hay uniones estrechas funcionales en estos epitelios RCE1 y que las células expresan los mensajeros que codifican a las claudinas -1, -2, y -4, desde los primeros días en cultivo. Los resultados sugieren que la línea celular puede constituir un modelo extremadamente importante para analizar la regulación y ensamblado de los complejos de unión.

Palabras clave: RCE1, Uniones estrechas, Claudina, Ocludina, ZO-1, epitelio corneal.

ABSTRACT

The epithelium is a tissue that forms a protective barrier from the external environment, its integrity is maintained by intercellular junctional complexes, which are composed of tight junctions, adherens junctions and desmosomes. Several transmembranal proteins that constitute these complexes are linked to components of the cytoskeleton, thus establishing intercellular connections that are involved in regulating processes such as transcription, cell proliferation and polarity, among others. Tight junctions, located at the most apical region of epithelial and endotelial polarized cells, create a primary barrier to regulate paracellular transport of solutes and to restrict lateral diffusion of membrane lipids and proteins, thus maintaining cell polarity. Tight junction is a multimolecular complex, formed by integral proteins, membrane associated proteins and a group of nuclear and citoplasmic proteins. Among the integral membrane proteins that constitute the tight junction complex, the Claudin family of proteins, comprises about 24 isoforms that are expressed in a tissue-specific manner. Since tight junction biogenesis is not well known during embryonic development of corneal epithelium, this work focused on the presence of tight junctions and which of the claudin species are expressed in stratified epithelium formed by the rabbit corneal keratinocytes cell line RCE1. It was also determined whether there is a variation in the expression of members of the Claudin family during proliferation and differentiation of this cell type. We found that there are functional tight junctions in these corneal epithelia, and that the expression of Cldn-1, -2, and -4 mRNAs, its found since the first days of culture.

Key words: RCE1, Tight junctions, Claudin, Ocludin, ZO-1, corneal epithelium.

INTRODUCCIÓN

Los epitelios son tejidos que forman una barrera aislante entre el organismo y el ambiente externo. Su integridad se mantiene gracias a diferentes tipos de complejos de unión intercelular que a saber son: las uniones estrechas, las uniones adherentes y desmosomas, además de las llamadas uniones en cerradura (gap junctions) que participan en procesos de comunicación intercelular.

Las diversas proteínas transmembranales que constituyen a los complejos de unión celular se unen a componentes del citoesqueleto; así al ensamblarse, establecen conexiones intercelulares. De manera adicional, las moléculas de andamiaje asociadas a estas uniones participan en la regulación de procesos tan diversos como la transcripción, la proliferación celular, la polaridad celular y la formación de barreras de difusión reguladas (Schneeberger & Lynch, 2004). La unión estrecha juega un papel importante en la creación de estas barreras, ya que regula el movimiento paracelular de agua y de solutos a través de los epitelios. Este movimiento es variable y se encuentra regulado fisiológicamente, por lo que su perturbación o rompimiento contribuye a diversas patologías (Anderson, 2001). La unión estrecha es un dominio membranal especializado que se localiza en la parte más apical de las células epiteliales y endoteliales polarizadas. Este complejo no sólo constituye una barrera primaria que regula el transporte paracelular de solutos (función de barrera), sino también restringe la difusión lateral de lípidos y proteínas membranales, manteniendo así la polaridad celular (función de valla) (Morita, *et al.*, 1999).

La estructura principal de la unión estrecha es una hebra o fibrilla de naturaleza proteica que se observa en la membrana plasmática mediante microscopía electrónica de criofractura (Staehein, 1973). Cada una de estas hebras se une lateralmente de manera muy estrecha con una hebra similar, localizada en la membrana de la célula adyacente. Esta interacción lleva a la formación de una estructura pareada que

elimina el espacio intercelular y donde prácticamente se unen las membranas de las dos células adyacentes. Estas hebras son las responsables del sellado intercelular en los epitelios y endotelios (Tsukita & Furuse, 2000).

En general, los componentes que constituyen al complejo multimolecular de la unión estrecha, pueden dividirse en tres grupos: 1) Proteínas integrales que forman las fibrillas que unen el espacio intercelular y crean la barrera reguladora de permeabilidad paracelular. 2) Proteínas asociadas a la membrana, muchas de las cuales poseen dominios PDZ, y que sirven como uniones entre las proteínas integrales de las fibrillas y el citoesqueleto de actina, o bien, como adaptadores para el reclutamiento de moléculas citoplásmicas que participan en señalización. 3) De manera adicional, en la unión estrecha se localizan diversas proteínas citoplásmicas y nucleares (que incluyen proteínas reguladoras, supresores de tumores, y factores transcripcionales y post-transcripcionales), que interactúan directa o indirectamente con las proteínas asociadas a la membrana de las uniones estrechas, para coordinar funciones tan diversas como la regulación de la permeabilidad paracelular a solutos, la proliferación, la diferenciación y la polaridad celular, así como la supresión de tumores (Schneeberger & Lynch, 2004).

El dominio PDZ, consta de entre 80 – 90 aminoácidos, y contribuye a las interacciones proteína – proteína. Entre las proteínas membranales que cuentan con dominio PDZ y forman parte de las uniones estrechas, están las pertenecientes a la familia MAGUK, un grupo de proteínas que se distingue por sus dominios de unión a otras proteínas.

Las proteínas de la familia MAGUK, poseen uno o más dominios PDZ, un dominio SH3 y un dominio homólogo a guanilato cinasa (GuK) que es inactivo como enzima. Éstos dominios participan en y permiten el ensamblaje de complejos de señalización, de receptores y de transporte en una variedad de uniones membranales (Ban, *et al.*, 2003b).

Entre las proteínas de esta familia involucradas en la formación de uniones estrechas, encontramos a ZO-1 (zonula occludens-1), ZO-2 y ZO-3, identificadas de manera previa a las proteínas integrales de la unión (Stevenson, *et al.*, 1986). Cada una de estas tres proteínas posee tres dominios PDZ en la porción amino terminal, y en el extremo carboxilo terminal poseen dominios que permiten la interacción con F-actina (González-Mariscal, *et al.* 2000).

Además de éstas proteínas, existen muchas otras que poseen al menos un dominio PDZ, y que se encuentran en la superficie citoplásmica de las uniones estrechas. Entre éstas se puede mencionar a MAGI (MAGUK inverted) -1/-2/-3 (Dobrosotskaya, *et al.*, 1997; Wu, *et al.*, 2000), y PAR (partitioning defective)-3 y -6, presentes en el mamífero y homólogas de PAR de *C. elegans*. Estas últimas también participan en la división celular asimétrica (Izumi, *et al.*, 1998; Lin, *et al.*, 2000).

Las fibrillas que constituyen a la unión estrecha y que unen a las membranas de células vecinas, se encuentran formadas, mayoritariamente, por dos proteínas integrales que interactúan: la ocludina y la claudina. La ocludina tiene un peso molecular de alrededor de 60 kDa; fue la primera proteína integral descrita en las uniones estrechas. Posee cuatro dominios intermembranales, un dominio largo citoplasmático carboxilo-terminal y un dominio citoplasmático amino-terminal corto (Tsukita, *et al.*, 2001).

Actualmente se sabe que hay dos isoformas de ocludina generadas por procesado (splicing) alternativo del hnRNA correspondiente (Muresan, *et al.*, 2000).

El otro componente de la unión estrecha es la Claudina, denominada así por la palabra latina “claudere”, que significa: “que cierra”. Inicialmente, esta proteína integral fue identificada en el hígado de pollo en 1993 (Furuse *et al.*, 1993) y pertenece a una familia proteínica cuyos genes codifican a proteínas de 20 a 27 kDa. Ninguna de las secuencias reportadas para las claudinas, posee similitud con la ocludina. Se trata de proteínas con cuatro dominios intermembranales, con extremos amino y carboxilo relativamente cortos, expuestos hacia la parte citoplásmica de la unión estrecha. Las claudinas forman dos asas extracelulares; la primera contiene cerca de 53 aminoácidos, y la segunda 24 aminoácidos (Morita, *et al.*, 1999). El extremo carboxilo terminal de las claudinas finaliza con la secuencia Y-V (Tirosina-Valina), que constituye el sitio al que se unen los dominios PDZ de las proteínas ZO-1, ZO-2 y ZO-3 (Itoh, *et al.*, 1999). Hasta la fecha se han identificado 24 claudinas, que se expresan de manera tejido-específica (Morita *et al.*, 1999). La funcionalidad de las claudinas se ha estudiado a partir de experimentos de transfección en células que normalmente no forman uniones estrechas. De esta manera, la transfección de fibroblastos L con vectores de expresión que contenían las secuencias que codifican para las claudinas 1 y 2, condujo a la formación de hebras en los espacios de contacto celular (Furuse, *et al.*, 1998b). De este tipo de estudios, se concluyó que las claudinas son proteínas fundamentales para formar las uniones estrechas. Adicionalmente, y una vez que se identificaron otras proteínas pertenecientes a la familia de las claudinas (Morita *et al.*, 1999), la sobreexpresión de claudinas en células MDCK ha llevado a concluir que el tipo de Claudina determina la hermeticidad o fuerza de la unión (Tsukita & Furuse *et al.*, 2001).

En el epitelio corneal del mamífero se ha analizado tanto *in situ* como *in vitro*, el tipo de claudinas expresadas. En el epitelio corneal de la rata, se describió la presencia de ocludina, ZO-1, ZO-2 y claudina-1 (Yi, *et al.*, 2000). Por otra parte, en la línea transformada de células epiteliales de cornea humana THCE, se demostró la expresión de las claudinas -1, -2, -3, -7, -9, -14 y -15 (Yi *et al.*, 2000). De manera similar, en el epitelio corneal humano se expresan las claudinas -1,-2,-3,-4,-7,-9 y -14 (Ban *et al.*, 2003a); e *in vitro*, adicionalmente a éstas, también se expresa la claudina-10 (Ban *et al.*, 2003b).

A pesar del conocimiento que se tiene sobre la funcionalidad de las claudinas, hasta ahora no se ha descrito si las claudinas cambian su expresión durante el desarrollo del epitelio corneal. Del mismo modo, se desconoce si existen cambios en la hermeticidad del epitelio durante el proceso de diferenciación terminal, o bien, cambios asociados a patologías que alteran la funcionalidad de la córnea. Con el propósito de establecer el patrón de expresión de las claudinas durante el proceso de diferenciación y formación de un epitelio estratificado, en este proyecto nos propusimos analizar la expresión de las claudinas durante el crecimiento y diferenciación del epitelio corneal del mamífero.

Para ello utilizamos como modelo experimental a la línea celular RCE1 (5T5) de queratinocitos corneales de conejo (Castro-Muñozledo, 1994, 2008; Tamariz *et al.*, 2007). Estas células se obtuvieron mediante el cultivo serial de queratinocitos de córnea, que después de 14 transferencias en cultivo, sufrieron una crisis que llevó al establecimiento de una población heteroploide que reproduce *in vitro* el proceso de diferenciación del epitelio corneal del mamífero (Castro-Muñozledo, 1994). De manera muy importante, esta línea celular reproduce la expresión secuencial del proceso de diferenciación (Castro-Muñozledo, 1994; Chen *et al.*, 1997; Tamariz *et al.*, 2007)

observada en los cultivos primarios de queratinocitos corneales (Schermer *et al.*, 1989). Esto la convierte en un excelente modelo experimental para analizar los procesos de estructuración y diferenciación terminal del epitelio corneal de mamífero. Adicionalmente el uso de líneas celulares reduce al mínimo el sacrificio de animales experimentales y permite la obtención de grandes cantidades de tejido.

Con base en estas características, este trabajo buscó determinar si las células RCE1 (5T5) expresan algunas de las Claudinas, así como evaluar diferencias en su expresión relacionadas con la diferenciación celular.

JUSTIFICACIÓN

La maquinaria molecular involucrada en el transporte vía transcelular (canales, bombas, transportadores, etc.) se identificó hace 50 años, y desde entonces se ha caracterizado en forma muy activa (Wuytack, 2009). En contraste, se conoce poco sobre el transporte paracelular y su regulación, ya que los componentes de la unión estrecha se identificaron recientemente, y su estudio sólo se ha abordado durante la última década. Por lo mismo, nuestro conocimiento sobre la unión estrecha aún es limitado y se hace necesario entender la biogénesis, conformación, regulación y participación de las uniones estrechas con procesos como la diferenciación terminal. Sobre todo es de gran relevancia conocer este tipo de procesos en epitelios y endotelios de importancia médica, ya que las uniones estrechas y en especial, las claudinas tienen relación con diversas patologías, entre ellas la hipomagnesemia, enfermedad hereditaria producida por una mutación en la Cldn-16 que imposibilita la absorción normal de magnesio por parte del asa ascendente de Henle en el riñón (Kang, *et al.*, 2005). Este padecimiento también puede producirse por una mutación en la Cldn-19. Sin embargo, en este último caso se acompaña también por anormalidades oculares, como la miopía, el coloboma macular y el nystagmus (Konrad, *et al.*, 2006).

Cuando la Claudina-1 sufre mutaciones, se dan problemas como la colangitis esclerosante neonatal además de la ictiosis (Hadj-Rabia, *et al.*, 2004). Otra patología relevante que está relacionada con mutaciones en las claudinas es la sordera no sindrómica, que se manifiesta cuando hay una mutación en la claudina-14 (Wilcox, *et al.*, 2001). Las claudinas también participan en el desarrollo de algunas patologías al funcionar como receptores para toxinas o patógenos epiteliales; por ejemplo, las claudinas -3 y -4 funcionan como receptores para la enterotoxina de *C. perfringens*

(Katahira, *et al.*, 1997). Por otra parte, las claudinas-1, -6 y-9 son co-receptores para la infección por el virus de la hepatitis C (Evans, *et al.*, 2007; Zheng, *et al.*, 2007). Finalmente, los cambios en la expresión de claudinas también se han relacionado con el desarrollo del cáncer epitelial (Morin, *et al.*, 2005).

OBJETIVOS

Objetivo general

En este trabajo se determinó si las células RCE1(5T5) expresan algunas de las Claudinas. También se analizaron las diferencias de expresión de estas moléculas a lo largo del crecimiento y la diferenciación en cultivo, para determinar si es factible utilizar a esta línea celular como modelo para estudiar la biogénesis, regulación y funcionalidad de las uniones estrechas en relación al proceso de diferenciación.

Objetivos particulares

1. Realizar la detección de uniones estrechas por microscopía electrónica de transmisión.
2. Medir la resistencia transepitelial de epitelios formados por células de esta línea inmortalizada.
3. Desarrollar oligonucleótidos cebadores específicos para las claudinas y estandarizar los protocolos de RT-PCR semicuantitativo para evaluar la expresión de las claudinas en distintos tiempos de cultivo.
4. Correlacionar la expresión de las claudinas con los valores de resistencia transepitelial observados.
5. Correlacionar la expresión de las diferentes claudinas con la expresión de marcadores de diferenciación del epitelio corneal.
6. Inmunolocalizar a los componentes de uniones estrechas en epitelios formados por células RCE1 (5T5).

MATERIALES Y MÉTODOS.

Líneas celulares y condiciones de cultivo.

Se utilizaron cultivos de células RCE1 (Castro-Muñozledo, 1994) sembradas a una densidad de 2.7×10^3 células/cm², co-cultivadas con células alimentadoras (feeders) fibroblastos 3T3 a una densidad de 2.2×10^4 células /cm² (Rheinwald, 1980). Se utilizaron también células MDCK, cultivadas sin células alimentadoras. Todos los cultivos fueron provenientes de un banco desarrollado en el laboratorio. El medio de cultivo utilizado para todos los cultivos fue DMEM-F12-Ham (3:1) suplementado con 5% (v/v) de suero fetal de bovino, $5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de insulina, $0.4\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de hidrocortisona, $2 \times 10^{-9}\text{M}$ triiodotironina, $1 \times 10^{-10}\text{M}$ toxina del cólera y $10\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ de factor de crecimiento epidermal (EGF). Todos los cultivos se incubaron a 36° C en una atmósfera húmedificada de 10% CO₂ – 90% aire. Se cambió el medio de cultivo cada tercer día.

Microscopía electrónica de transmisión.

Se utilizaron células RCE1 confluentes, en las que se realizó la búsqueda de uniones estrechas a través de microscopía electrónica de transmisión. Las células fueron fijadas con 2.5% (v/v) glutaraldehído en 0.1M cacodilato de sodio; se postfijaron en 1% (w/v) tetraóxido de osmio y fueron embebidas en Epon 812. Se obtuvieron cortes finos que se contrastaron con acetato de uranilo y se analizaron en un microscopio electrónico FEI Morgagni 268D.

Medición de Resistencia Eléctrica Transepitelial.

Células RCE1 a una densidad de 6×10^3 células/cm², en presencia de fibroblastos 3T3, o células MDCK a una densidad de 6×10^3 células/cm² se sembraron en insertos de cultivo con una membrana de poliéster de 6.5 mm de diámetro (0.33cm²

de superficie) y con 0.4 μm de tamaño de poro (Transwell, Costar, Corning, USA), colocados sobre multiplatos de 24 pozos. Los cultivos confluentes (8 días de cultivo/3 días postconfluencia) se utilizaron para medir la resistencia transepitelial (TER) mediante un voltímetro epitelial EVOM (World Precision Instruments, FL, USA). Los valores de TER se calcularon tomando en cuenta el área de cultivo y sustrayendo la contribución de la membrana sola o con fibroblastos 3T3 (testigo negativo), incapaces de formar uniones estrechas.

Diseño de oligonucleótidos de RT-PCR específicos para especies de Claudina, Ocludina y ZO-1.

Se obtuvieron las secuencias de los mRNAs de Claudina, Ocludina y ZO-1 de conejo (*Oryctolagus cuniculus*), ratón (*Mus musculus*), rata (*Rattus norvegicus*) y humano (*Homo sapiens*), publicadas en el Genbank del NCBI. Con éstas se realizó un alineamiento para conocer las regiones más conservadas, y seleccionar sitios para diseño de los oligonucleótidos cebadores, los cuáles debieron cumplir con las siguientes condiciones: 1) Tm alto (alrededor de 60° C); 2) la diferencia de Tm entre el par de cebadores (forward y reverse) para cada proteína fuera lo más pequeña posible;

3) Temperatura de alineamiento alto (cerca de 60° C); y finalmente 4) que formaran la menor cantidad posible de asas internas. Todo esto se llevo a cabo con ayuda del paquete de software DNASTar for Windows 32 v.3.1 (Lasergene Inc., Madison, WI, USA). Se diseñó un total de 4 juegos de cebadores; 2 para Claudina-1, basados en una secuencia de conejo (DQ993356); y 2 para Claudina-3 (AF087821), 2 para Ocludina (NM_008756) y 2 para ZO-1 (NM_009386), que se confeccionaron a partir de secuencias de ratón (*Mus musculus*), ya que no existen las secuencias de conejo correspondientes en el Genbank para estas proteínas.

Aislamiento de RNA total.

Se realizaron extracciones de RNA total a diferentes tiempos en cultivo (3 a 7 y 10 a 12 días) de células RCE1 cultivadas en cajas de 60 mm, de 3 experimentos independientes, por duplicado. Los cultivos se lavaron dos veces con PBS 1X y se lisaron directamente con Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y cloroformo. Se precipitaron los ácidos nucleicos con isopropanol y se lavó la pastilla formada con etanol al 75% (v/v). Finalmente se resuspendió en agua libre de DNAsas y RNAsas y se cuantificó el RNA. La integridad de las muestras de RNA se examinó verificando la presencia de los mRNAs ribosomales 28S y 18S, después de separar 2 µg de RNA total en geles de agarosa al 1%(p/v) con 0.5 mg/ml de EtBr e Isotiocianato de Guanidina a una concentración final de 1.25 mM.

Síntesis de cDNA.

La síntesis de DNA complementario (cDNA) a RNAs mensajeros se realizó a partir de 5 µg de RNA total, y en la presencia de 0.5 µg de oligo (dT). Para ello se empleó transcriptasa reversa (SuperScript II; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); se incubó a 42° C por 50 minutos e inactivó la reacción a 70° C por 15 minutos. Para evitar la hibridación entre el RNA total y el DNA complementario se agregó 1 ml de RNasa H (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y se incubó a 37° C durante 20 min. para eliminar el RNA.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Como control interno para el RT-PCR semicuantitativo se utilizaron primers para PRP0 (XM_535894; García-Villegas, et al.), un gen ribosomal, cuyos niveles se mantienen constantes durante el crecimiento y la diferenciación en cultivo (García-Villegas *et al.*, 2009). Los cebadores utilizados para la amplificación de Claudina,

Ocludina y ZO-1 se enlistan en la Tabla 1. Se utilizaron 4 juegos diseñados en el laboratorio (ver párrafos anteriores), además de los descritos para las Cldn-2, -4, y -7 por Yi, *et al.* (2000) y los desarrollados por Go, *et al.* (2006) para ZO-1. Se utilizaron primers para la queratina K16 (Porter, *et al.*, 1998), la cual se utilizó como marcador de células hiperproliferativas (Schermer, *et al.*, 1989) y se usó a LDH-H como marcador de diferenciación terminal de células corneales (Hernández-Quintero, *et al.*, 2002). Todos los cebadores que se utilizaron se enlistan en la Tabla 1.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó con el cDNA sintetizado a partir del RNA total, en una mezcla de reacción con volumen de 50 μ l, utilizando el kit Taq PCR Core Kit (QIAGEN, GmbH, GER). Los parámetros de amplificación fueron los siguientes: desnaturalización 94°C por 1 min, alineamiento a 55 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 1 min durante 30 ciclos. Para evaluar los productos obtenidos, se realizó electroforesis en geles de agarosa al 2%(p/v) con 0.5 mg/ml de bromuro de etidio (EtBr), colocando 5 μ l de la reacción de PCR por pozo.

Para comprobar que los cebadores utilizados para el RT-PCR de los diferentes tipos de Claudina permitieran obtener los productos esperados, se llevaron a cabo pruebas en diferentes tipos celulares: riñón de ratón, fibroblastos 3T3, cristalino de conejo y RCE1. Una vez que se estandarizaron los protocolos de RT-PCR y se comprobó la funcionalidad de los cebadores para las especies de Claudina (Cldn-1, Cldn-2, Cldn-3, Cldn-4 y Cldn-7) se evaluó la expresión de éstas en la línea celular con respecto al tiempo de cultivo.

Cuantificación de los productos de PCR

Los amplicones fueron cuantificados por medio de un análisis densitométrico con el software Quantity One Versión 4.5.0 (BIO-RAD Hercules, CA, USA). La cantidad de producto de PCR fue normalizada con respecto a los niveles de PRP0.

Nombre	Secuencia (5'-3')	No. de Acceso	Tamaño del producto
Claudina-1	ATC GTG ACC GCC CAA GCC A AGA GAA GCA GCA GCC CAG CCA GT	DQ993356	404 bp
*Claudina-2	ACA CAC AGC ACA GGC ATC AC TCT CCA ATC TCA AAT TTC ATG C	AF072128	319 bp
Claudina-3	CAT CGT GTG CTG CGC CCT TCC C AGC CCA GCC CAC GTA CAA CCC AGC	AF087821	445 bp
*Claudina-4	TGG ATG AAC TGC GTG GTG CAG GAG GCG GCC CAG CCG ACG TA	AF087822	361 bp
*Claudina-7	AGT GGC AGATGA GCT CCT ATG GTT ATA AAA GTC TGT GAC AAT CT	AJ011497	364 bp
^PRP0	GCA GGT GTT TGA CAA TGG CAG C GCC TTG ACC TTT TCA GCA AGT GG	XM_535894	231 bp
ZO-1	GTC TGC CAT TAC ACG GTC CT TGG AGA TGA GGC TTC TGC TT	NM_009386	172 bp
*ZO-1	CGG TCC TCT GAG CCT GTA AG GGA TCT ACA TGC GAC GAC AA		435 bp
Ocludina	CCT GGG GTT CAT GAT TAT CG CTG CCT GAAGTC ATC CAC AC	NM_008756	355 bp
K16	CTG GCT TTG GTG GTG GTT T AGG CAG CTC AGT TCT AGG AGC	S79867	1200 bp
LDH-H	CAT TAT TCC CCA GAT TGT CAA GT CAC CTA GTA AGG AGG AGG AAA AG	AF174288	758 bp

Tabla 1 Cebadores empleados en el desarrollo experimental para el RT-PCR semicuantitativo en células RCE1; números de acceso de GenBank (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). * Yi, *et al.* (2000); ^García-Villegas, *et al.* (2007), °Go, *et al.* (2006).

Anticuerpos

Para la inmunolocalización se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: Anticuerpo policlonal anti-claudina-1 fabricado en cabra, dilución de 1:10. Monoclonal anti-occludina monoclonal de ratón conjugado con FITC, anticuerpo policlonal anti-ZO-1, hecho en de ratón, conjugado con FITC, ambos se utilizaron a una dilución de 1:50. Como anticuerpo secundario para la inmunolocalización de claudina-1 se utilizó un anticuerpo anti-cabra IgG realizado en burro y marcado con Alexa Fluor 488 (verde) a una dilución de 1:200.

Inmunolocalización de Claudina, Occludina y ZO-1

Las células se cultivaron en cajas de petri de 35 mm de diámetro con cubreobjetos de vidrio de 18 x 18 mm, hasta los 13 días (8 días postconfluencia) y se fijaron con metanol absoluto frío (-20° C) por 5 min. Se lavaron con PBS y se incubaron con albúmina sérica de bovino (BSA) 5% por 1 hora a temperatura ambiente para bloquear la unión inespecífica del anticuerpo. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente por 2 horas a temperatura ambiente y se lavaron con PBS-Tween 0.05% (v/v) 6 veces. Tras incubar con el anticuerpo primario se incubaron con el anticuerpo secundario por 1 hora a temperatura ambiente y se lavó 6 veces con PBS 1X. En las muestras en donde se utilizaron los anticuerpos conjugados con FITC solamente se incubaron las células por 2 horas a temperatura ambiente, tras el bloqueo, y se lavó 4 veces con PBS-Tween 0.05% (v/v) y 2 veces con PBS 1X. Finalmente se montaron en Vectashield, medio de montaje para fluorescencia con yoduro de propidio (PI) (Vector Laboratorios, Burlingame, CA, USA). Las laminillas se examinaron en un microscopio confocal, con sistema multifotón de alta velocidad Leica, modelo TCS SP2 (Leica Microsystems, GmbH, Wetzlar, GER).

RESULTADOS

Las células RCE1(5T5) forman un epitelio con uniones estrechas y expresan a las claudinas 1, 2 y 4.

Con el propósito de determinar si las células RCE1(5T5) constituyen un buen modelo para el estudio de la biogénesis y regulación de las uniones estrechas, inicialmente evaluamos por microscopía electrónica de transmisión la presencia de de estas uniones especializadas en cultivos 3 días post-confluentes (8 días en cultivo). El análisis mostró que las células RCE1 formaron epitelios con 2-4 capas de células, siendo evidente una capa basal de morfología cuboidal, y capas suprabasales de morfología más alargada y aplanada (no se muestra). Como se observa en la Figura 1, el examen de la capa suprabasal más externa demostró la presencia de estructuras con morfología similar a las uniones estrechas; las cuáles se observan como puntos de contacto célula-célula en donde las membranas adyacentes se encuentran muy cerca una de otra. Sin embargo, el análisis visual no permitió definir si las estructuras observadas correspondían a uniones estrechas, a pesar de realizar el estudio en altos aumentos.

Por lo tanto, para confirmar la presencia de uniones estrechas en las células RCE1, se determinó la resistencia eléctrica transepitelial (TER) en epitelios cultivados hasta el 3er día de post-confluencia (8 días en cultivo). Cabe señalar que la resistencia transepitelial es una medida de la resistencia eléctrica de láminas epiteliales, medida a través del eje apical-basolateral de la célula (Tsukita, *et al.*, 2001), y nos permite medir la fuerza de unión o hermeticidad de las uniones estrechas, cuando éstas están presentes. Por lo tanto, la TER se midió en epitelios 3 días post-confluentes estructurados en insertos de poliéster (Fig. 2). Como testigo positivo, en nuestros experimentos utilizamos

epitelios formados por células MDCK, caracterizadas por sus altos valores de resistencia transepitelial (Barker & Simmons, 1981). Por otra parte, como testigo negativo, los epitelios de células RCE1 se compararon con cultivos de fibroblastos 3T3, que no forman uniones estrechas. Como se observa en la Figura 3, el epitelio formado por las células RCE1 presentó valores de TER de $291 \pm 65.7 \Omega/\text{cm}^2$; en contraste, las células MDCK tuvieron valores de TER de $4436 \pm 2153.4 \Omega/\text{cm}^2$ (Fig. 3). Estos resultados confirman que las células RCE1(5T5) poseen uniones estrechas, aunque no forman un epitelio tan hermético como el constituido por las células MDCK.

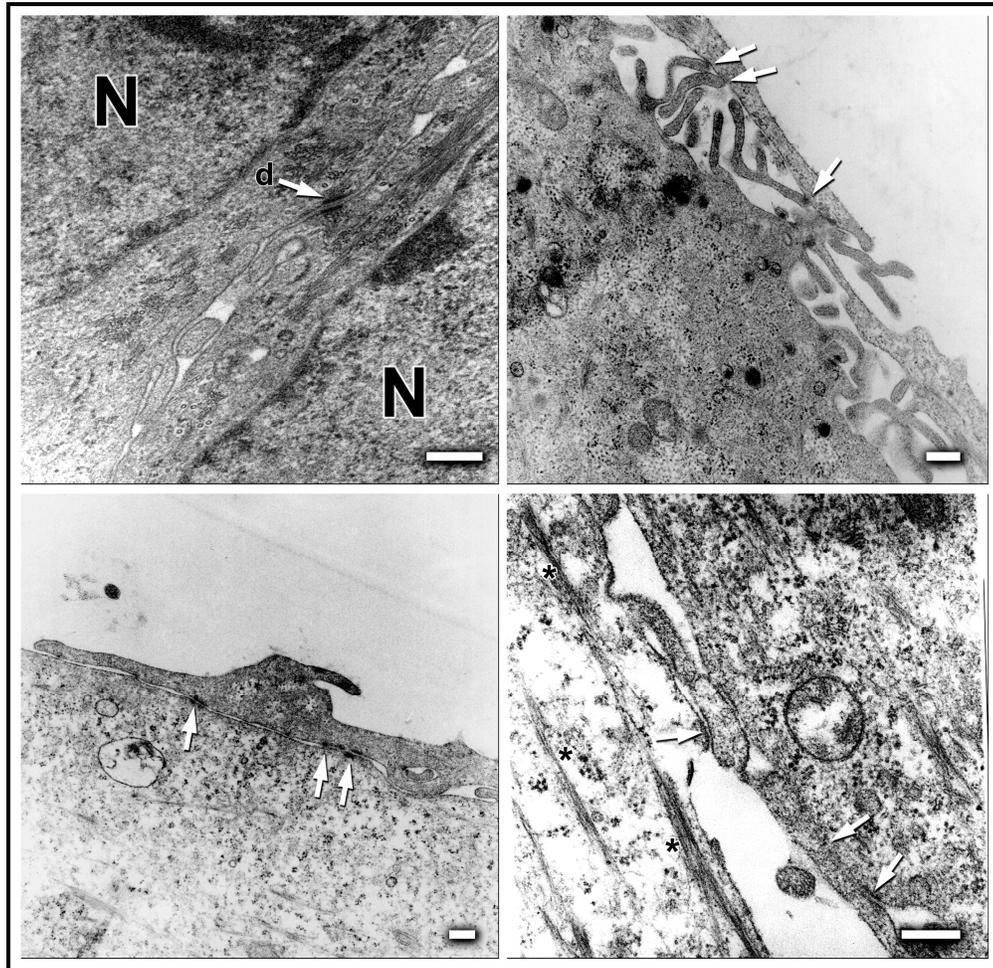


Fig. 1. Micrografías electrónicas de transmisión de epitelios formados por células RCE1. Las estructuras consideradas como uniones estrechas (flechas) se encontraron sólo en la capa más apical, no se encontraron en las capas suprabasales. Se observan los núcleos de las dos células adyacentes en el panel superior izquierdo (N), en este mismo panel, se encuentra un desmosoma entre las dos células (d). En todas las micrografías se pueden distinguir gránulos, así como filamentos de queratina (*). Barra: 300nm.



Fig. 2. Multiplato con insertos de membrana de poliéster, en los que se cultivaron las células RCE1 para medir la Resistencia Eléctrica Transepitelial. Después de la medición de la TER, las células fueron fijadas con Formalina 10% (v/v) y teñidas con Rodamina B para evidenciarlas.

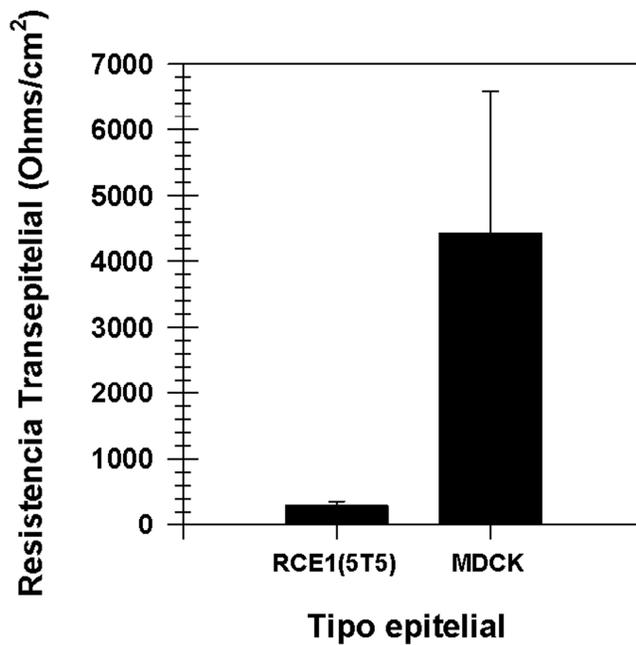


Fig. 3. Medida de la Resistencia Transepitelial (TER) en células RCE1 y MDCK. Se confirmó que los epitelios formados por células RCE1 poseen uniones estrechas funcionales. Medias de 2 experimentos individuales con 6 muestras duplicadas cada uno.

Una vez que se estableció la presencia de uniones estrechas en los epitelios cultivados RCE1(5T5), se determinó por RT-PCR de punto final la expresión de proteínas asociadas a las uniones estrechas en cultivos 7 días post-confluentes. De manera previa a la realización de los experimentos, en todos los casos se verificó la integridad del RNA total utilizado en las reacciones por análisis en geles de agarosa al 2% y determinando la presencia de los RNAs ribosomales 28S y 18S (Fig. 4). En todos los casos, los oligonucleótidos cebadores fueron diseñados adecuadamente ya que los productos obtenidos llevaron a la generación de los amplicones de los tamaños esperados (Fig. 5). Como testigos se emplearon RNAs totales extraídos de riñón de ratón (Fig. 5), tejido en que se ha reportado la presencia de diferentes especies de Claudina (Tsukita, *et al.* 2001); cristalino de conejo, y fibroblastos 3T3. Como se puede observar en la Figura 5, de los 5 tipos de Claudina evaluados, se encontró que las claudinas -1, -2 y -4 son expresadas en epitelios formados por la línea celular RCE1.

Por otra parte, en experimentos similares se examinó la expresión de los componentes de la unión estrecha ocludina y ZO-1, obteniéndose los productos del peso esperado (Fig. 6). En conclusión, nuestros resultados demuestran que las uniones estrechas son expresadas en epitelios formados por células RCE1(5T5).

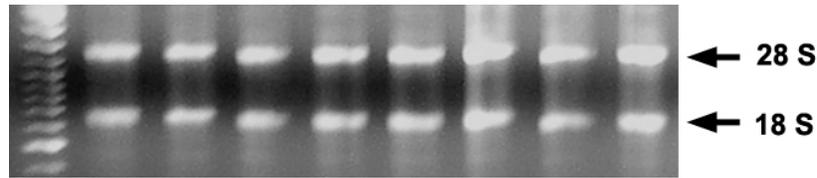


Fig. 4. Electroforesis de las muestras de RNA total obtenido. La integridad de las muestras de RNA se verificó confirmando la presencia de los RNAs ribosomales 28S y 18S. Se colocaron 2 μ g de RNA total por pozo en un gel de agarosa 1% con 0.5 mg/ml de EtBr e Isotiocianato de Guanidina 1.25 mM.

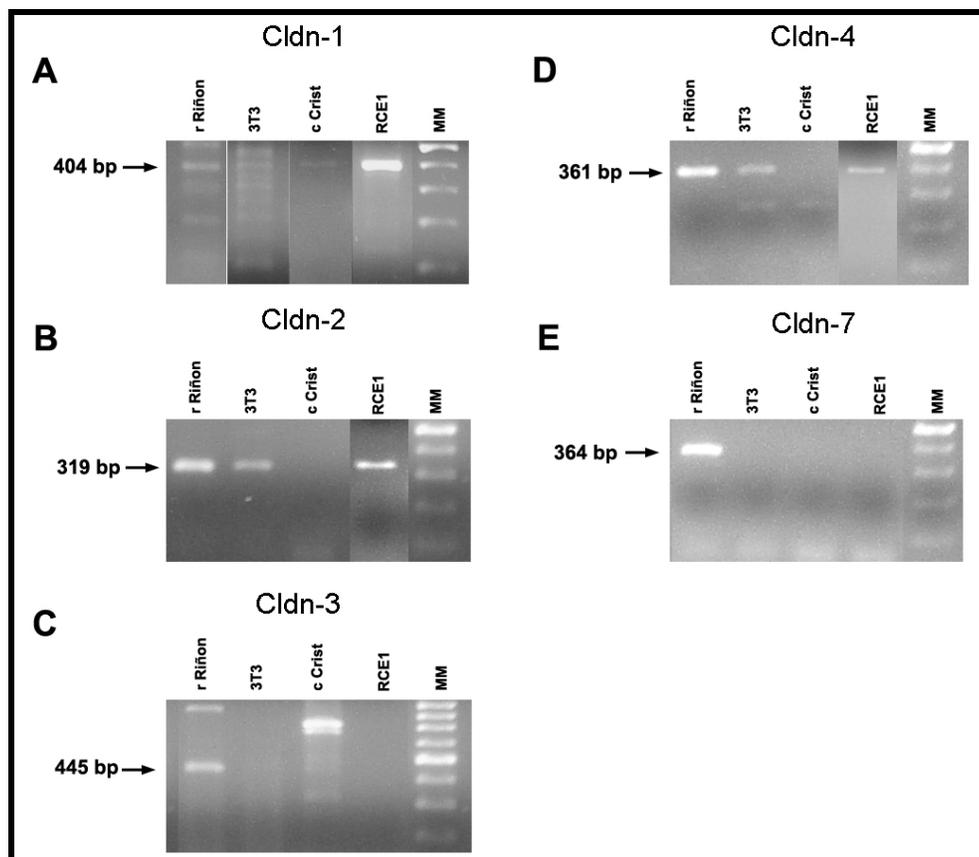


Fig. 5. Productos de RT-PCR obtenidos con los cebadores diseñados para Cldn-1 (A); 404 bp, Cldn-3 (C); 445 bp, y los cebadores previamente reportados para Cldn-2 (B); 319 bp, Cldn-4 (D); 361 bp y Cldn-7 (E); 364 bp. Marcador de peso molecular (MM). Riñón de ratón (rRatón), Fibroblastos (3T3), Cristalino de Conejo (cCrist) y células RCE1. 55° C 30 ciclos. Gels de agarosa 2% con 0.5 mg/ml Bromuro de etidio.

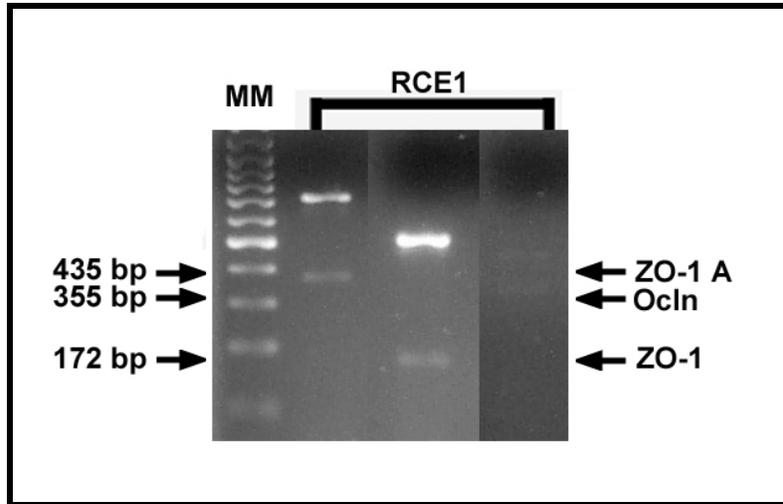


Fig. 6 Productos de RT-PCR obtenidos a partir de RNA de células RCE-1. Se observan dos bandas en cada carril, el amplicon en todos los casos es el de menor peso molecular (abajo). MM: Marcador molecular. ZO-1-A: amplicon obtenido con los cebadores para ZO-1 descritos por Go, *et al.* (2006); 435 bp. ZO-1 y Ocln: productos amplificados con cebadores diseñados en el laboratorio para ZO-1; 172 bp y Ocludina; 355 bp. 55° C 30 ciclos. Geles de agarosa 2% con 0.5 mg/ml de Bromuro de etidio.

Patrón de expresión de las claudinas 1, 2 y 4, durante el crecimiento y la diferenciación de las células RCE1 en cultivo.

Con base en los resultados anteriores, se analizó el patrón de expresión de las claudinas 1, 2 y 4 a diferentes tiempos en cultivo. Para ello, se obtuvo RNA total de cultivos de células RCE1(5T5), a los 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11 y 12 días después de la inoculación y los niveles relativos de expresión de los mRNAs que codifican para las claudinas 1, 2 y 4 se determinaron por RT-PCR semicuantitativo (Kaashoek *et al.*, 1991), utilizando los oligonucleótidos cebadores y las condiciones de amplificación descritas (ver Métodos; Tabla 1). La queratina K16 fue utilizada como referencia de la fase de crecimiento exponencial de los cultivos, ya que es un marcador de células suprabasales durante esta etapa (Schermer *et al.*, 1989), y fue amplificada con cebadores específicos cuya secuencia fue previamente descrita (Porter *et al.*, 1998; Tabla 1). Por otra parte, como referencia del proceso de diferenciación terminal se utilizó la expresión del mRNA que codifica para la enzima LDH-H, cuantificada mediante el empleo de cebadores específicos previamente descritos (Hernández-Quintero, *et al.* 2002; Tabla 1). Por otra parte, como control interno para la amplificación se seleccionó al mensajero que codifica para la fosfoproteína ribosomal ácida P0 (PR-P0), y para ello se utilizaron cebadores específicos (García-Villegas *et al.* 2007; Tabla 1). El análisis del cambio en la expresión de las Claudinas-1, -2 y -4, demostró que los niveles de los mRNAs correspondientes se expresan desde los primeros días de cultivo. En general, la Cldn-1 a partir del día 3 de cultivo se mantuvo relativamente constante; posteriormente, los días 11 y 12 de cultivo, su expresión aumentó alcanzando niveles 20% por encima de su valor inicial (Fig. 7C). Por otra parte, la expresión de Cldn-2 osciló a lo largo del crecimiento y la diferenciación en cultivo, presentando niveles entre una y dos veces las cantidades de mRNA encontrados el tercer día de cultivo (Fig. 8C). Finalmente, la Cldn-4 presentó niveles estables durante todo el desarrollo experimental (Fig. 9C).

Estos resultados contrastaron con el cambio en la expresión de la LDH-H, cuyo mRNA aumentó 4 veces a lo largo del proceso de diferenciación, y alcanzó valores máximos a los 12 días en cultivo (Figuras 7A, 8A y 9A). Al mismo tiempo, los niveles de la queratina K16, mostraron un incremento correspondiente a la fase de crecimiento exponencial de la población celular, para alcanzar un máximo a los 8 días en cultivo, cuando las células comienzan a organizarse como un epitelio estratificado y declinar posteriormente al expresarse el fenotipo terminal (Figuras 7B, 8B y 9B).

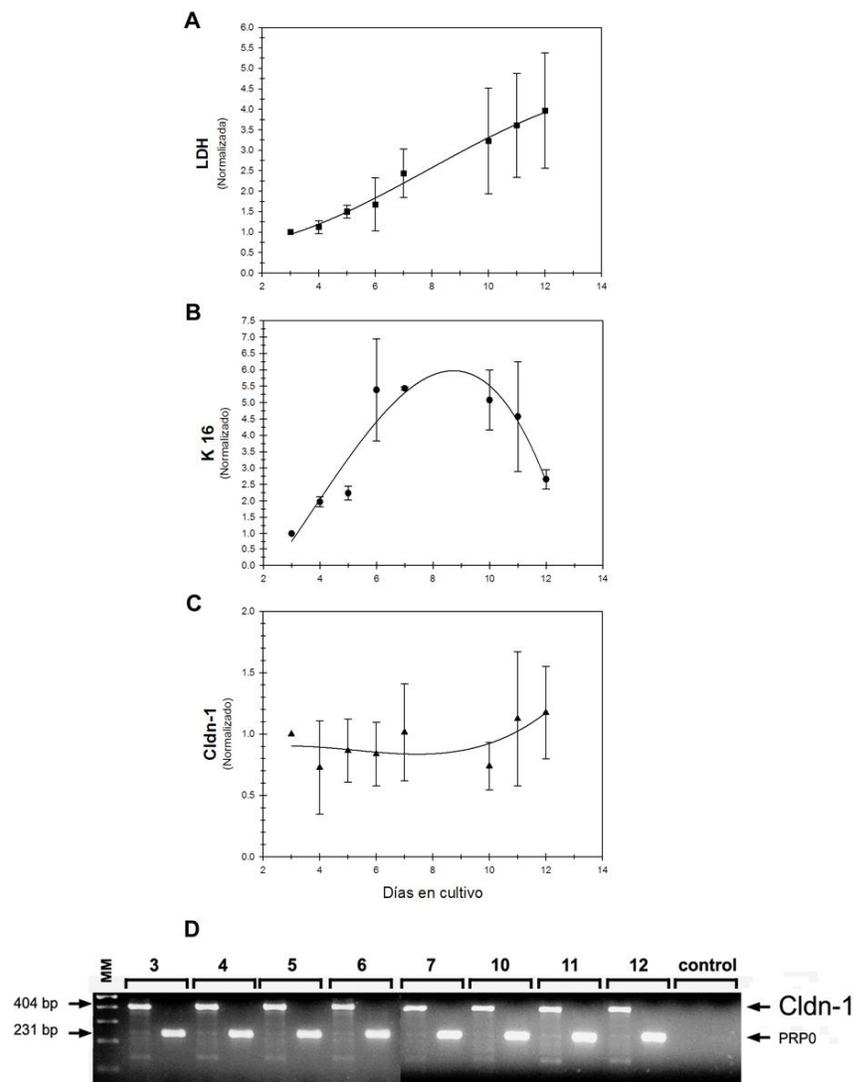


Fig 7. Niveles relativos de los mRNAs de **(A)** LDH, **(B)** K16 y **(C)** Cldn-1 en células RCE1 durante la proliferación y diferenciación en cultivo. Se muestra el promedio de 4 experimentos independientes, normalizados contra el 3er día de cultivo. **(D)** Curva de expresión de Cldn-1 en células RCE1 (404 bp). El control interno utilizado fue PRP0 (231 bp). Marcador de Peso Molecular (MM). Los números en la parte superior indican los días en cultivo. No se observan productos en ausencia de cDNA (control). Gel de agarosa 2%(p/v) con 0.5 mg/ml de bromuro de etidio.

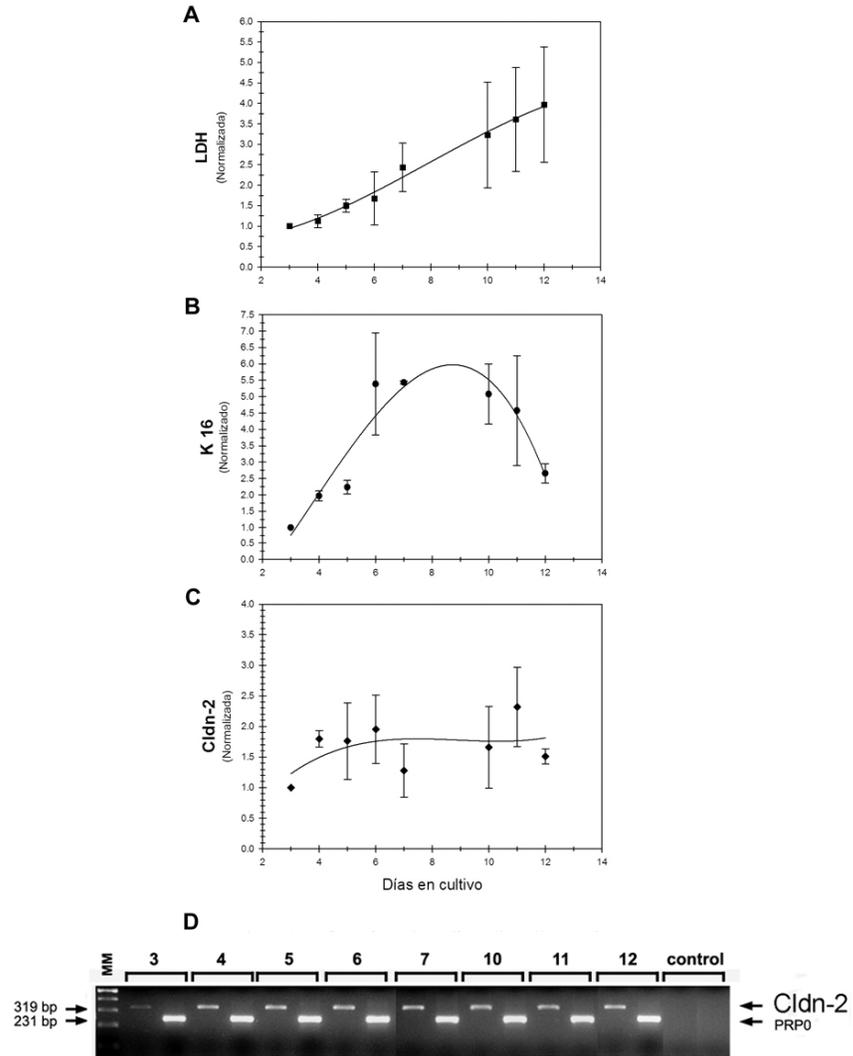


Fig 8. Niveles relativos de los mRNAs de (A) LDH, (B) K16 y (C) Cldn-2 en células RCE1 durante la proliferación y diferenciación en cultivo. Se presenta el promedio de 4 experimentos independientes, normalizados contra el 3er día de cultivo. (D) Curva de expresión de Cldn-2 en células RCE1 (319 bp). El control interno utilizado fue PRP0 (231 bp). Marcador de Peso Molecular de 100bp (MM). Los números en la parte superior indican los días en cultivo. No se observan productos en ausencia de cDNA (control). Gel de agarosa al 2%(p/v) con 0.5 mg/ml de bromuro de etidio.

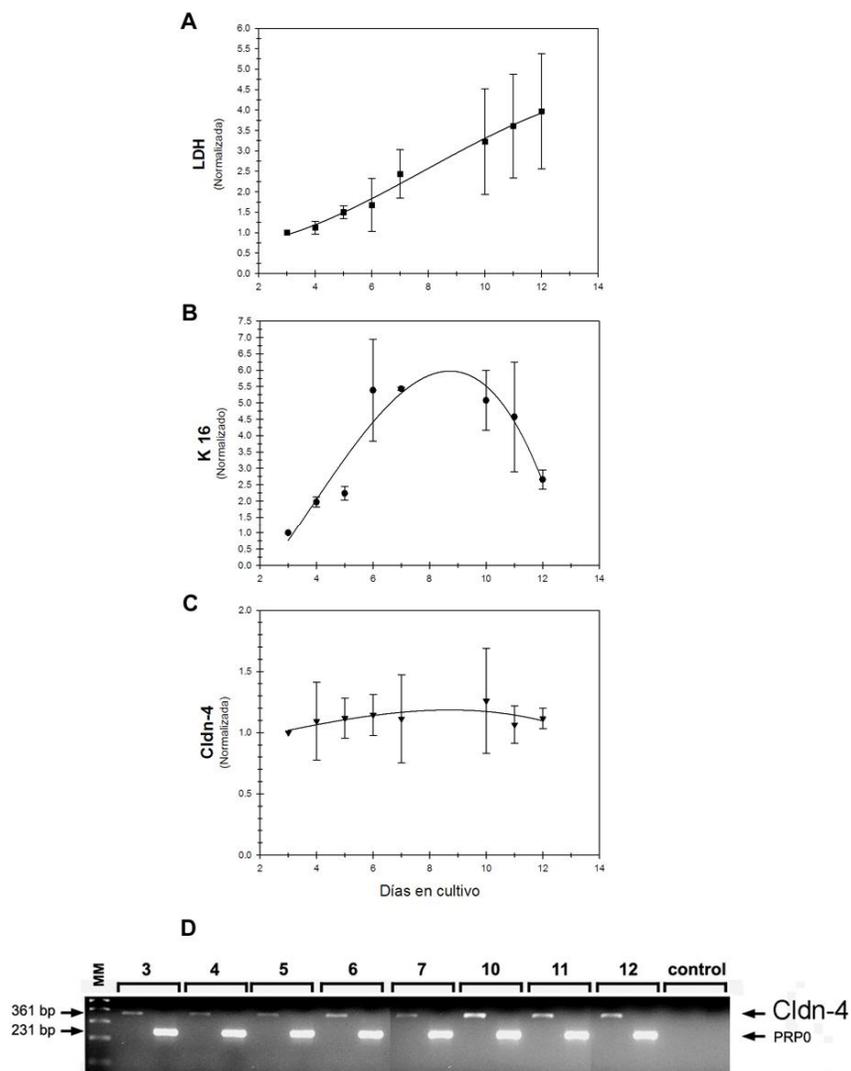


Fig 9. Niveles relativos de los mRNAs de (A) LDH, (B) K16 y (C) Cldn-4 en células RCE1 durante la proliferación y diferenciación en cultivo. Se presentan los promedios de 4 experimentos independientes, normalizados contra el 3er día de cultivo. (D) Curva de expresión de Cldn-4 en células RCE1 (361 bp). El control interno utilizado fue PRP0 (231 bp). Marcador de Peso Molecular de 100bp (MM). Los números en la parte superior indican los días en cultivo. No se observan productos en ausencia de cDNA (control). Gel de agarosa al 2%(p/v) con 0.5 mg/ml de bromuro de etidio.

Inmunolocalización de Cldn, Ocln y ZO-1

Para establecer si la expresión de los mRNAs que codifican correlaciona con la presencia de las proteínas que constituyen a las uniones estrechas, realizamos experimentos de inmunolocalización. Las células RCE1(5T5) se crecieron hasta confluencia, se fijaron y se inmunotñeron con anticuerpos específicos hacia Claudina-1, Ocludina y ZO-1. Los resultados mostraron que la claudina-1 se localizó en los bordes de las células suprabasales más externas, formando una línea continua que delimitó claramente el borde de las células (Fig. 10); por otra parte, la proteína ZO-1 se observó con una distribución similar así como en el citoplasma de las células (Fig. 12). Asimismo, la ocludina se inmunolocalizó principalmente en los bordes de las células (Fig. 11). En conclusión, los epitelios formados por las células RCE1(5T5), forman epitelios estratificados, cuya capa suprabasal más externa presenta a las proteínas características de la unión estrecha, concordando con observaciones hechas para otros tipos de células epiteliales corneales (Ban *et al.*, 2003 a, Yi, *et al.*, 2000).

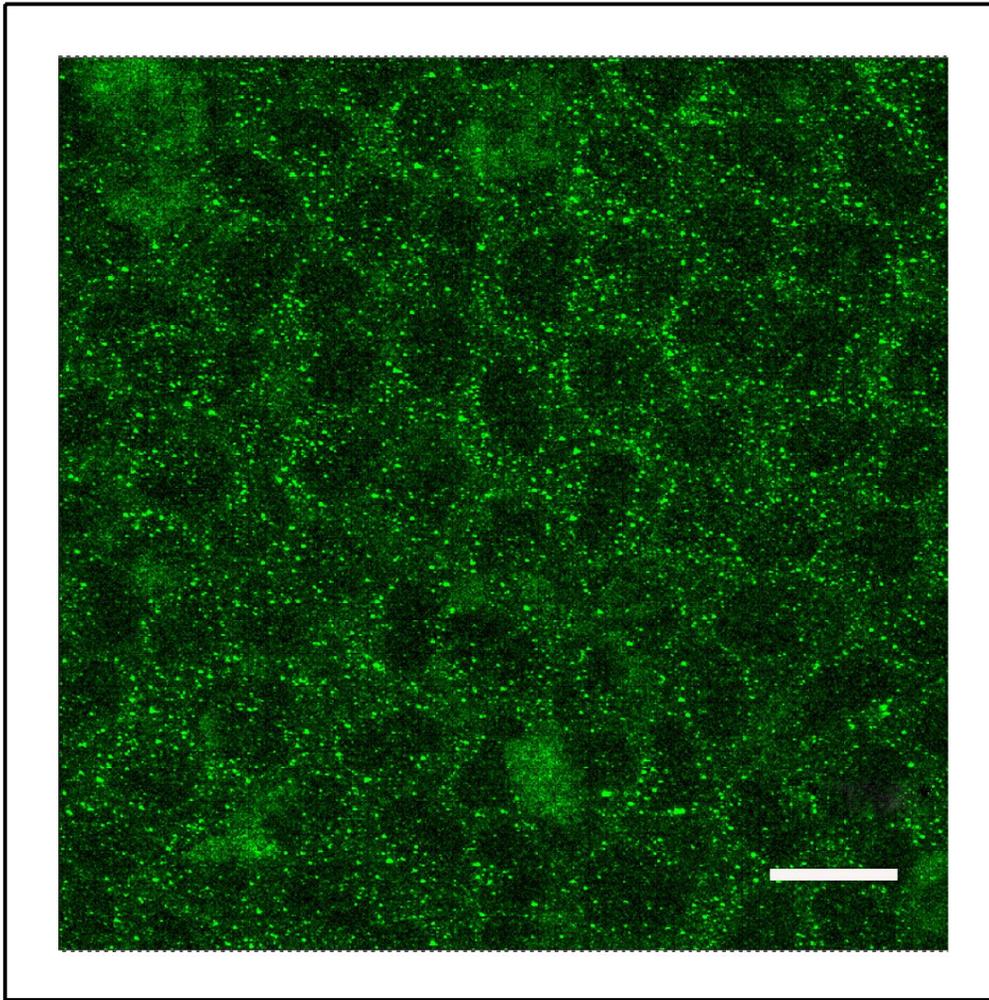


Fig. 10. Inmunolocalización de Claudina-1 en células RCE-1. La proteína se observa localizada en los bordes de las células. Barra: 20 μm .

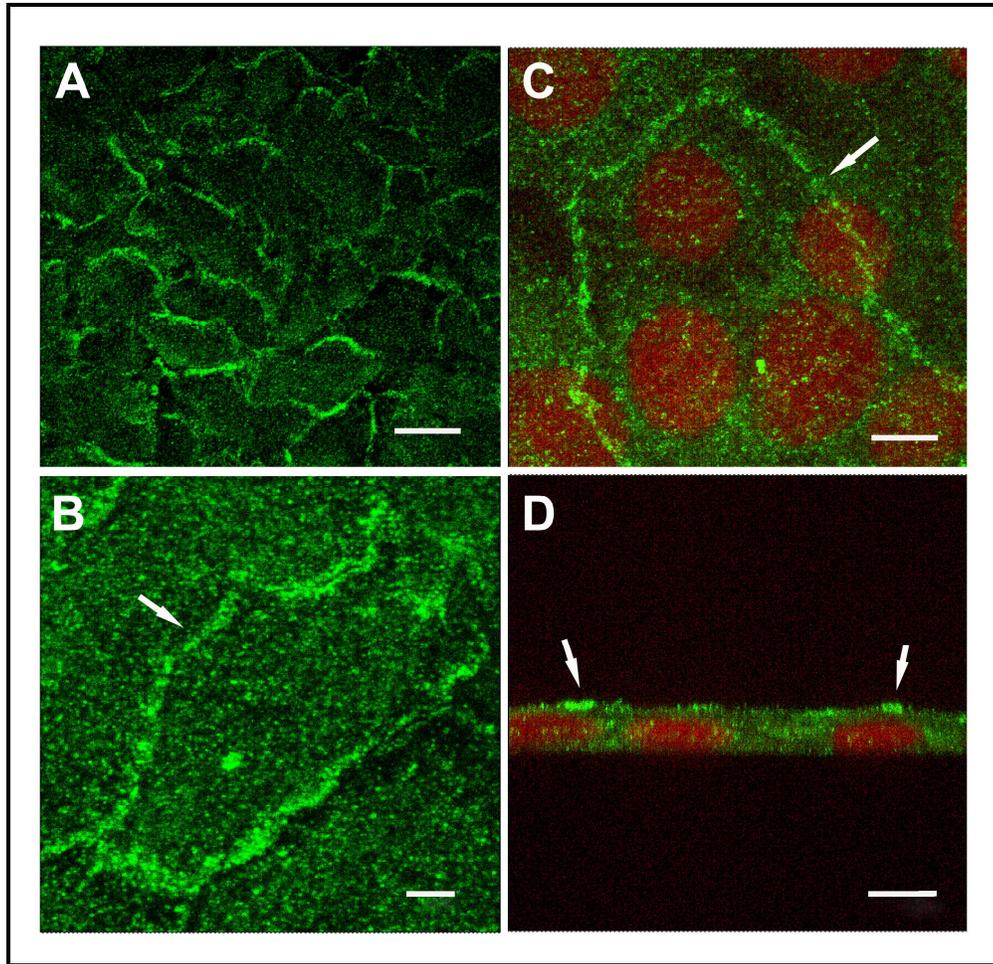


Fig. 11. Inmunolocalización de Occludina en células RCE-1. A y B) Localización de Occludina, la proteína se observa distribuida en los bordes de las células. Barra: 20 μm y 4 μm respectivamente. C) Vista superior y D) corte óptico transversal de la misma célula, la Occludina (verde) se observa principalmente en el estrato más apical y hacia los bordes de las células. Núcleos (rojo) teñidos con yoduro de propidio (PI). En esta imagen podemos observar los puntos en donde termina la célula (flechas). Barra: 8 μm .

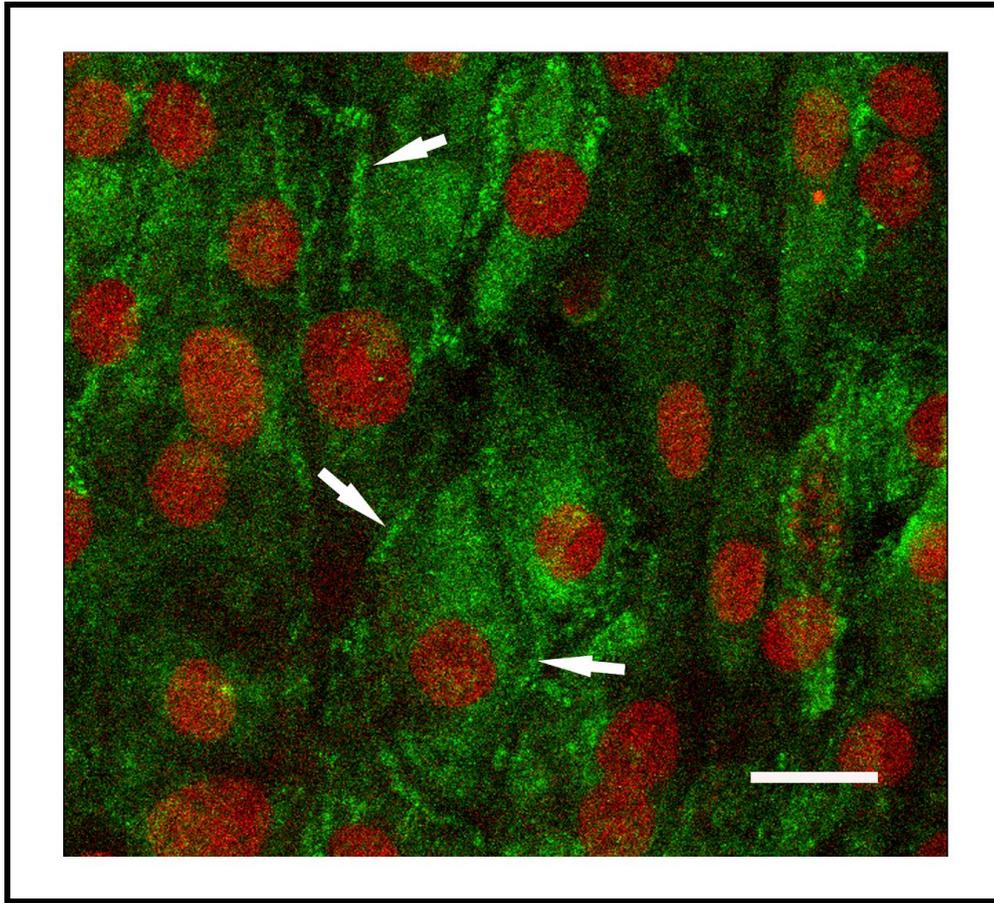


Fig. 12. Inmunolocalización de ZO-1 en células RCE-1. Distribución de ZO-1 (verde), la cual se observa en los bordes de las células (flechas) y también en citoplasma. En rojo se observan los núcleos teñidos con yoduro de propidio (PI). Barra: 20 μ m.

DISCUSIÓN

Debido a que los epitelios son tejidos que como parte de su función, requieren la expresión y ensamblaje de las proteínas que constituyen a la unión estrecha, y considerando que el mantenimiento de la transparencia y por lo tanto, de la funcionalidad de la córnea depende de la formación de estas uniones intercelulares, en este trabajo se determinó si las células RCE1(5T5) expresan a las Claudinas, a la ocludina y a la proteína ZO-1, todas ellas componentes cruciales de la unión estrecha. También se analizó si existen cambios en la expresión de estas moléculas a lo largo del crecimiento y la diferenciación en cultivo del epitelio corneal.

Para hacer este tipo de estudio, tomamos ventaja de la disponibilidad de la línea celular no transformada RCE1(5T5), establecida de manera espontánea mediante la transferencia serial de queratinocitos de epitelio corneal de conejo albino (Castro-Muñozledo, 1994; 2008; Tamariz *et al.*, 2007). Esta línea celular se caracteriza por replicar *in vitro* los procesos secuenciales que ocurren durante el crecimiento y la diferenciación del epitelio corneal de mamífero, hasta formar un epitelio estratificado de 4-5 capas celulares, que expresa a los marcadores de diferenciación del epitelio corneal (Castro-Muñozledo, 1994, 2008; Tamariz *et al.*, 2007). Estos estudios tienen como objetivo final, determinar si es factible utilizar a esta línea celular como modelo para estudiar la biogénesis, regulación y funcionalidad de las uniones estrechas en relación al proceso de diferenciación.

El análisis ultraestructural de los epitelios formados por las células RCE1(5T5) demostró la presencia de estructuras con características similares a las uniones estrechas. En estas observaciones, encontramos sitios de contacto célula-célula en donde las membranas adyacentes se encuentran muy cerca una de otra, con la consecuente disminución en el espacio intercelular. Estas estructuras sólo se localizaron

en las capas suprabasales más externas del epitelio y no en el resto de las capas suprabasales como se esperaba, pues se ha reportado la presencia de proteínas de unión estrecha en células alares e incluso basales en epitelio corneal (Ban, et al., 2003a). No obstante, éstos puntos de unión son muy similares a las uniones estrechas previamente reportadas en cultivos primarios de epitelio corneal de conejo (Higa, et al. 2007).

Dado que no fue posible distinguir morfológicamente a las uniones estrechas, medimos la Resistencia Eléctrica Transepitelial (TER), parámetro que nos permite conocer de manera indirecta la existencia de estas uniones y el grado de hermeticidad que le confieren al epitelio. Al determinar la TER, confirmamos que las células RCE1(5T5) forman uniones estrechas funcionales, pues poseen una resistencia transepitelial de $291 \pm 65.7 \Omega/\text{cm}^2$, considerada como moderada (Inai, et al., 2007). Esta resistencia contrastó con la de las células MDCK, con valores de TER altos que son característicos de esta línea celular (Anderson, 2001) (ver Tabla. 2).

Tipo celular	Proveniente de	TER ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	Referencia	Clasificación
CMT93	Carcinomas en intestino de ratón	86-560	Inai, 2007	Baja - Moderada
NHEK	Queratinocitos epidermales humanos	50 - 600	Yuki et al. 2007	Baja - Moderada
THCE	Epitelio corneal humano transformado (SV-40)	100	Yi et al. 2000	Moderada
	Cultivo primario de epitelio corneal humano	120	Yi et al. 2000	Moderada
RCE1	Epitelio corneal de conejo	260		Moderada
Calu-3	Epitelio bronquial humano transformado	500 - 2000	Go et al. 2006	Moderada - Alta
MDCK	Riñón de perro	4000 - 6000	Anderson, 2001	Alta

Tabla 2. Comparación de Resistencia Transepitelial entre varios epitelios. La clasificación fue establecida de manera arbitraria, con base en Inai, et al., 2007.

Previamente, se encontró una correlación entre el número de hebras que constituyen a las uniones estrechas, y los valores de TER en varios tejidos. Se observó que la resistencia transepitelial aumenta en proporción logarítmica respecto al aumento en la cantidad de hebras de uniones estrechas observadas en análisis ultraestructurales (Claude, 1973; 1978). No obstante, esta correlación no parece ser la regla. Posteriormente, experimentos con células MDCK demostraron que la resistencia transepitelial puede ser diferente hasta en 1-2 órdenes de magnitud (30-60 veces) entre subclonas de células MDCK con cantidades similares de hebras de uniones estrechas (Stevenson *et al.*, 1988). Para explicar esta diferencia, se postuló la existencia de poros acuosos en las fibrillas de la unión estrecha. (Claude, 1978; Cereijido, *et al.* 1989).

Alternativamente, a partir del descubrimiento de las claudinas (Furuse *et al.*, 1998a) y de experimentos como los anteriores, se concluyó que las diferencias de TER no se deben al número de fibras que componen a las uniones, sino que están asociadas a la expresión de diferencial de claudinas. De esta manera, el grado de hermeticidad de las uniones estrechas está determinado por las diferentes combinaciones de claudinas y por los niveles de expresión de cada. Las uniones estrechas generalmente expresan más de dos especies de claudina, sin embargo, los patrones de expresión de las claudinas son muy variables, por ejemplo, la claudina-1 se expresa de manera general en la mayoría de los tejidos mientras que otras claudinas son tejido-específicas como la claudina-11, que sólo se encuentra en oligodendrocitos y células de Sertoli (Gow, *et al.*, 1999; o bien se encuentran restringidas a etapas del desarrollo embrionario como la claudina-6 (Turksen & Troy, 2001). De la misma manera, también se ha reportado la expresión segmento-específica de claudinas a lo largo de la nefrona, cuyas propiedades paracelulares cambian a lo largo de cada segmento (Kiuchi-Saishin, *et al.*, 2002).

Ejemplos del efecto de la expresión diferencial de claudinas sobre la resistencia transepitelial se encuentran en varios tipos celulares. Las células MDCK I expresan principalmente claudina-1 y -4, mientras que las MDCK II expresan grandes cantidades de claudina-2, además de la claudina-1 y la -4. Por otra parte, la transfección de células MDCK I con claudina-2 provoca una disminución en su resistencia transepitelial, haciéndolas similares a las células MDCK II, mientras que la expresión ectópica de claudina-3, no afecta la resistencia transepitelial en células MDCK I (Furuse, *et al.*, 2001).

En general, se ha observado que la presencia de las claudinas -4, -7 y 8 lleva a la mayor resistencia transepitelial, tanto *in vivo* como *in vitro* (Li, *et al.* 2004; Enck, *et al.*, 2001; Kiuchi-Saishin, *et al.*, 2002). En cambio, la expresión ectópica de claudina 2 reduce la resistencia transepitelial (Furuse, *et al.*, 2001); hecho que correlaciona con las propiedades de epitelios con baja o moderada hermeticidad como el del túbulo renal proximal o el de las criptas intestinales. Se cree que la claudina-2 podría constituir poros acuosos de alta conductancia en las hebras pareadas de unión estrecha, lo que hace que la resistencia transepitelial disminuya respecto a los niveles de TER en células que no expresan a esta claudina (Tsukita & Furuse, 2000). En general, las evidencias permiten postular la posibilidad de que cada claudina tiene una selectividad intrínseca propia, pero que la selectividad iónica total en un tejido, depende de la combinación de claudinas que se expresan y del entorno celular (Van Itallie, *et al.*, 2003).

Una vez que se determinó la presencia de uniones estrechas en los epitelios formados por las células RCE1(5T5), evaluamos la expresión de los componentes de las uniones estrechas en éstas células. Los experimentos de RT-PCR de punto final y RT-PCR semicuantitativo nos indicaron que las células de epitelio corneal de conejo RCE1(5T5) expresan a las claudinas -1, -2 y -4. Ese resultado contrasta con los resultados obtenidos en cultivos de epitelio corneal de humano transformado (línea

celular THCE), donde se expresan las claudinas-1, -2, -3, -7, -9, -14 y -15 (Yi *et al.*, 2000), en cultivos primarios de epitelio corneal humano en los cuales se reportó la expresión de las claudinas- 1, -2, -3, -4, -7,- 9, -10 y -14 (Ban *et al.*, 2003b). O bien *in vivo* en el epitelio corneal humano, donde se expresan las claudinas -1,-2, -3, -4, -7, -9, y -14 (Ban *et al.*, 2003a).

Aunque previamente se demostró que la línea celular RCE1(5T5) es un modelo que reproduce los cambios asociados al proceso de diferenciación del epitelio corneal y a la expresión del fenotipo terminal (Castro-Muñozledo, 1994, 2008; Tamariz *et al.*, 2007; García-Villegas *et al.*, 2009), las diferencias entre estas células y el epitelio corneal de humano podrían deberse a diferencias inter-específicas, o bien a que aún se requieren otros estudios que nos permitan detectar los factores que regulan la expresión de las claudinas. Para resolver esta disyuntiva, será necesario establecer el patrón de expresión corneal *in vivo* de claudinas, así como también definir si las condiciones de cultivo pueden modificarse para aumentar el proceso de estratificación, y por ende estimular la expresión de éstos componentes de las uniones estrechas.

Por otra parte, confirmando la presencia de uniones estrechas en el epitelio formado por esta línea celular, en los experimentos de RT-PCR de punto final, demostramos la expresión de las proteínas ocludina y ZO-1, cuya presencia también fue confirmada por los experimentos de inmunotinción.

Finalmente, considerando que otros autores han demostrado que la claudina-2 disminuye sus niveles durante la diferenciación del epitelio intestinal de humano (Escaffit, *et al.* 2005), en experimentos de RT-PCR semicuantitativo, nosotros determinamos si existen cambios en los niveles de los mensajeros que codifican para las claudinas 1, -2 y 4 durante el crecimiento y diferenciación de las células RCE1(5T5). Como se describió

anteriormente, los niveles de mRNA de Cldn-1, -2 y -4 se expresan desde los primeros días de cultivo y se mantienen relativamente constantes durante el tiempo de cultivo. Esto contrastó con la expresión temporal de la queratina K16, cuyo aumento alcanza un máximo a los días 6 y 7 de cultivo, y que corresponde a la etapa en que las células alcanzan la confluencia e inician el proceso de diferenciación terminal. Del mismo modo, los niveles de las claudinas no parecen modificarse cuando se expresa el fenotipo terminal, cuando los niveles de LDH-H alcanzan su mayor expresión. Esto nos sugiere que la síntesis de las claudinas parece variar ligeramente a lo largo del cultivo de las células corneales, y más bien indica que la formación de los complejos de unión depende de otros procesos como pueden ser la estratificación y la expresión del fenotipo terminal. Para apoyar o descartar esta posibilidad, será necesario establecer si existe una correlación entre los niveles de los mensajeros y la presencia de las proteínas correspondientes.

Al mismo tiempo, será primordial conocer si las condiciones de cultivo son las adecuadas para la estructuración de los estratos suprabasales y para que ocurra el ensamblaje de los complejos de unión. Las inmunotinciones nos permiten suponer que las condiciones para la formación de los complejos de unión son adecuadas, ya que fue factible inmunolocalizar a Cldn-1, ZO-1 y Occludina hacia los bordes célula-célula. Será muy importante en un futuro continuar estos estudios, ya que la línea celular RCE1(5T5) parece ser un modelo muy útil para estudiar la morfogénesis y estructuración de las uniones estrechas.

En resumen, este trabajo nos permitió abordar un problema tan complejo como la expresión de claudinas y su coordinación con la expresión del proceso de diferenciación. Ahora sabemos que los queratinocitos corneales RCE1 expresan a las proteínas de unión estrecha: claudina-1, -2, -4, ocludina y ZO-1 y forman epitelios con uniones estrechas funcionales, por lo que podrían llegar a servir como modelo para estudiar a la unión

estrecha en epitelio corneal, su regulación, su modificación para modular o disminuir su función; y para regular mediante el uso de drogas la absorción de medicamentos. Asimismo, podrían entenderse y tratarse aquellas enfermedades relacionadas con desórdenes en el complejo de unión estrecha, de las cuáles se conocen pocas.

CONCLUSIONES

El epitelio corneal cultivado (RCE1) forma uniones estrechas funcionales, con una resistencia transepitelial de $291 \pm 65.7 \Omega/\text{cm}^2$ y expresa las proteínas de unión estrecha: Claudina-1, -2, -4, Ocludina y ZO-1.

Las claudinas-1, 2 y 4, mantienen niveles de mRNA constantes durante el crecimiento y diferenciación del epitelio corneal de conejo cultivado.

La expresión de claudina-2 pudiera influir en la fisiología del epitelio, pues constituye poros en las uniones estrechas que permiten el paso de cationes y podría contribuir a mantener el gradiente electroquímico formado en la córnea.

REFERENCIAS

- Anderson, J.** 2001. Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport. *News Physiol Sci* 16: 126 – 130.
- Ban, Y., Dota, A., Cooper, L.J., Fullwood, N.J., Nakamura, T., Tsuzuki, M., Mochida, C., Kinoshita, S.** 2003 a. Tight junction-related protein expression and distribution in human corneal epithelium. *Exp. Eye Res.*, 76: 735 – 743.
- Ban, Y., Cooper, L.J., Fullwood, N.J., Nakamura, T., Tsuzuki, M., Koizumi, N., Dota, A., Mochida, C., Kinoshita, S.** 2003 b. Comparison of ultrastructure, tight junction-related protein expression and barrier function of human corneal epithelial cells cultivated on amniotic membrane with and without air-lifting. *Exp. Eye Res.*, 6: 735–743.
- Barker, G. & Simmons, N. L.** 1981. Identification Of Two Strains Of Cultured Canine Renal Epithelial Cells (Mdkc Cells) Which Display Entirely Different Physiological Properties *Quarterly Journal Of Experimental Physiology* 66, 61-72.
- Castro-Muñozledo, F.** 1994. Development of a spontaneous permanent cell line of rabbit corneal epithelial cells that undergoes sequential stages of differentiation in cell culture. *J Cell Sci* 107: 2343 – 2351.
- Castro-Muñozledo, F.** 2008. Corneal epithelial cell cultures as a tool for research, drug screening and testing. *Exp Eye Res.* 86(3):459-469.
- Cereijido, M., Gonzalez-Mariscal, L., Contreras, G.** 1989. Tight junction: barrier between higher organisms and environment. *News in Physiol. Sci.* 4: 72 – 75.
- Chen, T. T., Wu, R. L., Castro-Muñozledo, F., and Sun, T.T.** 1997. Regulation of K3 keratin gene transcription by Sp1 and AP-2 in differentiating rabbit corneal epithelial cells. *Mol Cell Biol.* 17: 3056 -3064.
- Claude, P.** 1978. Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistance of the zonula occludens. *J. Membr. Biol.* 10: 219–232.
- Claude, P., Goodenough, D.** 1973. Fracture faces of zonulae occludentes from "tight" and "leaky" epithelia. *J. Cell Biol.* 58: 390 – 400.
- Dobrosotskaya, I., Guy, R. K. & James, G. L.** 1997. MAGI-1, a membrane-associated guanylate kinase with a unique arrangement of protein-protein interaction domains. *J. Biol. Chem.* 272: 31589–31597.

- Enck AH, Berger U.V., and Yu A.S.** 2001. Claudin-2 is selectively expressed in proximal nephron in mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 281: F966–F974.
- Escaffit, F., Boudreau, F. & Beaulieu, F.** 2005. Differential Expression of Claudin-2 Along the Human Intestine: Implication of GATA-4 in the Maintenance of Claudin-2 in Differentiating Cells. *J Cell Physiol* 203:15–26.
- Evans, M. J., Von Hahn, T., Tscherne, D. M., Syder, A. J., Panis, M., Wolk, B., Hatzioannou, T., McKeating, J. A., Bieniasz, P.D., Rice, C.M.** 2007. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446: 801–805.
- Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., and Tsukita, S.** 1993. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 123: 1777-1788.
- Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K., and Tsukita, S.** 1998a. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 141: 1539-1550.
- Furuse, M., Sasaki, H., Fujimoto, K., and Tsukita, S.** 1998b. A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol* 143: 391-401.
- Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., 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.
- García-Villegas, R., Escamilla, J., Fiorentino, R., Cerejido, M.** 2007. Potassium channels lost during harvesting of epithelial cells are restored with a kinetics that depends on channel species. *Cell Physiol Biochem* 20:405-416.
- Go, M., Kojima, T., Takano, K., Murata, M., Koizumi, J., Kurose, M., Kamekura, R., Osanai, M., Chiba, H., Spay, D., Himi T., Sawada, N.** 2006. Connexin 26 expression prevents down-regulation of barrier and fence functions of tight junctions by Na⁺/K⁺-ATPase inhibitor ouabain in human airway epithelial cell line Calu-3. *Exp Cell Res* 312:3847–3856.

- Gonzalez-Mariscal, L., Betanzos, A., Avila-Flores, A.** 2000. MAGUK proteins: structure and role in the tight junction. *Semin Cell Dev Biol* 11:315–324.
- Gow, A., Southwood, C., Li, J., Pariali, M., Riordan, G., Brodie, S., Danias, J., Bronstein, J., Kachar, B., Lazzarini, R.** 1999. CNS myelin and Sertoli cell tight junction strands are absent in Osp:claudin-11 null mice. *Cell* 99: 649 – 659.
- Hadj-Rabia, S., Baala, L., Vabres, P., Hamel-Teillac, D., Jacquemin, E., Fabre, M., Lyonnet, S., De Prost, Y., Munnich, A., Hadchouel, M., Smahi, A.** 2004. Claudin-1 gene mutations in neonatal sclerosing cholangitis associated with ichthyosis: a tight junction disease. *Gastroenterology* 127: 1386–1390.
- Hernández-Quintero, M., García-Villegas, R., Castro-Muñozledo, F.** 2002. Differentiation-dependent increases in lactate dehydrogenase activity and isoenzyme expression in rabbit corneal epithelial cells. *Exp Eye Res.* 74: 71-82.
- Higa, K., Shimmura, S., Kato, N., Kawakita, T., Miyashita, K., Itabashi, Y., Fukuda, K., Shimazaki, J., & Tsubota, K.** 2007. Proliferation and Differentiation of Transplantable Rabbit Epithelial Sheets Engineered with or without an Amniotic Membrane Carrier. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48 (2):597 – 604.
- Inai, T., Sengou, A., Hirose, E., Iida, H., Shibata, Y.** 2007. Comparative characterization of Mouse rectum CMT93-I and -II cells by expression of claudin isoforms and tight junction morphology and function. *Hist Cell Biol.* 129(2): 223 - 232.
- Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M., Tsukita, S.** 1999. Direct binding MAGUKs, ZO-1, ZO-2 and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol* 147: 1351 – 1363.
- Izumi, Y., Hirose, T., Tamai, Y., Hirai, S., Nagashima, Y., Fujimoto, T., Tabuse, Y., Kemphues, K. J., Ohno, S.** 1998. An atypical PKC directly associates and colocalizes at the epithelial tight junction with ASIP, a mammalian homologue of *Caenorhabditis elegans* polarity protein PAR-3. *J. Cell Biol* 143, 95–106.
- Kaashoek, J. G., Mout, R., Falkenburg, J., Willemze, R., Fibbe, W., Landegent, J.** 1991. Cytokine production by the bladder carcinoma cell line 5673: rapid analysis of mRNA expression levels using a cDNA-PCR procedure. *Lymphokine Cytokine Res.* 10: 231 -235.

- Kang, J., Choi, H., Cho, H., Lee, J., Ha, I., Cheong, H., Choi, Y.** 2005. Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis associated with CLDN16 mutations. *Pediatr Nephrol* 20: 1490–1493.
- Katahira, J., Sugiyama, H., Inoue, N., Horiguchi, Y., Matsuda, M., Sugimoto, N.** 1997. *Clostridium perfringens* enterotoxin utilizes two structurally related membrane proteins as functional receptors in vivo. *J Biol Chem.* 272: 26652 -26658.
- Kiuchi-Saishin, Y., Gotoh, S., Furuse, M., Takasuga, A., Tano, Y., and Tsukita, S.** 2002. Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. *J Am Soc Nephrol* 13: 875–886.
- Konrad, M., Schaller, A., Seelow, D., Pandey, A., Waldegger, S., Lesslauer, A., Vitzthum, H., Suzuki, Y., Luk, J., Becker, C., Schlingmann, K., Schmid, M., Rodriguez-Soriano, J., Ariceta, G., Cano, F., Enriquez, R., Juppner, H., Bakkaloglu, S., Hediger, M., Gallati, S., Neuhauss, S., Nurnberg, P., Weber, S.** 2006. Mutations in the tight-junction gene claudin 19 (CLDN19) are associated with renal magnesium wasting, renal failure, and severe ocular involvement. *Am J Hum Genet* 79: 949–957.
- Li, W., Huey C., Yu A.** 2004. Expression of claudin-7 and -8 along the mouse nephron. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 286: F1063– F1071.
- Lin, D., Edwards, A. S., Fawcett, J. P., Mbamalu, G., Scott, J. D., Pawson, T.** 2000. A mammalian PAR-3–PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. *Nature Cell Biol.* 2: 540 – 547.
- Morin P. J.** 2005. Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer Res* 65: 9603–9606.
- Morita, K., Furuse, M., Fujimoto, K., Tsukita, S.** 1999. Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 96: 511 – 516.
- Muresan, Z., Paul, D., Goodenough, D.** 2000. Occludin 1B, a variant of the tight junction protein occludin. *Mol Biol Cell* 11(2): 627 – 634.
- Porter, R., Hutcheson, A., Rugg, E., Quinlan, R., Lane, B.** 1998. cDNA Cloning, Expression, and Assembly Characteristics of Mouse Keratin 16. *J Biol Chem*, 273 (48): 32265-32272.

- Rheinwald, J. G.** 1980. Serial cultivation of normal human epidermal keratinocytes. *Methods Cell Biol.* 21A: 229 -254.
- Schermer, A., Jester, J. V., Hardy, C., Milano, D., and Sun, T. T.** 1989. Transient synthesis of K6 and K16 keratins in regenerating rabbit corneal epithelium: keratin markers for an alternative pathway of keratinocytes differentiation. *Differentiation* 42: 103-110.
- Schneeberger, E. & Lynch, R.** 2004. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C1213 – 1228.
- Staehelin, L.A.** 1973. Further observations on the fine structure of freeze-cleaved tight junctions. *J Cell Sci* 13: 763 – 786.
- Stevenson, B., Silicano, J., Mooseker, M., and Goodenough, D.** 1986. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol* 103: 755-766.
- Stevenson, B., Anderson, J., Goodenough, D. and Mooseker, M.** 1988. Tight junction structure and ZO-1 content are identical in two strains of Madin–Darby canine kidney cells which differ in transepithelial resistance. *J. Cell Biol.* 107: 2401–2408.
- Tamariz, E., Hernández-Quintero, M., Sánchez-Guzmán, E., Argüello, C., Castro-Muñozledo, F.** (2007) RCE1 corneal epithelial cell line: its variability on phenotype expression and its differential response to growth factors. *Arch. Med. Res.* 38:176-184.
- Tsukita, S., Furuse, M.** 2000. Pores in the Wall: Claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *J Cell Biol* 149: 13 – 16.
- Tsukita, S., Furuse, M., Itoh, M.** 2001. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 285 – 293.
- Turksen, K., & Troy, T. C.** 2001. Claudin-6: A novel tight junction molecule is developmentally regulated in mouse embryonic epithelium. *Dev. Dyn.* 222: 292 – 300.
- Van Itallie, C., Fanning, A. & Anderson, J.** 2003. Reversal of charge selectivity in cation or anion-selective epithelial lines by expression of different claudins. *Am J Physiol Renal Physiol* 285: F1078–F1084.

- Wilcox, E.R., Burton, Q.L., Naz, S., Riazuddin, S., Smith, T. N., Ploplis, B., Belyantseva, I., Ben-Yosef, T., Liburd, N. A., Morell, R. J., Kachar, B., Wu, D. K., Griffith, A. J., Friedman, T.B.** 2001. Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29. *Cell* 104: 165–172.
- Wu, X., Dowbenko, D., Spencer, S., Laura, R., Lee, J., Gu, Q., Lasky, L.A.** 2000. Interaction of the tumor suppressor PTEN/MMAC with a PDZ domain of MAGI3, a novel membrane-associated guanylate kinase. *J. Biol. Chem.* 275: 21477–21485.
- Wuytack, F.** 2009. Half a century of ion-transport ATPases: the P- and V-type ATPases. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 457:569–571.
- Yi, X., Wang, Y., Yu, F.S.** 2000. Corneal epithelial tight junctions and their response to lipopolysaccharide challenge. *Invest. Ophthalmol Vis Sci* 41: 4093–4100.
- Zheng, A., Yuan, F., Li, Y., Zhu, F., Hou, P., Li, J., Song, X., Ding, M., Deng, H.** 2007. Claudin-6 and claudin-9 function as additional coreceptors for hepatitis C virus. *J Virol* 81: 12465–12471.